ԵՐԵՎԱՆԻ Մ. ՀԵՐԱՑՈՒ ԱՆՎԱՆ ՊԵՏԱԿԱՆ ԲԺՇԿԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՍՏԵՓԱՆ ԱՐՄԵՆԻ ԱԹՈՅԱՆ

ԿԼԻՆԻԿԱԿԱՆ ԴՐՍԵՎՈՐՈՒՄՆԵՐԻ ԵՎ MEFV ՈՒ SAA1 ԳԵՆԵՐԻ ՄՈՒՏԱՑԻԱՆԵՐԻ ՄԻՋԵՎ ԱՍՈՑԻԱՑԻԱՆ ՀԱՅԱՍՏԱՆՈՒՄ ԸՆՏԱՆԵԿԱՆ ՄԻՋԵՐԿՐԱԾՈՎՅԱՆ ՏԵՆԴՈՎ ՀԻՎԱՆԴՆԵՐԻ ՄՈՏ

ԺԴ.00.03 - «Ներքին հիվանդություններ» մասնագիտությամբ
բժշկական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2016

ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ МХИТАРА ГЕРАЦИ

АТОЯН СТЕПАН АРМЕНОВИЧ

АССОЦИАЦИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ С МУТАЦИЯМИ ГЕНОВ MEFV И SAA1 СРЕДИ АРМЯНСКИХ ПАЦИЕНТОВ С СЕМЕЙНОЙ СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.00.03 “Внутренние болезни”

ЕРЕВАН - 2016

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի Մխիթար Հերացու անվան պետական բժշկական համալսարանի Գիտակոորդինացիոն խորհրդի նիստում

Գիտական ղեկավարներ՝ բ.գ.դ., պրոֆ. Է.Ե. Նազարեթյան
կ.գ.դ., պրոֆ. Թ.Ֆ. Սարգսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ բ.գ.դ., պրոֆ.Ս.Ս. Գամբարով
բ.գ.թ. (PhD), պրոֆ. Յ. Բերկուն

Առաջատար կազմակերպություն՝ «Արաբկիր» բժշկական համալիր – երեխաների և դեռահասների առողջության ինստիտուտ

Պաշտպանությունը կայանալու է 2016թ.-ի դեկտեմբերի «19» - ին ժ. 14:00 – ին Երևանի Մխիթար Հերացու անվան պետական բժշկական համալսարանում գործող ԲՈՀ-ի 028 - «Թերապիա» մասնագիտական խորհրդի նիստում (375072, Երևան, Կորյունի 2):
Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Մ. Հերացու անվան ԵՊԲՀ գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2016թ. նոյեմբերի «18» - ին:

Մասնագիտական խորհրդի
Գիտական քարտուղար բ.գ.թ. Լ.Գ.Թունյան

Тема диссертации утверждена на заседании Научно-координационного совета Ереванского Государственного Медицинского Университета им. М. Гераци

Научные руководители: д.м.н., проф. Э.Е. Назаретян
д.б.н., проф. Т.Ф. Саркисян

Официальные оппоненты: д.м.н., проф. С.С. Гамбаров
к.м.н. (PhD), проф. Я. Беркун

Ведущая организация: Медицинский комплекс “Арабкир” - институт здоровья детей и подростков

Защита диссертации состоится 19 декабря 2016г. В 14:00 ч. на заседании специализированного совета ВАК 028 - “Терапия” при Ереванском Государственном Медицинском Университете им. Мхитара Гераци по адресу: 375025, ул. Корюна 2.
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЕГМУ им. Мхитара Гераци.

Автореферат разослан 18 ноября 2016г.

Ученый секретарь
Специализированного совета к.м.н. Л.Г. Тунян

ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Семейная средиземноморская лихорадка (ССЛ) относится к гетерогенной группе редких наследственных периодических лихорадок, сложность диагностики которых обусловлена отсутствием специфических факторов манифестации и меж- и внутрисемейной клинической гетерогенностью. Современные представления о патогенезе определяют ССЛ как генетическое аутовоспалительное заболевание с периодическими приступами лихорадки, абдоминальным болевым синдромом (асептическим перитонитом), длительностью от 1 до 3 дней, реже до 1–2 нед. Суставной синдром характеризуется артралгиями, воспалением крупных суставов; торакальный вариант с плевральным синдромом наблюдается реже; во время приступов возможны кожные проявления (рожеподобная сыпь, пурпурные высыпания, везикулы, ангионевротические отеки), головная боль, асептический менингит, перикардит, миалгия, гепатолиенальный синдром, острый орхит.

ССЛ лидирует по частоте среди наследственных патологий в Армении, в связи с чем решение теоретических и практических вопросов крайне актуально для оказания медико-генетической помощи населению. При отсутствии своевременной диагностики и соответвующего лечения ССЛ можетосложниться развитием амилоидоза почек (АП), являющегося самым грозным проявлением заболевания.

До описания конкретного гена, ответственного за развитие ССЛ, предлагались разные теории этиопатогенеза, и диагноз ставился после развития типичных клинических симптомов. Новая эра в диагностике ССЛ наступила в 1997 г., после описания мутаций гена MEFV. Молекулярно-генетические исследования обладают несомненными преимуществами в оказании помощи пациентам, а именно: ранней, пресимптоматической диагностикой заболевания, что важно для профилактики и эффективного лечения. В Армении молекулярно-генетическая диагностика ССЛ проводится в Центре медицинской генетики и первичной охраны здоровья (ЦМГ). С 1997 г. по настоящее время результаты комплексного клинического и генетического исследования более 28000 человек, составивших наиболее обширную выборку в мире.

Аутосомно-рецессивный тип наследования ССЛ подразумевает наличие двух гомозиготных или компаунд-гетерозиготных мутаций. Вопросом для обсуждения является диагностика гетерозиготных носителей одной из мутаций гена MEFV с клиническими симптомами заболевания, который детально исследован внастоящей работе. Также в данной работе исследовано влияние генетических модифицирующих факторов на проявление воспалительных процессов при ССЛ и осложнениях заболевания.

Цель исследования - разработать комплексные клинико-генетические и методические принципы исследования клинических особенностей ССЛ в зависимости от спектра генных мутаций, позволяющих осуществлять эффективную помощь населению.

Задачи исследования:

1. Провести ДНК-диагностику и верифицировать типы генных мутаций, выявленных при клиническом обследовании пациентов.
2. Изучить клинические особенности заболевания с детальным генетическим анализом у гетерозиготных носителей одной мутации в сравнении с гомо- и компаунд-гетерозиготами, с учетом клинических, генетических и лабораторных данных.
3. Разработать компьютерную программу и оценить ее эффективность при сопоставлении молекулярно-генетических характеристик с клиническими проявлениями ССЛ.
4. Установить тип наследования заболевания у гетерозиготных носителей с подтвержденным диагнозом ССЛ с последующей оценкой генетического риска в семьях при медико-генетическом консультировании.
5. Оценить влияние гена-модификатора SAA1 на течение патологического процесса.
6. Создать генетический регистр ССЛ и иных аутовоспалительных болезней.

Научная новизна

Впервые проведен комплексный анализ клинических и генетических параметров у армянских больных ССЛ за 1997-2016 гг. Показана фенотипическая вариабельность симптомов, обусловленная разными мутациями гена MEFV, а в некоторых случаях - экспрессией гена-модификатора с развитием сложного фенотипа и осложнений.

Впервые подтвержден патогенный эффект определенных мутаций гена MEFV, считающихся в некоторых популяциях наиболее “слабыми” или полиморфизмами.

Впервые среди 1017 пациентов с разным спектром мутаций генов MEFV и SAA1, у 32% гомозигот SAA1 β/β не был развит АП, в отличие от больных с генотипом SAA1 α/α, что возможно свидетельствует о его протекторном эффекте.

Впервые исследован клинический эффект комплексных аллелей MEFV у 0.4% пациентов с ССЛ с 3-4 мутациями 2 и 3 экзонов в положении cis.

Впервые создан генетический и клинический регистр обследованных лиц с учетом этнического происхождения, лабораторных данных, наследования ССЛ в семьях, с установлением псевдо-доминантного типа наследования ССЛ (OMIM 134610) у 18.9% армянских пациентов -гетерозиготных носителей мутаций с высокой пенетрантностью. Аутосомно-рецессивный тип наследования (OMIM 249100) отмечен у 81.1% пациентов.

Апробация диссертации

Основные положения работы представлены на конференции: «Prospectives in autoinflammation: genetic and clinical aspects of hereditary periodic fever syndromes”, 3-5 мая, 2015г., Ереван, Армения; на 2-ом съезде Евразийской Ассоциации Терапевтов, 19-20 мая 2016г., Ереван, Армения. Диссертация прошла предварительную апробацию на

заседании научно-координационного совета ЕГМУ им. М. Гераци 2–го ноября 2016г. (протокол N 7). По теме диссертации опубликовано 7 печатных научных работ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста исостоит из введения, обзора литературы, описания материала, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа содержит 4 рисунка, 22 таблиц и 5 графика. Библиографический указатель включает 157 наименований литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы

Настоящая работа выполнена на базе следующих учреждений:

1. Центр медицинской генетики и первичной охраны здоровья (ЦМГ), где проведены следующие исследования: клиническое обследование и генодиагностика всего контингента, лабораторные анализы, УЗИ, генетическое консультирование.
2. Терапевтическая клиника медицинского центра "Канакер-Зейтун", терапевтические отделения университетских клиник “Гераци” и “Мурацан”, где проходили стационарное лечение 166 пациентов ССЛ.

В ЦМГ среди обследованных 28000 лиц мутации гена MEFV были выявлены у 17669, из которых диагноз ССЛ был подтвержден у 14935. Клиническое течение заболевания было исследовано у 166 стационарных больных в терапевтических отделениях медицинского центра "Канакер-Зейтун" и университетских клиниках “Гераци” и “Мурацан”в 2014-2015 гг.

Клиническое обследование пациентов проводилось по критериям Tel-Hashomer (Livneh et al., 1997). Окончательный диагноз ставился после молекулярно-генетического исследования мутаций гена MEFV. Материалом для определения мутаций генов MEFV и SAA1 служила цельная периферическая кровь. Мутации определялись мультиплексной амплификацией участков ДНК, содержащего исследуемый ген, с реверс-гибридизацией полученных ампликонов, контролем в параллельном исследовании и визуализации мутаций с помощью ферментативной реакции (Vienna Lab FMF & SAA1 Assay).

Результаты исследования обрабатывались методом вариационной статистики, рекомендуемым для медико-биологических исследований на персональном компьютере Intel Pentium CPU 2020M с использованием пакета прикладных программ “SPSS Statistics 16.0”.Совместно с сотрудниками Института информатики НАН РА под руководством В.Г. Асланяна разработана специальная компьютерная программа “New Builder”, предназначенная для ввода, хранения и анализа комплекса клинических, генетических, лабораторных данных пациентов ЦМГ с аутовоспалительными заболеваниями, прежде всего с ССЛ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследования, проводимые в ЦМГ с 1997 г. по настоящее время, позволили определить 12 наиболее распространенных мутаций гена MEFV среди 98.71% армянских больных ССЛ: M694V, V726A, M680I (G/C), M680I (G/A), F479L, E148Q, M694I, R761H, P369S, 1692del, K695R, A744S (Sarkisian et al., 2007). В таблице 1 приводятся частоты шести более частых мутаций (%) при ССЛ.

Таблица 1

Распространенность мутаций гена MEFVв Армении у пациентов,страдающих ССЛ

Мутации гена MEFV	**%**	**Мутации гена MEFV**	**%**
M694V	50.6	R761H	3.2
V726A	22.3	E148Q	2.2
M680I	18.7	F479L	1.3

Процентные соотношения разных генотиповприводятсяниже (таблица 2, график 1).

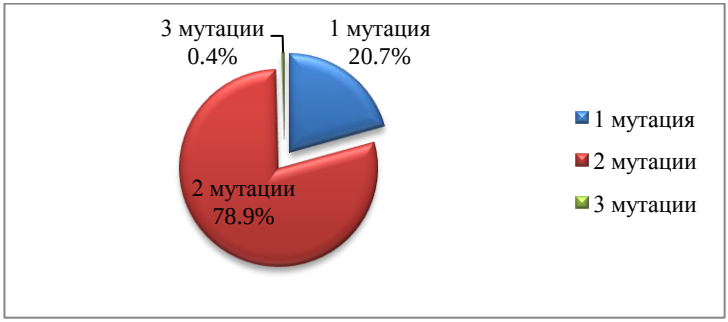
Таблица 2

Наиболее распространенные генотипы гена MEFVсреди обследованных больных в ЦМГ

Гомозиготы	M694V/ M694V	V726A/ V726A	M680I/ M680I			
%	14.1	2.8	2.5			
Компаунд-гетерозиготы	M694V/ V726A	V726A/ M680I	M694V/ M680I	M694V/ E148Q	M694V/ R761H	V726A/ F479L
%	21.3	11.9	11.6	3.7	3.0	3.0
Гетерозиготы	M694V/-	V726A/-	M680I/-	E148Q/-		
%	9.9	4.5	1.5	0.5		

График 1

Соотношение пациентов с 1, 2, 3 мутациями гена MEFV (%)



Выявлены ассоциации между возрастом манифестации фенотипических проявлений и спектром мутаций у больных в возрасте:до 20 лет (77%), после 20 лет (23%), после 35 лет (3.6%); данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

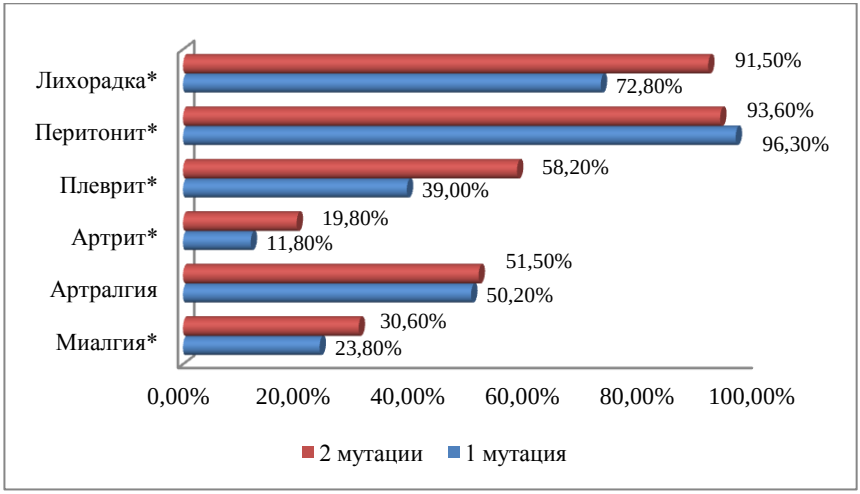
Процентные составляющие начала ССЛ до и после 20-и летнего возраста среди пациентов с одной и двумя мутациями гена MEFV

Генотип	**Начало ССЛ до 20 лет**	**Начало ССЛ после 20 лет**	**p**
Гетерозиготный	75,0 %	25,0 %	0.001
Гомозиготный и компаунд-гетерозиготный	77,8 %	22,2 %	

На графике 2 приводятся обобщенные сравнительные показатели у пациентов с одной (гетерозиготные носители) и двумя (гомозиготы) мутациями и распределением клинических симптомов по частоте: перитонит, лихорадка, плеврит, миалгия, реже-артрит. Достоверные различия были зарегистрированы по следующим симптомам: лихорадке, перитоните, плеврите, артритах и миалгиях.

График 2

Частота встречаемости клинических симптомов ССЛ у гетерозиготных носителей и гомозигот по разным мутациям гена MEFV



*p<0.005

Ниже приводятся результаты исследования клинических проявлений у гетерозиготных носителей по каждой отдельной мутации в сравнении с гомозиготами.

Мутация M694V: самая распространенная мутация среди армян. Нами обобщены данные по корреляции фенотипических проявлений заболевания у гетерозигот и гомозигот. Результаты проводятся в таблице 4. Данная мутация предрасполагает к наиболее тяжелым проявлениям заболевания, включая развитие осложнений. Данные выводы ранее были сделаны на ограниченных выборках пациентов (см. публикации Т.Ф.Саркисян и А.С.Айрапетян) и подтверждаются в настоящем исследовании у нескольких тысяч больных ССЛ. Среди гетерозиготных носителей мутации M694V отмечаются следующие симптомы: лихорадка, которая встречается чаще (97.9%) чем у лиц-гомозигот по мутации M694V; перитонит встречается с почти одинаковой частотой (77.3%, 77.8%) как и у гомозигот, но без статистически достоверного значения; плеврит регистрируется реже чем у гомозигот (36.4% и 46.7%); артралгия у гетерозигот по мутации M694V регистрировалось в 41.7%, а у гомозигот в 61.0% случаев; миалгия встречалась почти с одинаковой частотой (34.8% и 36.3%); кожная сыпь встречается в менее 20% случаев. Возвратные перикардиты наблюдались у 13.8% пациентов с M694V-гомозиготным генотипом в сравнении с гетерозиготными носителями мутации M694V (χ^2=0.93; p=0.34). Что касается осложнений заболевания, при анализе полученных результатов по исследованию экспрессии мутации M694V следует отметить, что у всех пациентов-гомозигот по мутации M694V АП регистрировалось в 2.8% случаев (p<0.001). Следует обратить особое внимание на то, у что 0.2% (11 человек) носителей мутации M694V/- в гетерозиготном состоянии с клиническими симптомами ССЛ, отмечена терминальная стадия поражения почек в виде АП.

Таблица 4

Клинические проявления заболевания у больных с мутацией M694V гена MEFV в гетерозиготном и гомозиготном состояниях.

Клинические проявления	Гетерозиготы по мутации M694V (1434)		Гомозиготы по мутации M694V (2043)			
	N	%	n	%	χ2	p
Лихорадка	1489	97.9	1649	81.6	2.28	0.001
Перитонит	1183	77.3	1563	77.8	0.09	0.756
Плеврит	553	36.4	943	46.7	37.7	0.001
Артрит	224	14.7	750	37.1	2.1	0.001
Артралгия	756	41.7	1233	61.0	45.0	0.001
Миалгия	377	34.8	733	36.3	53.1	0.001
Кожная сыпь	275	18.1	370	18.3	0.03	0.861
АП	3	0.2	56	2.8	35.0	0.001

Мутация V726A: Согласно полученным нами результатам, частота мутации V726A у армян, больных ССЛ 22.3%. В отличие от гетерозиготных носителей мутации M694V, у гетерозиготных носителей мутации V726A чаще всего развивается перитонит, а также лихорадка и плеврит. Гораздо реже - миалгия (16.8%, p=0.003) и артриты (10.6%). В таблице 5 приводятся данные по процентному соотношению клинических симптомов у гетерозигот и гомозигот по мутации V726A.

У гомозигот лихорадка (79.6%, p=0.025) и перитонит (80.5%, p=0.023) встречаются достоверно чаще, чем у гетерозиготных носителей (63.5%, p<0.001 и 51.4%, p<0.001). Плеврит встречался чаще у гомозиготных носителей мутации V726A (32.7% и 25.5% соответсвенно, p<0.001). Миалгии проявляются в 16.8% и 23.2% случаев соответсвенно у гетерозигот и гомозигот (p<0.003), в то время как поражение суставов чаще встречается у гетерозиготных носителей чем у гомозигот (10.6% и 8.0%, p<0.001), но без статистически достоверного значения. Также статистически досотверных значений не регистрировалось при кожной сыпи, которая, как видно из таблицы, встречается почти с одинаковой частотой как у гетерозиготных так и у гомозиготных наосителей V726A мутации.

Таблица 5

Процентное соотношение клинических проявлений среди носителей мутации V726A гена MEFV в гетерозиготном и гомозиготном состоянии

Клинические проявления	Гетерозиготы по мутации V726A (695)		Гомозиготы по мутации V726A (401)			
	n	%	n	%	χ2	P
Лихорадка	357	51.4	319	79.6	1.0	0.001
Перитонит	441	63.5	323	80.5	41.2	0.001
Плеврит	177	25.5	161	40.1	32.7	0.001
Артрит	74	10.6	32	8.0	2.5	0.117
Артралгия	286	41.1	158	39.4	0.3	0.551
Миалгия	117	16.8	93	23.2	8.7	0.003
Кожная сыпь	103	14.9	57	14.2	0.1	0.735

Мутация M680I: считается третьей по распространенности среди армян. Клинические проявления, встречающиеся у лиц с одним и двумя мутантными аллелями приведены в процентном соотношении в таблице 6.

У гетерозиготных носителей мутации M680I наиболее частым симптомом является перитонит, который встречается с меньшей частотой по сравнению с гомозиготами (66.6% и 81.2, p<0.001), следом идет лихорадка, частота которой у гетерозигот и гомозигот составляет 57.8% и 82.3% соответсвенно (p<0.001). Плеврит среди гетерозигот проявляется с меньшей частотой по сравнению с гомозиготами (31.2%

и 56.2%), а артриты у гомозигот встречаются в двое чаще чем у гетерозигот (21.1% и 10.2%, p<0.001). Миалгия у гетерозигот и гомозигот встречается в 17.5% и 25.0% случаев соответсвенно (p<0.001). Кожная сыпь встречается почти с одинаковой частотой у гетерозигот и гомозигот (14.8% и 13.5%, p=0.572), но без статистически достоверного значения (14.8%, p=0.696).

Таблица 6

Процентное соотношение клинических проявлений у больных с мутацией M680I гена MEFV в гетерозиготном и гомозиготном состоянии

Клинические проявления	Гетерозиготы по мутации M680I (363)		Гомозиготы по мутации M680I (356)			
	n	%	n	%	χ2	p
Лихорадка	209	57.8	293	82.3	62.2	0.001
Перитонит	242	66.6	289	81.2	24.1	0.001
Плеврит	113	31.2	200	56.2	59.7	0.001
Артрит	37	10.2	75	21.1	22.5	0.001
Артралгия	159	43.8	161	45.2	0.2	0.652
Миалгия	63	17.5	96	27.0	12.4	0.001
Кожная сыпь	54	14.8	48	13.5	0.3	0.572

Мутация E148Q: среди обследованных лиц 477 были гетерозиготными носителями и 15 гомозиготами по мутации E148Q.

В связи с редкой встречаемостью мутаций E148Q, P369S, R761H, A744S, K695R, F479L в гетерозиготном состоянии, достоверность результатов рассчитана в сравнении с общей группой пациентов-гетерозигот.

В таблице 7 представлены частоты клинических симптомов у 477 пациентов с ССЛ с мутацией E148Q в гетерозиготном состоянии, у которых чаще регистрируется перитонит (63.1, p<0.001), затем лихорадка (52.2%, p<0.001), реже плеврит (24.1%, p<0.001) и миалгия (16.8%, p=0.000). Поражение суставов в виде острых артритов и хронических артралгий не регистрировалось.

Сравнения с E148Q-гомозиготами не проводились в связи с их малой выборкой из 15 пациентов с ССЛ среди всего контингента больных.

Мутация P369S: описана у 91 пациента с типичной ССЛ с P369S-гетерозиготным генотипом (таблица 7), среди которых приступы сопровождались лихорадкой и перитонитом (58.2%, p<0.001, 68.1%, p=0.050), плевритом (27.5%, p=0.003), артралгией (38.5%); острые артриты и миалгии встречаются сравнительно редко (7.7%, 11% соответственно).

Таблица 7

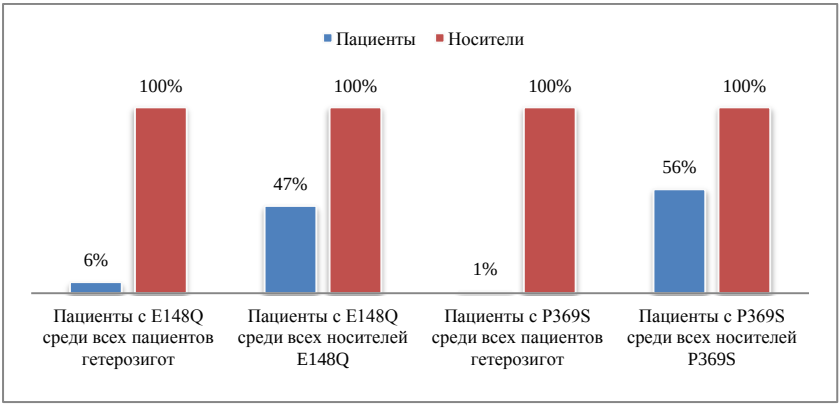
Ассоциации клинических симптомов ССЛ у гетерозиготных носителей мутаций E148Q и P369S гена MEFV

	E148Q		**P369S**	
Клинические проявления	**%**	**p**	**%**	**p**
Лихорадка	52.2	0.001	58.2	0.001
Перитонит	63.1	0.001	68.1	0.050
Плеврит	24.1	0.001	27.5	0.003
Артрит	11.4	0.001	7.7	0.022
Артралгия	43.6	0.197	38.5	0.158
Миалгия	16.8	0.001	11.0	0.003
Кожная сыпь	16.9	0.223	15.4	0.997

Полученные результаы свидетельствуют о патогенном эффекте мутаций E148Q (2 экзон) и P369S (3 экзон) у армянских больных, которые в иных популяциях считаются полиморфизмами. На графике 3 показан риск развития ССЛ среди носителей мутаций E148Q и P369S в гетерозиготном состоянии. Риск развития ССЛ у носителей мутации E148Q состовляет 6% среди всех пациентов гетерозигот и 47% среди всех носителей мутации E148Q. Для носителей мутации P369S риск развития ССЛ среди всех пациентов гетерозигот состовляет 1%, а среди всех носителей мутации P369S 56%.

График 3

Риск развития ССЛ среди носителей одной мутации E148Q и P369S



Мутация R761H в гетерозиготном состоянии обнаружена у 166 пациентов с ССЛ с регулярными приступами лихорадки и перитонита (49.4%, p=0.001; 57.2%, p=0.001), плевритом (23.5%, p=0.001), артралгией (38.0%); острые артриты наблюдались у 12.7%, а миалгия - у 19.5% пациентов.

Мутация F479L в гетерозиготном состоянии обнаружена у 114 пациентов с ССЛ: самыми частыми симптомами явились перитонит и лихорадка (62.3%, p=0.001; 56.1%, p=0.001), плеврит (24.6%, p=0.001), миалгии (15.8%, p=0.032).

Результаты клинических и генетических исследований приводятся в таблице 8.

Мутации A744S, K695R: в гетерозиготном и гомозиготном состояниях встречаются достаточно редко, а именно: мутация K695R- у 27; мутация A744S- у 78 пациентов с ССЛ.

Таблица 8

Ассоциации клинических симптомов ССЛ у гетерозиготных носителей мутаций R761H и F479L гена MEFV

	R761H		**F479L**	
Клинические проявления	**%**	**p**	**%**	**p**
Лихорадка	49.4	0.001	56.1	0.001
Перитонит	57.2	0.001	62.3	0.001
Плеврит	23.5	0.001	24.6	0.001
Артрит	12.7	0.171	12.3	0.215
Артралгия	38.0	0.040	38.6	0.119
Миалгия	19.3	0.124	15.8	0.032
Кожная сыпь	19.9	0.106	14.9	0.892

Ассоциация степени тяжести клинических симптомов с гомозиготными, компаунд-гетерозиготными и гетерозиготными генотипами приводится в обобщенной таблице 9. У гетерозиготных носителей мутаций гена MEFV отмечена клиническая картина средней тяжести (60.5%; p=0.001) и легкое течение в 7.9% случаев (p=0.001), а тяжелая форма встречалась у 31.6% пациентов (p=0.001). Тяжелое течение ССЛ ассоциируется с гомозиготными генотипами (79.3%; p=0.021), несколько реже - с компаунд-гетерозиготными генотипами (66.7%; p=0.035). Болезнь средней тяжести ассоциируется с компаунд-гетерозиготными (28.9%; p=0.035), реже - с гомозиготными генотипами (20.7%; p=0.021). Болезнь в легкой форме отмечена у 4.4% компаунд-гетерозигот (p=0.035) и не отмечена угомозигот (0.0%; p=0.021).

Таблица 9

Корреляция между генотипами и степенью тяжести ССЛ

Генотип	Степень тяжести*			p
	Легкая (%)	Средняя (%)	Тяжелая (%)	
Гетерозиготы	7.9	60.5	31.6	0.001
Гомозиготы	0.0	20.7	79.3	0.021
Комп. гетерозиготы	4.4	28.9	66.7	0.035

*Степень тяжести ССЛ по критерию Tel-Hashomer.

Изучена зависимость эффекта дозы назначаемого колхицина от генотипа больных методом статистического анализа сравнения средних значений (t-тест). В результате были получены статистически достоверные ассоциации вышеуказанных параметров (таблица 10).

Таблица 10

Ассоциация генотипов ССЛ и эффективной дозы колхицина (N=166)

Генотип	Эффективная доза колхицина	СО	p
Гетерозиготы	1.2	±0.4	0.009
Гомозиготы	1.5	±0.3	0.027
Комп. гетерозигот	1.4	±0.3	0.025

Показана взаимосвязь выраженности хронического воспалительного процесса с наличием одной или двух мутаций гена MEFV. Как видно из таблицы 11, у гетерозиготных носителей уровень С-реактивного белка (CRP), как одного из основных показателей воспалительного процесса, был повышен более чем в 10 раз (5.88±6.94; p=0.001) по сравнению с нормой (0-0.5 мг/дл), а угомозигот и компаунд-гетерозигот данный показатель превышает норму в более чем 20 раз (12.75±12.7; p=0.001).

Таблица 11

Ассоциация генотипов ССЛ и воспалительного ответа

Генотип	С-реактивный белок (мг/дл)	СО	p
Носителиодноймутации (гетерозиготы)	5.88	±6.94	0.001
2 мутации(гомозиготы и компаунд-гетерозиготы)	12.75	±12.74	0.001

Клинико-лабораторные показатели у гетерозигот с клинический картиной ССЛ свидетельствуют о хроническом воспалительном процессе, что требует безотлагательного назначения своевременного лечения колхицином и мониторинга за состоянием пациентов.

Ассоциации клинико-генетических параметров изучены у 710 больных из 357 неродственных семей. В 146 семьях отмечено 297 сибсов в одном поколении. В 211 семьях болезнь была унаследована 413 пациентами во 2-м и 3-м поколениях, среди которых у 61 гетерозиготного носителя с клиникой ССЛ в 40 семьях, отмечен псевдо-доминантный тип наследования (18.9%). Аутосомно-рецессивный тип наследования ССЛ среди армян составляет 81.1 %. Результаты приводятся на графике 4 .

График 4
Результаты анализа семейных случаев ССЛ

Распределение мутаций, наследуемых по псевдо-доминантному типу, приведены на графике 5. На рисунке 1 представлены примеры родословных.

График 5
Примеры псевдо-доминантного наследования ССЛ в 40 семьях

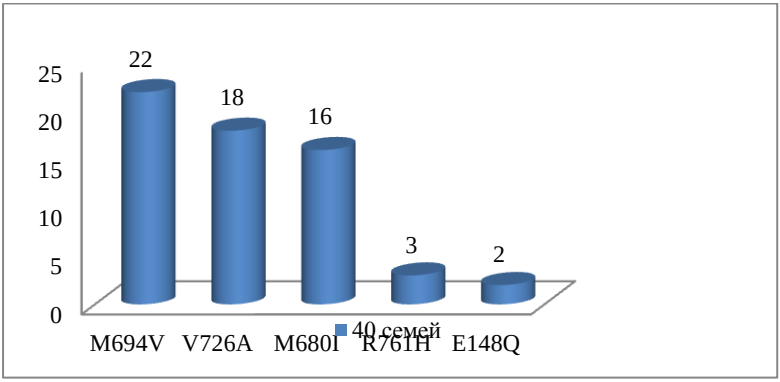
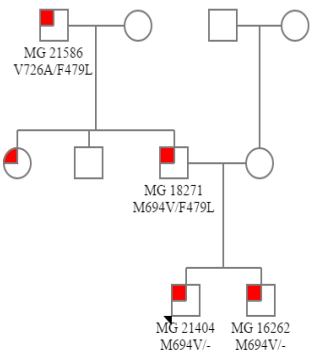
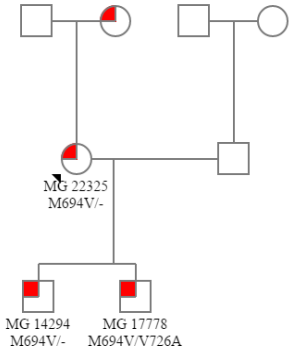


Рисунок 1

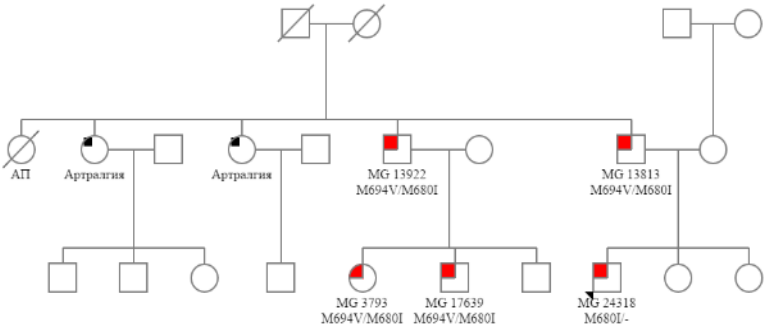
Примеры родословных с псевдо-доминантым типом наследования



1.



2.



3.

Учитывая роль в развитии клинических симптомов при влиянии гена-модификатора, исследованы ассоциации с мутациями основного гена MEFV, параллельно с генотипами гена SAA1, являющихся генетическим фактором риска развития осложнений заболевания. Из 1017 пациентов с клинической картиной ССЛ, не имеющих семейных связей, с мутациями генов MEFV и SAA1, у 44-х был установлен диагноз АП, потвержденный после биопсии почек. У 68-и пациентов была выявлена протеинурия (150 мг/24 час). У 831 пациента без протеинурии и АП были генотипированы полиморфные аллели SAA1; 34 пациента с клинической картиной ССЛ без мутаций гена MEFV.ГенотипыSAA1 распределились со следующей частотой: α/β (47.4%), β/β (32.0%), α/α (16.9%), γ /β (2.9%) ; α/γ (0.9%) (таблица 12).

Таблица 12

Характеристики 1017 пациентов включенных в исследование

N=1017		n	%
ГенотипыSAA	α/β	482	47.4
	β/β	325	32.0
	α/α	172	16.9
	γ /β	29	2.9
	α/γ	9	0.9

Таблица 13

Ассоциации между разными клиническими проявлениями ССЛ и полиморфизмами аллелейгена SAA1

Клинические симптомы ССЛ	Полиморфизмы аллелей гена SAA1							
	α/α (n=172)		α/β (n=482)		β/β (n=325)		β/γ (n=29)	
	ОР	p	ОР	p	ОР	p	ОР	P
Лихорадка	1.155	0.438	0.990	0.940	0.933	0.634	1.150	0.740
Перитонит	1.071	0.701	0.935	0.612	1.180	0.253	0.523	0.081
Плеврит	0.911	0.616	0.856	0.260	1.216	0.178	1.478	0.312
Артралгия	0.884	0.477	1.014	0.913	1.123	0.398	0.817	0.610
Артрит	1.114	0.640	1.028	0.879	0.919	0.662	1.231	0.677
Миалгия	1.231	0.285	1.156	0.338	0.756	0.095	0.926	0.129
Кожнаясыпь	-	-	0.986	0.978	1.915	0.178	2.170	0.449
Протеинурия	1.428	0.241	0.868	0.575	0.948	0.844	1.035	0.963
АП	**6.057**	**0.001**	**0.504**	**0.034**	**0.324**	**0.008**	0.785	0.814

Нами не выявлены статистически достоверные ассоциации полиморфизмов аллелей гена SAA1 сосновымиклиническими симптомами ССЛ, что отображено в таблице 13. Исключение составили пациенты с гомозиготным генотипом SAA1 α/α с достоверно высоким риском развития АП (ОР = 6.057; p = 0.001) в отличие от лиц с гомозиготным генотипом SAA1 β/β, обладающим достоверным протекторным эффектом (ОР = 0.324; p = 0.008).

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что около 20,0% больных ССЛ являются гетерозиготными носителями мутаций гена MEFV с более легкими и средне-тяжелыми фенотипами без осложнений. Тяжелые клинические формы ССЛ ассоциируются с гомозиготными и компаунд-гетерозиготными генотипами.
2. Выявлены достоверные различия в клиническом течении заболевания между гетерозиготными и гомозиготными генотипами по каждой мутации. Мутации

P369S (3 экзон) и E148Q (2 экзон), считающиеся в иных популяциях полиморфизмами, являются патогенными у армянских больных ССЛ.

3. Показана эффективность назначения колхицина пациентам с гетерозиготным генотипом на основании клинических симптомов. Рекомендуется средняя оптимальная доза колхицина для купирования атак у больных ССЛ с одной мутацией.
4. Ген SAA1 обладает модифицирующим эффектом на течение ССЛ, увеличивая риск развития амилоидоза. Среди 1017 пациентов с мутациями гена-модификатора SAA1 подтвержден α-гомозиготный генотип, определяющий фенотип амилоида А. β-гомозиготный генотип обладал протекторным эффектом в отношении развития АП.
5. Разработана компьютерная программа “New Builder”, на основании которой создан первый регистр аутовоспалительных заболеваний в Армении, показана достоверная корреляция клинических проявлений с разными генотипами гена MEFV, подтверждены аутосомно-рецессивный (81.1%) и псевдо-доминантный (18.9%) типы наследования ССЛ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты проведенного клинического и молекулярно-генетического исследования должны быть реализованы в клинической практике. Показана достоверность и специфичность генетической диагностики аутовоспалительного заболевания. Изучение патогенеза ССЛ на молекулярном уровне раскрывает многие вопросы, связанные с клинической гетерогенностью заболевания, хроническим воспалением и разной экспрессией мутантных генов, что имеет важнейшее значение для практических врачей.
2. Высокую прогностическую значимость имеют генотипы с разным спектром мутаций, способствующие развитию легких или тяжелых фенотипов с осложнениями. У армян патогенным эффектом обладают “легкие” мутации E148Q и P369S.
3. Важным для клиницистов, сталкивающихся с трудностями, связанными со случаями с типичной клиникой и анамнезом при гетерозиготном носительстве мутаций, является вывод о том, что около 20% больных ССЛ являются гетерозиготами с легкими и средне-тяжелыми фенотипами, требующих назначения средних доз колхицина.
4. Помимо основного гена MEFV, мутации которого имеют важнейшее значение в развитии клинических симптомов ССЛ, на проявление хронических воспалительных процессов влияют модифицирующие полиморфные аллели SAA1.
5. Генетическое консультирование родителей с мутациями гена MEFV позволяет информировать их о риске передачи заболевания потомству. При

своевременной постановке диагноза и назначении лечения прогноз ССЛ благоприятен.

ОПУБЛИКОВАННЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Назаретян Э.Е., Атоян С.А. “Клинические проявления ССЛ среди носителей гетерозиготных мутаций гена MEFV” // Медицинская наука Армении, Ереван, 2015, 55 (2). стр. 107-113. ISSN 0514-7484
2. Назаретян Э.Е., Джндоян З.Т., Атоян С.А. “Различия клинического течения и лечения семейной средиземноморской лихорадки у пациентов с одной и двумя мутациями гена MEFV” // Научно-Медицинский журнал, Ереван, 2016; 11:1, стр. 20 – 26, ISSN1829-0418
3. Атоян С.А “Семейная Средиземноморская лихорадка: современные представления” // Медицинская Генетика, Москва, 2016;15;3, стр. 3 – 11, ISSN 2073-7998
4. Атоян С.А. “Различия клинического течения семейной средиземноморской лихорадки у пациентов с ранним и поздним началом болезни” // Вопросы теоретической и клинической медицины Научно-практический журнал, Ереван, том 19, 5, (108), 2016, стр. 39-41.
5. H.S. Hayrapetyan, T.F. Sarkisian, S.A. Atoyan, “Risk of FMF development among heterozygous patients in Armenian population” // Proceedings of the Yerevan State University, *Chemical and Biological Sciences*, Yerevan, 3.2016; p. 48-52.
6. Айрапетян А.С., Саркисян Т.Ф., Атоян С.А. “Сравнительная характеристика фенотипов с генотипами у гетерозиготных носителей мутаций гена MEFV с гомозиготами по тем же мутациям” // Медицинскаягенетика, Москва, 2016;15;10, стр. 77 – 81. ISSN 2073-7998
7. S. Atoyan, H. Hayrapetyan, T. Sarkisian, E. Ben-Chetrit “MEFV and SAA1 genotype associations with clinical features of FMF and amyloidosis in Armenia” //Clinical and Experimental Rheumatology, Pisa, 2016; 34; 102(6):72-76.PMID: 27791951 [PubMed]

ՍՏԵՓԱՆ ԱՐՄԵՆԻ ԱԹՈՅԱՆ
ԿԼԻՆԻԿԱԿԱՆ ԴՐՍԵՎՈՐՈՒՄՆԵՐԻ ԵՎ MEFV ՈՒ SAA1 ԳԵՆԵՐԻ ՄՈՒՏԱՑԻԱՆԵՐԻ ՄԻՋԵՎ ԱՍՈՑԻԱՑԻԱՆ ՀԱՅԱՍՏԱՆՈՒՄ ԸՆՏԱՆԵԿԱՆ ՄԻՋԵՐԿՐԱԾՈՎՅԱՆ ՏԵՆԴՈՎ ՀԻՎԱՆԴՆԵՐԻ ՄՈՏ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Ընտանեկան միջերկրածովյան տենդը (ԸՄՏ) հանդիսանում է ընտանեկան պարբերական տենդերի առավել հաճախ հանդիպող տեսակը, ինչը մեծ հաճախականությամբ գրանցվում է հայկական ազգաբնակչության մեջ ևս: ԸՄՏ բնութագրվում է պարբերաբար կրկնվող տենդի և տարբեր տեղակայման սերոզիտների նոպաներով: ԸՄՏ-ը համարվում է աուտոսոմ ռեցեսիվ ժառանգվող հիվանդություն, ինչը ենթադրում է առնվազն երկու մուտանտ ալելի առկայություն մեկ անհատի մոտ հիվանդության զարգացման համար: Վերջին շրջանում, սակայն, գրականության մեջ հանդիպում են տվյալներ հիվանդության զարգացման մասին նույնիսկ մեկ մուտացիա կրողների շրջանում, ինչը թույլ է տալիս մտածել հիվանդության ժառանգման պսևդոդոմինանտ ձևի մասին և առաջարկում է նորովի մեկնաբանել և ուսումնասիրել կլինիկական դրսևորումների առանձնահատկությունները և ժառանգման օրինաչափությունները:

Սույն աշխատանքի նպատակն է հանդիսացել ԸՄՏ կլինիկական առանձանհատկությունների հետազոտության կլինիկա-գենետիկական և մեթոդական սկզբունքների մշակումը կախված գենային մուտացիաների տեսակից, ինչը թույլ կտա ազգաբնակչությանը տրամադրել առավել արդյունավետ բժշկական օգնություն:

Նպատակը իրականացնելու համար առաջադրվել են խնդիրներ՝ կլինիկական հետազոտության ժամանակ ԸՄՏ կասկածով հիվանդների մոտ իրականացնել ԴՆԹ-ախտորոշում և որոշել գենային մուտացիաների տեսակները, ուսումնասիրել հետերոզիգոտ հիվանդների մոտ հիվանդության կլինիկական դրսևորման առանձնահատկությունները և համեմատել դրանք հոմոզիգոտ և կոմպաունդ-հետերոզիգոտ հիվանդերի կլինիկական դրսևրումների հետ, որոշել մուտացիաների ժառանգման տիպը հաստատված ախտորոշմամբ հետերոզիգոտ հիվանդների մոտ՝ նրանց ընտանիքներում գենետիկական ռիսկի հետագա գնահատմամբ բժշկա-գենետիկական խորհրդատվության ժամանակ, գնահատել SAA1 մոդիֆիկացնող գենի ազդեցությունը պաթոլոգիական գործընթացների վրա, ստեղծել ԸՄՏ և այլ աուտոբորբոքային հիվանդությունների գրանցման ռեգիստր

Աշխատանքի շրջանակներում ռետրոսպեկտիվ ուսումնասիրվել են «Բժշկական գենետիկայի և առողջության առաջնային պահպանման կենտրոն»-ի 17669 գենետիկորեն հաստատված հիվանդության դեպքեր, ինչպես նաև առանձին,

պրոսպեկտիվ ուսումնասիրվել են «Քանաքեռ-Զեյթուն» ԲԿ-ի և «Հերացի» ու «Մուրացան» համալսարանական կլինիկաների թերապևտիկ բաժանմունքների ստացիոնար բուժում ստացող 166 հիվանդների տվյալներ: Հիվանդների կլինիկական հետազոտությունը իրականացվել է Tel-Hashomer (Livneh et al., 1997) չափանիշներին համաձայն: Վերջնական ախտորոշումը դրվել է մոլեկուլային-գենետիկական հետազոտությունից հետո:

Աշխատանքի արդյունքում առաջին անգամ ուսումնասիրվել է հետերոզիգոտ մուտացիաների կրողների կլինիկաան արտահայտությունների առանձանհատկությունները և դրանց համեմատական վերլուծությունը նույն մուտացիաների հոմոզիգոտ կրողների հետ: Արդյունքում պարզվել է հատկապես E148Q և P369S մուտացիաների պաթոգենությունը հայակական ազգաբնակչության համար, որոնք այլ ազգերի մոտ համարվում են ոչ պաթոգեն պոլիմորֆիզմի ձևեր: Հաշվարկվել է հիվանդության բուժման համար ներկայումս կիրառվող կոլխիցին դեղամիջոցի միջին արդյունավետ դեղաչափը հետերոզիգոտների համար (1.2±0.4): Առաջին անգամ ուսումնասիրվել է MEFV գենի մուտացիաների ժառանգման պսևդոդոմինանտ ձևերի հավանականությունը հայերի մոտ (18.9%), ինչպես նաև ցուցադրվել է SAA1 մոդիֆիկացնող գենի β/β գենոտիպի պաշտպանական դերը երիկամների ամիլոիդոզի զարգացման գործընթացում: Առաջին անգամ ստեղծվել է գենետիկական և կլինիկական ռեգիստր, որը ներառում է տեղեկություն հիվանդների էթնիկ ծագման, կլինիկական ախտանիշների, լաբորատոր տվյալների, ինչպես նաև ընտանեկան ձևերի մասին:

Հետազոտության արդյունքներից ելնելով՝ գենետիկական խորհրդատվության ժամանակ բժիշկները պետք է հաշվի առնեն E148Q և P369S մուտացիաների պաթոգենությունը հայկական ազգաբնակչության համար, ինչպես նաև հետերոզիգոտների մոտ հիվանդության դրսևորման բարձր (20.7%) հավանականությունը և կոլխիցինի նշանակման անհրաժեշտությունը կլինիկապես արտահայտված դեպքերում: Կարևոր է նշել նաև SAA1 մոդիֆիկացնող գենի β/β պոլիմորֆիզմի պաշտպանական դերը երիկամների ամիլոիդոզի զարգացման գործընթացում:

STEPAN ATOYAN

ASSOCIATION BETWEEN CLINICAL MANIFESTATIONS AND MEFV AND SAA1 GENES MUTATIONS AMONG ARMENIAN PATIENTS WITH FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER

SUMMARY

Familial Mediterranean fever (FMF) is considered to be the most frequent disorder from the family of hereditary periodic fevers, which is very common among Armenian population. The modern understanding of the disease pathogenesis is defined FMF as genetic autoinflamamtory disease with the recurrent self-limited attacks of fever and polyserosites of the different localizations, including peritonitis, pleuritis (rarely pericarditis), and arthritis. Myalgia and erysipelas-like skin rash are also considered as clinical features of FMF. The most severe complication of FMF is amyloidosis, basically with the development of renal amyloidosis.

Before the description of exact gene responsible for FMF development, the diagnosis was made based on the clinical manifestations of the disease. The new wave of FMF studying starts especially after discovering the MEFV gene, which is responsible for FMF in 1996. The molecular-genetic diagnosis of FMF in Armenia is conducted in the Center of Medical Genetics and Primary Health Care (CMG), where more than 28.000 individuals have been studied since 1997, which is the biggest group of tested individuals in the world

FMF is a disease with autosome-recessive way of inheritance, which supposes presence of two mutant alleles for the developing of the disease. In course of time clinical manifestations and the associations between clinical picture and different genotypes were studied, as well as identified the most frequent genotypes among Armenians. Recently, however, there is information in the literature about developing of FMF among heterozygous carriers of MEFV gene mutation, which brings to the idea that there is a possibility of autosome-dominant inheritance. The aforementioned ideas let researchers to newly study and interpret the clinical features and inheritance patterns of FMF.

The aim of the current study is the establishment of proper clinical-genetic and methodological procedures by taking into account the particular genetic mutations for the provision of the efficient medical service to the population.

The following objectives were proposed for the achievement of the aim: to conduct DNA-diagnosis among patients with clinically suspected cases of FMF and determine the mutations for the particular case; to examine clinical features of FMF among heterozygous patients and compare those with the clinical features of homozygous and compound-heterozygous patients taking into consideration the genetic and laboratory data; to determine the inheritance type of MEFV gene mutations among heterozygous patients with confirmed diagnosis of FMF with the following genetic risk assessment in their families during medical-genetic consultations; to evaluate SAA1 modifying gene influence on the pathological process and to determine its possible effect on the development of the complications of FMF; to design the genetic register for FMF and other autoinflammatory diseases.

In the frame of the study, the 17669 of genetically confirmed cases of FMF studied in the Center of Medical Genetics (CMG) were retrospectively studied. Separately clinical and laboratory data of 166 patients from “Kanaker-Zeytun”, “Heratsi”, and “Muratsan” medical centers were collected and prospectively analyzed.

The clinical examination of the patients was conducted in accordance with Tel-Hashomer (Livneh et al., 1997) diagnostic criteria. Diagnoses were confirmed by the molecular-genetic testing.

There was conducted a complex analysis of clinical and genetic data of big group of patients (1997-2016). There was designed a genetic register for autoinflammatory disease for the first time, which includes information on clinical, genetic, laboratory, ethnic and familial data.

In the frame of this study there was investigated the clinical picture of heterozygous patients in Armenian population and conducted the comparative analysis with homozygous patients for the same mutations. As result there was shown that E148Q and P369S mutations are considered to be pathogenic for Armenian population while for other populations there are considered as types of polymorphisms.

Accordingly there was calculated the average efficient dosage of colchicine for heterozygous patients. As result of study of the types of inheritance of MEFV gene mutations there was proven a high percentage (18.9%) of pseudo-dominant ways of inheritance in Armenian population for the first time. Also there was shown a protective effect of β/β genotype of SAA1 gene in terms of developing of renal amyloidosis.

The results of the study recommend to the general practitioners and other specialist to take into consideration the pathogenic effects of E148Q and P369S mutations for the Armenian population, as well as the less severe clinical course of the disease for heterozygous patients.

It is important also to highlight the high risk (20.7%) of developing FMF among heterozygous patients and the need of colchicine prescription to heterozygous patients with clinical features of the disease. Another important point that clinicians should take into consideration during the medical-genetic consultations of the patients and their families is the protective effect of SAA1 gene β/β genotype on the development of renal amyloydosis.