

На правах рукописи

**ЛЫСОГОРСКАЯ ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА**

**КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА  
В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ**

14.01.11 – Нервные болезни

03.02.07 – Генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Москва 2013**

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении  
«Научный центр неврологии» Российской академии медицинских наук**

**Научные руководители:**

Доктор медицинских наук

**Захарова Мария Николаевна**

Доктор медицинских наук, профессор

**Иллариошкин Сергей Николаевич**

**Официальные оппоненты:**

**Бойко Алексей Николаевич**, доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии и нейрохирургии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный внештатный специалист-невролог Департамента здравоохранения г.Москвы

**Сломинский Петр Андреевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики наследственных болезней Института молекулярной генетики Российской академии наук

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского

Защита диссертации состоится «29» октября 2013 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.006.01 при ФГБУ «НЦН» РАМН по адресу: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НЦН» РАМН по адресу: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 001.006. 01,  
кандидат медицинских наук

Гнедовская Е.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Боковой амиотрофический склероз (БАС) является неуклонно прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием неустановленной этиологии. Оно связано с поражением двигательных нейронов коры головного мозга, ствола и передних рогов спинного мозга, что сопровождается развитием параличей и гибелью пациентов от нарушения дыхательных и бульбарных функций в течение 2–5 лет от момента дебюта симптомов (Завалишин, 2009; Smith, 1992). Неблагоприятное фатальное течение БАС, сложность диагностики и рост заболеваемости в молодом возрасте (Васильев, 2008) обуславливают высокое внимание исследователей к вопросам этиологии и патогенеза болезни. Выявление причин избирательной гибели двигательных нейронов при БАС является одной из приоритетных задач, стоящих перед исследователями.

К настоящему времени отсутствует однозначная концепция, объясняющая природу БАС. Согласно современным представлениям, его можно отнести к группе мультифакторных болезней (Лимборская, 2005; Brown et al., 2005). Общая модель причин возникновения таких заболеваний включает взаимодействие генетических, эпигенетических, средовых (семейных и популяционных) и стохастических (случайных) факторов. Среди факторов риска развития БАС к настоящему времени доказанными являются мужской пол и возраст старше 50 лет (Завалишин, 2009). Кроме того, исследовалось действие таких внешнесредовых факторов, как контакт с пестицидами, тяжелыми и редкоземельными металлами, растворителями и пластмассами, электротравма, механическая травма и др. (Скворцова, 2009; Brown, Lockwood, 2005).

В подавляющем большинстве случаев БАС является спорадическим заболеванием, и лишь 5-10% пациентов имеют положительный семейный анамнез (Иллариошкин, 2007; Andersen, Al-Chalabi, 2011). В семейных случаях развитие БАС связано с мутациями в одном из 18 описанных к настоящему времени генетических локусов. При спорадической форме заболевания большое значение придается модифицирующему влиянию множества генов на риск развития и фенотипические проявления БАС. Генетические исследования БАС широко проводятся во всем мире, позволяя уточнить патогенетические механизмы развития заболевания и определить круг потенциальных «мишеней» для разработки клеточной и генной терапии (Miller, Mitchell, 2007; Mackenzie, Rademakers, 2010; Brown, Min, 2012).

В российской популяции изучение генетических факторов при БАС было начато

около 10 лет назад (Скворцова и др., 2003; Лимборская и др., 2006): исследователями был оценен вклад генов *SOD1*, *NEFH* и генов детоксикации в развитие БАС на небольшой выборке пациентов. В настоящее время в связи с открытием большого числа новых генов и совершенствованием технологий мутационного скрининга исследования молекулярных основ БАС вышли на качественно новый уровень.

**Цель исследования:** клинический и молекулярно-генетический анализ семейных и спорадических случаев БАС в российской популяции, с выявлением мутаций и предрасполагающих полиморфизмов в кандидатных генах, установлением соотношения конкретных генетических вариантов БАС в России и проведением клинико-генетических сопоставлений.

**Задачи исследования:**

1. Изучить частоту встречаемости и спектр клинических проявлений семейной формы БАС в сопоставлении со спорадической формой заболевания.
2. Провести мутационный скрининг генов *SOD1*, *TARDBP*, *ANG* в группе российских пациентов с семейными и спорадическими случаями БАС и оценить вариабельность неврологической картины отдельных молекулярных форм заболевания в российской популяции.
3. Исследовать взаимосвязь развития заболевания у российских пациентов с характеристиками тандемных тринуклеотидных  $(CAG)_n$  повторов в гене *ATXN2*.
4. Провести анализ ассоциаций БАС у российских пациентов с генами *VEGF* и *APOE*, оценить вклад полиморфных аллелей данных генов в формирование риска развития заболевания.
5. Изучить ассоциации генов *ATXN2*, *VEGF* и *APOE* с клиническими особенностями заболевания (формой, возрастом дебюта, характером течения БАС), оценить прогностическое значение носительства конкретных аллелей генов риска.
6. На основании результатов молекулярного моделирования и анализа мутаций и полиморфизмов в ряде кандидатных генов уточнить роль генетических факторов в патогенезе БАС.

**Научная новизна**

Впервые проведено комплексное клинико-генетическое исследование на обширной когорте российских пациентов с БАС. Проведена оценка частоты и спектра мутаций в генах *SOD1*, *TARDBP*, *ANG* при спорадической и семейной формах БАС, у

российских пациентов установлено преимущественное вовлечение в патогенез БАС генов *SOD1* и *ANG*. Определено прогностическое значение носительства конкретных аллелей генов *ATXN2*, *VEGF* и *APOE* в формировании риска развития заболевания. Впервые для анализа молекулярных основ БАС в российской группе пациентов применен метод молекулярного моделирования, показавший при выявленных мутациях в гене *SOD1* ведущую роль понижения энергии мутантного белка, что может служить дополнительным подтверждением принадлежности БАС к группе конформационных болезней.

### **Практическая значимость работы**

Установлена частота семейной формы БАС в российской популяции (4,3%) и ее фенотипические особенности по сравнению со спорадическими случаями (более раннее начало симптомов). Показан широкий полиморфизм клинических проявлений БАС в рамках конкретных генетических вариантов болезни, что необходимо учитывать в диагностике БАС и при проведении медико-генетического консультирования отягощенных семей. Установленные разнообразные клиничко-генетические ассоциации позволяют предложить дополнительные прогностические критерии течения заболевания. Полученные результаты уточняют место генетического исследования в диагностическом алгоритме при БАС.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Впервые в ходе комплексного клиничко-генетического исследование в группе из 199 пациентов со спорадической и 9 пациентов с семейной формами БАС проанализирован вклад генов *SOD1*, *TARDBP*, *ANG*, *ATXN2*, *VEGF* и *APOE* в развитие данного заболевания в российской популяции.

2. Обследованная выборка пациентов с БАС характеризуется следующими особенностями: большой вариабельностью клинических проявлений болезни, дебютом семейного БАС в молодом возрасте с преобладанием спинального уровня поражения, преобладанием мутаций в гене *SOD1* при семейной форме заболевания и наличием мутаций в генах *SOD1* и *ANG* при спорадической форме, отсутствием мутаций в гене *TARDBP* как при спорадическом, так и при семейном БАС.

3. В российской популяции шанс развития БАС статистически значимо возрастает при носительстве определенных рисков аллелей генов *VEGF* и *ATXN2*.

4. Метод молекулярного моделирования является важным исследовательским

инструментом, позволяющим определить патогенетическую роль конформационных изменений мутантных белков в механизмах гибели мотонейронов при БАС.

Диссертационное исследование «Клинико-генетический анализ бокового амиотрофического склероза в российской популяции» одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НЦН» РАМН. Протокол № 3/11 от 09.03.11г.

**Апробация работы:** диссертация апробирована и рекомендована к защите на совместном собрании научных сотрудников неврологических отделений, отделения реанимации и интенсивной терапии, научно-консультативного отделения, отделения лучевой диагностики, лаборатории ультразвуковых исследований, ДНК-лаборатории ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН 11 июня 2013 года.

Материалы диссертации были представлены на: 7<sup>th</sup> European ALS Congress - Research Workshop and Young Investigators Meeting (Turin, 2009); VI съезде Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010); Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные нейродегенеративные заболевания XXI века» (Санкт-Петербург, 2010); X Всероссийском съезде неврологов (Нижний Новгород, 2012); 16<sup>th</sup> Congress of the EFNS (Stockholm, 2012); II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012); конференции общества специалистов по нервно-мышечным болезням «Актуальные вопросы диагностики и лечения нервно-мышечных болезней» (Москва, 2012); Всероссийской научной конференции молодых ученых-медиков «Инновационные технологии в медицине XII века» (Москва, 2012); конференции молодых ученых ФГБУ «НЦН» РАМН (Москва, 2013); 5<sup>th</sup> Conference on Advances in Molecular Mechanisms Underlying Neurological Disorders (Bath, 2013).

**Публикации:** по материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 5 публикаций в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ, включая 1 принятую к печати работу.

**Объем и структура диссертации:** диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, включающих характеристику пациентов, изложение методик молекулярно-генетического анализа и молекулярного моделирования, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов и практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 16 рисунками, 2 диаграммами и 18 таблицами. Библиографический указатель включает в себя 158 источников, из них – 30 отечественных и 128 зарубежных.

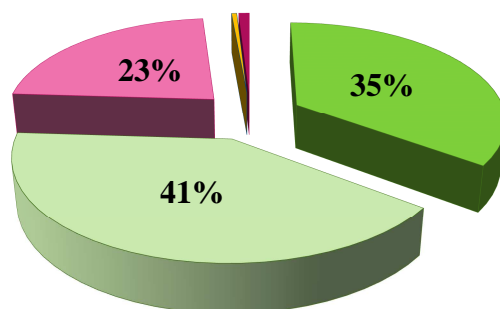
## ОБЪЕМ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Обследованные пациенты и семьи

В исследование были включены 208 пациентов с достоверным или вероятным диагнозом БАС; среди них 99 женщин (47,6%) и 109 мужчин (52,4%). Обследованные лица были преимущественно славянской этнической принадлежности, проживающие в европейской части России. Среди пациентов с БАС были 199 человек со спорадической формой заболевания и 9 пациентов из 8 неродственных семей, страдающих семейной формой БАС. Возраст больных составил от 20 до 83 лет, в среднем 51,5 (41–62) лет. Заболевание было распространено во всех возрастных подгруппах и манифестировало чаще на 5–7 десятилетиях жизни.

В обследованной когорте пациентов встречались все возможные формы БАС (рис.1).

- |                             |                 |
|-----------------------------|-----------------|
| ■ Пояснично-крестцовая      | ■ Шейно-грудная |
| ■ Бульбарная                | ■ Высокая       |
| ■ Первично-генерализованная |                 |



**Рисунок 1.** Диаграмма распределения обследованных пациентов по формам заболевания.

Тяжесть неврологических проявлений БАС определялась при помощи унифицированной международной 48-балльной шкалы ALS FRS-R (revised ALS functional rating scale). Значения шкалы в обследованной группе больных варьировали от 12 до 46 баллов, Me=38 баллов.

Все пациенты были разделены на подгруппы в зависимости от характера прогрессирования патологического процесса. Темп прогрессирования БАС определяется на основании скорости генерализации процесса и нарастания неврологического дефицита, определяемого по шкале ALS FRS-R. Быстрому течению БАС соответствовали генерализация БАС в течение года и/или снижение количества баллов на 10 по шкале ALS FRS-R также в течение года.

## Методы исследования

*Молекулярно-генетический анализ* выполнялся на базе лаборатории ДНК-диагностики V неврологического отделения ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН.

У всех обследованных пациентов проводился однократный забор 10 мл венозной крови, из которой выполнялось выделение геномной ДНК с помощью набора для выделения Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Cat. #A1125).

Молекулярно-генетическое исследование включало полное секвенирование кодирующей области гена *SOD1*, 6-го (наиболее мутирующего) экзона гена *TARDBP*, единственного экзона гена *ANG*, а также исследование частоты tandemных тринуклеотидных (CAG)<sub>n</sub> повторов в гене *ATXN2* и рисков полиморфизмов в генах *VEGF* и *APOE*.

При проведении прямого секвенирования праймеры, фланкирующие изучаемый экзон с прилегающей интронной областью (не менее 100 пар нуклеотидов с каждого конца), выбирали с помощью компьютерной программы «Primer3» и проверяли в программе «Primer-BLAST». Синтез осуществлен в компании «Синтол» (Москва). Анализ нуклеотидных последовательностей проводили на капиллярном генетическом анализаторе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems») с помощью программного обеспечения Data Collection Software версии v3.0, Sequencing Analysis Software версии v5.2 и SeqScape Software версии v2.5. Для уточнения патогенетической значимости найденных интронных точковых мутаций, расположенных в функционально важных регионах генов *TARDBP* и *SOD1*, проводилась оценка частоты их встречаемости методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). В качестве группы контроля использовалось 385 образцов ДНК здоровых лиц.

Типирование полиморфизма -2578C/A (rs699947) в гене *VEGF* выполнялось методом ПЦР-РВ. Полиморфизм E2/E3/E4 в гене *APOE* оценивался методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом. Аллельные варианты *APOE* определялись путем сравнения комбинации фрагментов рестрикции при их электрофоретическом разделении в 3% агарозном геле. Размеры ПЦР-продуктов и фрагментов рестрикции оценивались сравнением их с маркерными фрагментами ДНК pBR50. В качестве группы контроля использовались 149 образцов ДНК лиц славянской этнической группы.

Количество tandemных CAG-повторов в гене *ATXN2* оценивалось методом фрагментного анализа и выполнялось на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 с помощью программного обеспечения Data Collection software версии v3.0. Полученные результаты обрабатывались при помощи программного обеспечения Sequencing Analysis™ v. 5.2. При этом оценивалась частота tandemных повторов в группе больных БАС и в группе



контроля, состоящей из 357 образцов ДНК клинически здоровых лиц.

*Молекулярное моделирование* было выполнено на базе лаборатории функциональной синаптологии Отдела исследований мозга ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН.

С целью анализа патогенетической значимости мутаций в гене *SOD1* выполнялось молекулярное моделирование структуры мутантного белка SOD1. На первом этапе из базы данных SwissProt (<http://www.uniprot.org/>) получены аминокислотные последовательности мышинового и человеческого белков SOD1 (sod\_m и sod\_h). При процедуре выравнивания аминокислотных последовательностей sod\_m и sod, проводимой при помощи программы ClustalW2, был выявлен высокий уровень гомологии двух принадлежащих разным видам животных белков. Из Brookhaven Protein Data Bank были получены координаты структур sod\_m и sod\_h (3GTT и 3ECU, соответственно). При этом доступная кристаллографическая структура sod\_m подробно описывала область активных центров белка, содержащих ионы металлов, чего не отмечалось в доступной по базам данных модели белка sod\_h. Поэтому в качестве шаблона при построении моделей нативного и мутантного белков использовали структуру мышинной молекулы SOD1. С целью поиска оптимальной энергетической конформации модели белка выполнялась процедура Монте-Карло минимизации (МКМ) энергии. Построение модели белка и поиск его минимальной энергетической конформации (МЕК) осуществлялись при помощи компьютерной программы ZMM ([www.zmmsoft.com](http://www.zmmsoft.com)). Минимизация энергии белка осуществлялась в два этапа: первый, с установленными констрейнтами на C-альфа атомы аминокислотных остатков для устранения возможных и практически неизбежных при гомологическом моделировании стерических конфликтов между боковыми цепями аминокислот, и второй – без констрейнтов, в результате чего осуществлялась окончательная минимизация энергии.

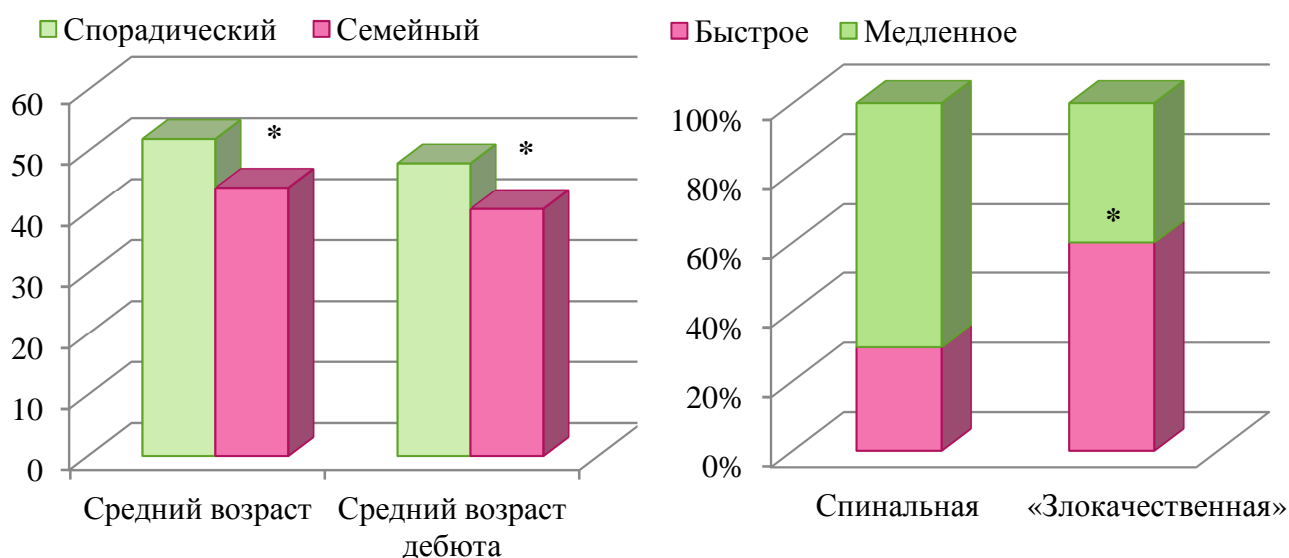
*Статистическая обработка результатов* проводилась с применением программ Microsoft Excel, а также пакета компьютерных прикладных программ Statistica, версия 8.0. При этом применялись следующие методы: методы описательной статистики; непараметрические методы – анализ двух групп по количественному признаку с использованием U-критерия Манн-Уитни; анализ таблиц сопряженности; сопоставление наблюдаемой и ожидаемой частот; анализ отношения шансов (ОШ) с использованием логистической регрессии. Для проведения ROC-анализа использовался он-лайн калькулятор «Simple ROC Curve Analysis» (<http://www.vassarstats.net/roc1.html>), при анализе малых выборок вносилась поправка Йейтса. Данные представлены в виде медианы, 25% и 75% квартилей: Me (25%; 75%). Статистическая достоверность принималась при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Анализ клинических фенотипов БАС в обследованных семейных и спорадических случаях заболевания

Частота семейных случаев БАС в обследованной группе составила 4,3%.

При анализе клинических особенностей семейной и спорадической форм был выявлен меньший возраст пациентов и меньший возраст дебюта БАС у больных, страдающих семейной формой заболевания (рис. 2). У пациентов со спорадическим БАС средний возраст составил 52 (41–62) лет против 44 (29–50) лет в подгруппе пациентов с семейным БАС ( $p=0,0489$ ). Средний возраст дебюта симптомов составил 48 (38–57) лет при спорадическом БАС против 40,5 (37–42) при семейном БАС ( $p=0,014$ ).



**Рисунок 2.** Средний возраста при семейной и спорадической форме БАС.

**Рисунок 3.** Темп прогрессирования при спинальной и «злокачественной» формах.

В обследованных подгруппах отмечался широкий полиморфизм клинических проявлений заболевания. При этом «злокачественные» формы БАС, к которым относили бульбарную, высокую и первично-генерализованную, встречались с приблизительно равной частотой – 23% при спорадическом БАС против 22% при семейном БАС. Темп прогрессирования заболевания также статистически не различался в двух подгруппах, хотя в семейных случаях заболевания чаще наблюдалось медленное течение заболевания – 33,3% против 37,7% при спорадическом БАС ( $p$  Фишера стремится к 1). При этом было отмечено, что быстрый темп прогрессирования значимо чаще встречается при злокачественных формах

БАС ( $\chi^2=10,09$ ,  $p=0,0002$ ) (рис. 3).

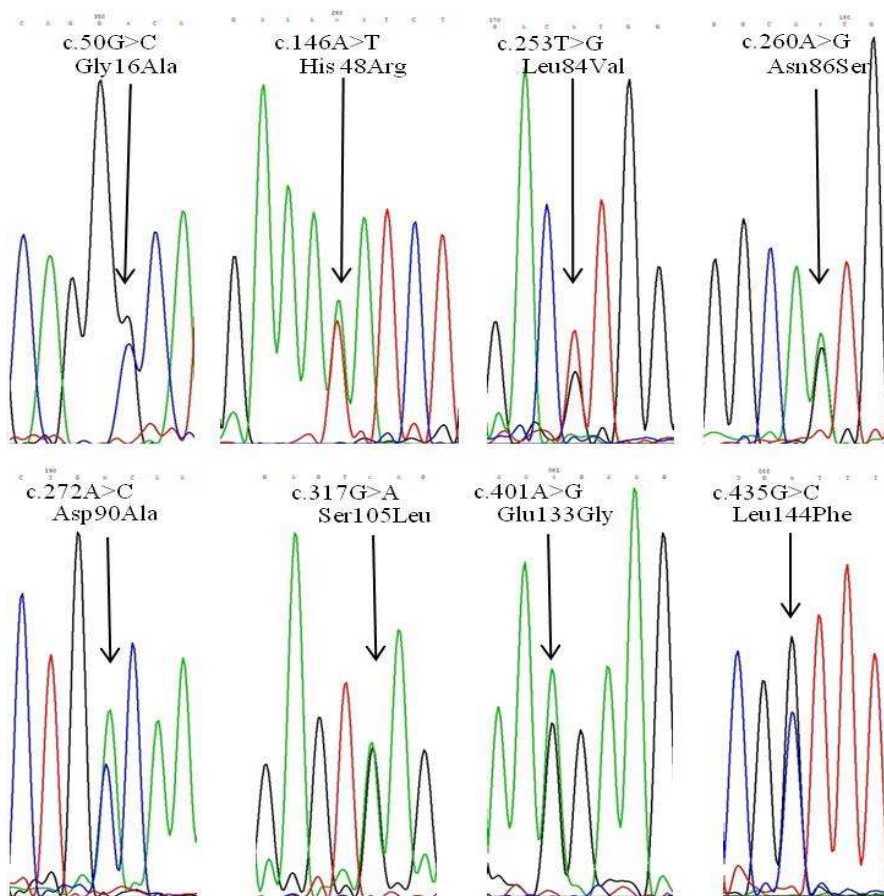
Других клинических различий в подгруппах больных, выделенных в зависимости от пола, возраста, формы заболевания и темпа течения, выявлено не было.

Представленное разнообразие клинических форм заболевания позволяло при проведении молекулярно-генетического анализа рассчитывать на получение результатов, максимально отражающих особенности всего мутационного спектра, свойственного российской популяции пациентов с БАС.

### Результаты молекулярно-генетического исследования

#### Мутации в гене *SOD1*.

При секвенировании *SOD1* в обследованной группе из 208 пациентов выявлено 11 гетерозиготных мутаций у 14 неродственных пациентов с БАС, в том числе 8 мутаций у 10 неродственных пациентов в кодирующей области гена (рис. 4, таб. 1) и 3 мутации у 4 пациентов в некодирующих областях *SOD1* (см. далее – таб.2).



**Рисунок 4.** Обнаруженные кодирующие мутации в гене *SOD1*.

Таким образом, суммарная частота мутаций в гене *SOD1* составила 4,8% с учетом только кодирующих мутаций; она возрастает до 6,7% при учете некодирующих мутаций, возможно, обладающих патогенетической значимостью.

Обнаруженные кодирующие точковые мутации (таб. 1) приводили к следующим аминокислотным заменам в структуре белка *SOD1*: Gly16Ala, His48Arg, Leu84Val, Asn86Ser, Asp90Ala, Ser105Leu, Glu133Gly, Leu144Phe. Самая часто встречающаяся в мире мутация, обуславливающая развитие БАС в других популяциях – Ala4Val – не была обнаружена ни у одного больного БАС в обследованной нами когорте.

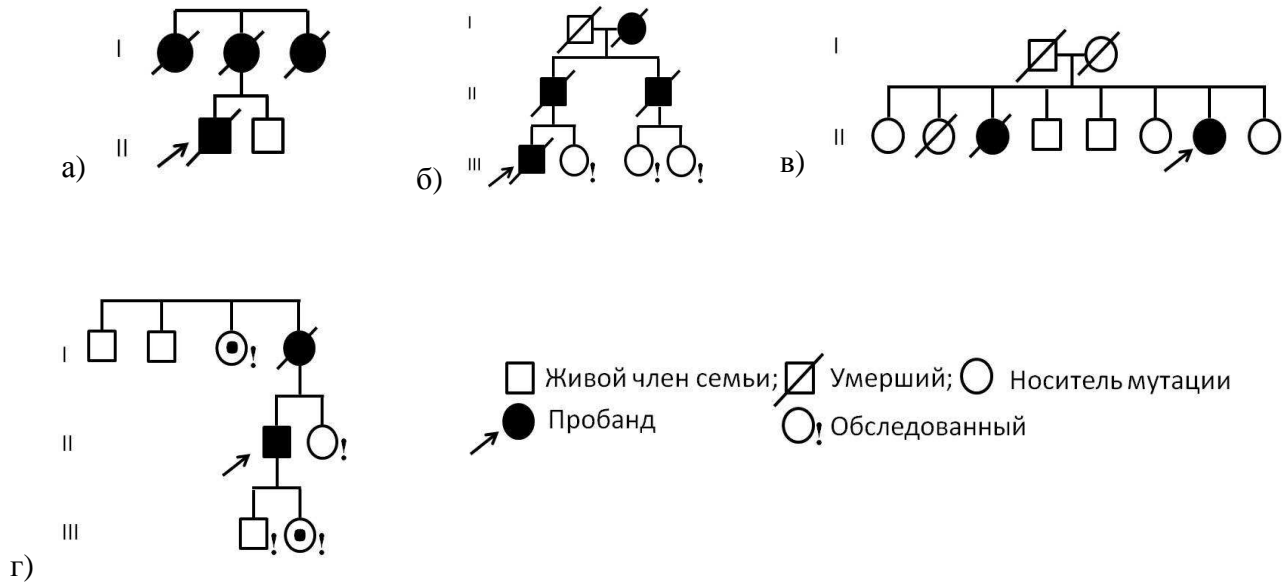
**Таблица 1.** Выявленные кодирующие мутации в гене *SOD1*.

<i>ID</i>	<i>Мутация</i>	<i>rs</i>	<i>Область</i>	<i>Возраст/ пол</i>	<i>Форма заболевания</i>
187	Gly16Ala		1 экзон	31/ж	Шейно-грудная, спорадическая
15	His 48Arg		2 экзон	50/м	Шейно-грудная, спорадическая
120	Leu84Val	rs121912452	4 экзон	39/м	Бульбарная, семейная
145	Leu84Val	rs121912452	4 экзон	29/м	Шейно-грудная, семейная
155	Asn86Ser	rs1556620	4 экзон	54/ж	Шейно-грудная, спорадическая
224	Asn86Ser	rs1556620	4 экзон	50/ж	Пояснично-крестцовая, семейная
206	Asp90Ala	rs80265967	4 экзон	62/ж	Пояснично-крестцовая, спорадическая
116	Ser105Leu		4 экзон	46/м	Пояснично-крестцовая, семейная
176	Glu133Gly		5 экзон	34/ж	Шейно-грудная, спорадическая
17	Leu144Phe		5 экзон	44/ж	Пояснично-крестцовая, спорадическая

Было выявлено, что частота встречаемости бульбарной формы БАС среди пациентов-носителей кодирующих мутаций в гене *SOD1* невысока и составляет 10%. То есть мутации в гене *SOD1* чаще обуславливают развитие спинальной формы заболевания ( $\chi^2=0,59$ ,  $p=0,44$ ). Поскольку данный факт не имел статистической значимости, он трактуется нами лишь как наблюдение.

Как показал анализ фено-генотипических корреляций, практически все выявленные мутации характеризовались выраженным клиническим полиморфизмом. Так, мутация Leu84Val была обнаружена у двух неродственных молодых мужчин с

семейным БАС. В одном случае (рис. 5а) это был пациент, страдающий быстро прогрессирующей бульбарной формой заболевания с дебютом в возрасте 39 лет и длительностью течения 3 года, мать и две родные тети которого также страдали БАС. Во втором случае (рис. 5б) – мужчина 29 лет с медленно прогрессирующей шейно-грудной формой заболевания, страдающий БАС уже более 4 лет, в семье которого диагноз БАС был установлен у бабушки, отца и дяди по отцу, причем симптомы у них дебютировали только на 6-м десятилетии жизни.



**Рисунок 5.** Родословные пациентов с семейным БАС.

В двух случаях (один – семейный, рис. 5в, другой – спорадический) была обнаружена мутация Asn86Ser: у пациентки с семейным БАС имела место пояснично-крестцовая форма заболевания с дебютом в 35 лет и медленным прогрессированием, тогда как у ее сестры с пояснично-крестцовой формой симптомы манифестировали в 54 года и продолжительность болезни составила 7 лет. У больной с мутацией Asn86Ser без семейного анамнеза имела место шейно-грудная форма БАС с дебютом в возрасте 54 года и продолжительностью жизни 10 месяцев от момента постановки диагноза.

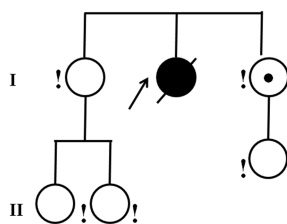
В одном случае у пациента с семейной формой БАС (рис. 5г) была обнаружена мутация Ser105Leu. В данном случае заболевание дебютировало в 42 года со слабости в ногах и прогрессирует весьма медленно (к настоящему моменту длительность болезни составляет более 9 лет). В этой же семье диагноз БАС был установлен у матери пациента, а носительство мутации обнаружено у тети пациента по материнской линии, не имеющей к 65 годам каких-либо клинических и электрофизиологических признаков

поражения мотонейронов. В описанном случае имеет место характерный для этой мутации фенотип БАС – медленно прогрессирующая спинальная форма заболевания со средней продолжительностью течения около 10 лет и с ранним дебютом. Кроме того, отсутствие клинических проявлений у тети пациента может быть объяснено тем фактом, что для мутации Ser105Leu характерна неполная пенетрантность.

Таким образом, в обследованной группе пациентов в семейных случаях были обнаружены мутации Leu84Val (2 случая), Asn86Ser (1 случай), Ser105Leu (1 случай). Все упомянутые мутации выявлены в гетерозиготном состоянии, наследовались по аутосомно-доминантному типу и локализованы в 4-м экзоне гена *SOD1*. Частота мутаций в гене *SOD1* для семейных случаев заболевания составила 50% (4 семьи из 8).

В спорадических случаях БАС в кодирующей области гена были выявлены мутации Gly16Ala, His48Arg, Glu133Gly, Leu144Phe, Asn86Ser и Asp90Ala. Частота кодирующих мутаций в исследуемом гене при спорадической форме заболевания составила 3%. При этом все обнаруженные в данной группе мутации встречаются в других популяциях мира и упоминаются в базе данных <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>.

Среди обнаруженных мутаций у одной пациентки была выявлена гетерозиготная мутация Asp90Ala, весьма часто встречаемая во всех европейских популяциях у больных БАС. Описанный ранее характерный для нее фенотип заключается в развитии пояснично-крестцовой формы БАС с медленным темпом прогрессирования. Именно такой фенотип отмечался при носительстве Asp90Ala и в данном случае. Заболевание дебютировало на 7-м десятилетии жизни со слабости в ногах и медленно прогрессировало (длительность течения – 5 лет). Отец пациентки скончался до 50 лет. При обследовании ближайших клинически здоровых кровных родственников было обнаружено носительство данной мутации у одной из сестер пациентки – женщины 50 лет (рис. 6). Дальнейшее катамнестическое наблюдение за этой пациенткой позволит уточнить пенетрантность мутации Asp90Ala.



**Рисунок 6.** Родословная пациентки-носительницы мутации Asp90Ala.

Кроме описанных выше кодирующих мутаций в обследованной группе больных были выявлены 3 некодирующие мутации у 4 неродственных пациентов, страдающих спорадической формой БАС (таб. 2).

**Таблица 2.** Выявленные некодирующие мутации в гене *SOD1*.

<i>ID пациента</i>	<i>Мутация</i>	<i>Область</i>	<i>Возраст/пол</i>	<i>Форма заболевания</i>
62	c.-46C>T	область промотора	42/м	Пояснично-крестцовая
130	c.169+50delAACAGTA	2 интрон	63/ж	Бульбарная
163	c.169+50delAACAGTA	2 интрон	65/ж	Шейно-грудная
191	c.*249T>C	5'-фланкирующая область	46/ж	Шейно-грудная

В двух случаях впервые была обнаружена делеция 7 пар нуклеотидов c.169+50delAACAGTA во 2-м интроне. У обеих пациенток-носительниц заболевание дебютировало в возрасте после 60 лет, однако фенотипические проявления БАС были весьма различными: в одном случае имела место медленно прогрессирующая шейно-грудная форма, а в другом – быстро прогрессирующая бульбарная форма. Исследование частоты встречаемости делеции c.169+50delAACAGTA в группе здоровых лиц, состоящей из 100 человек и сопоставимой с группой БАС по полу и возрасту, не выявило ни одного случая носительства данной мутации. Тот факт, что данная делеция была обнаружена сразу у 2 неродственных пациенток с БАС и отсутствует в группе контроля, позволяет предполагать патогенетическую значимость выявленной мутации.

В обследованной группе были также впервые обнаружены замена c.-46C>T в промоторной области гена и замена c.\*249T>C (rs16988412) в 5-м интроне в области сплайсинга. Данные области гена имеют большое функциональное значение, в связи с чем соответствующие мутации могут являться патогенетически значимыми. Для уточнения роли обнаруженных интронных мутаций методом ПЦР в режиме реального времени были обследованы 385 образцов ДНК здоровых лиц из банка ФГБУ «НЦН» РАМН. Носительства рискованных аллелей в группе здоровых лиц выявлено не было. Замену c.\*249T>C можно найти в базе SNP, согласно которой частота встречаемости минорного аллеля составляет 0,5%; в обследованной нами группе пациентов с БАС частота данного варианта также составила 0,5%. Таким образом, имеющиеся на сегодня данные, несмотря на отсутствие носительства минорного аллеля в контрольной группе, не позволяют убедительно считать замену c.\*249T>C рискованной мутацией.

Прямое изучение функциональных свойств обнаруженных некодирующих мутаций (оценка сплайсинга и т.д.) не проводилось в связи с отсутствием образцов цельной крови или других биологических тканей (образцы геномной ДНК хранились в лаборатории на протяжении ряда лет, а соответствующие пациенты умерли либо были недоступны для повторного обследования). Подтверждение их патогенетической роли требует дальнейших исследований. В связи с этим для более консервативной оценки частоты мутаций в гене *SOD1* учитывались только кодирующие варианты, и частота мутаций в гене *SOD1* при спорадическом БАС составила в нашей группе пациентов 3%.

Кроме того, при секвенировании были выявлены 10 некодирующих полиморфных вариантов (SNP), ряд из которых описывался ранее у пациентов с БАС, а в отношении других есть сведения в базе данных SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

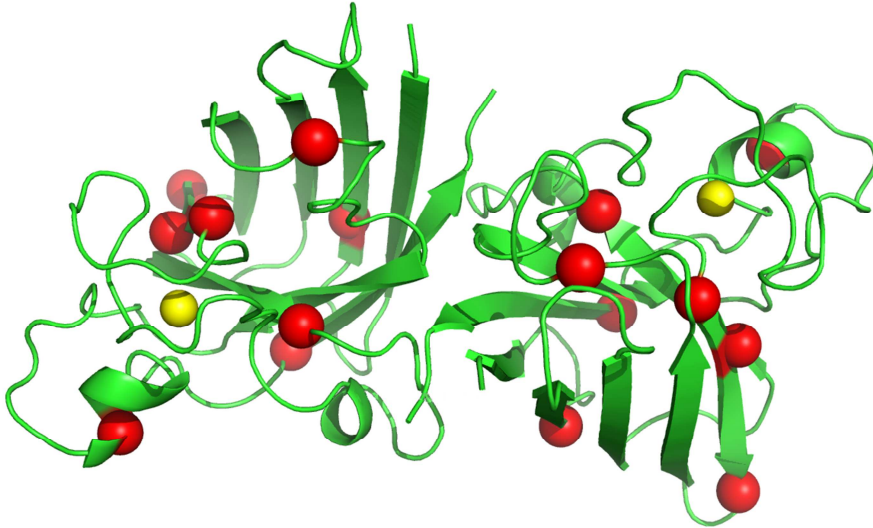
#### Анализ *in silico* мутаций гена *SOD1*.

С целью оценки патогенетической значимости кодирующих мутаций *SOD1* был выполнен анализ *in silico*. Молекулярное моделирование включало анализ нативного белка SOD1 и сравнение его с белком после внесения каждой из мутаций.

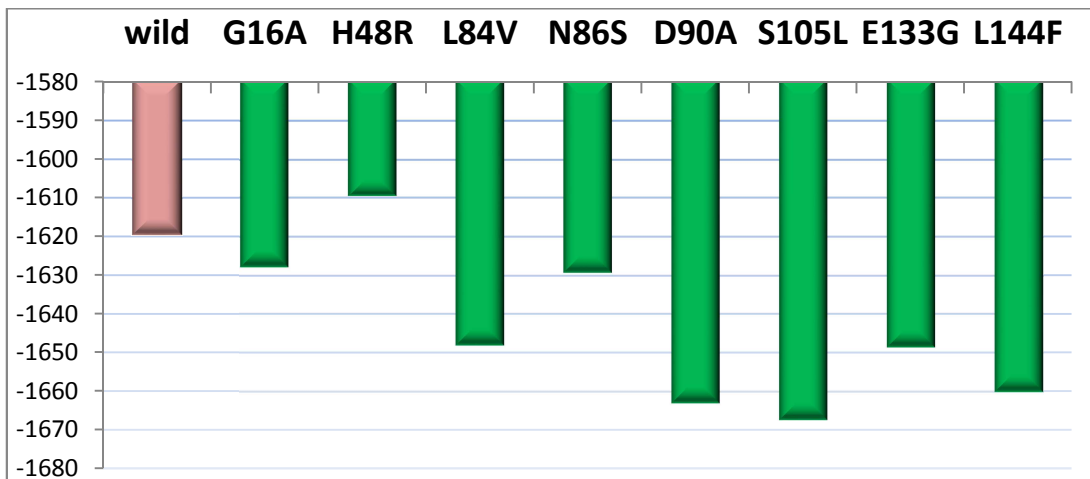
На рисунке 7 представлена вычисленная нами трехмерная модель белка SOD1 с мутированными остатками, выявленными в ходе исследования. Все обнаруженные нами мутации приводили к умеренному или значительному (соответствующих  $\geq 10$  ккал/моль) изменению энергии белка (рис. 8). Изменение энергии белка является следствием стерических изменений (конфликтов), возникающих вследствие мутации.

Одна из мутаций, локализованная в непосредственной близости к активному центру – His48Arg, приводила к повышению энергии белка, что соответствует ухудшению конформационной стабильности. Исследование выявило существенное отличие энергии остатков H48 (норма) и R48 (мутант):  $-25,9$  vs.  $-15,1$  ккал/моль. Вклад в изменение энергии остатка вносили как ван-дер-Ваальсова, так и электростатическая компоненты энергии ( $-21,3$  vs.  $-12,9$  ккал/моль и  $-4,2$  vs.  $-1,8$  ккал/моль, соответственно). Несмотря на тот факт, что мутированный остаток расположен несколько в стороне от активного центра, энергия взаимодействия с ионом цинка у дикого и мутированного белка отличалась:  $-0,6$  vs.  $1,1$  ккал/моль. Положительное значение энергии указывает на дестабилизирующий характер мутации в отношении взаимодействия с ионом металла в активном центре.





**Рисунок 7.** Трехмерная структура глобулярного белка SOD1 с мутированными остатками (красными сферы). В-тяжи указаны стрелками. Желтые сферы изображают ионы  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ .

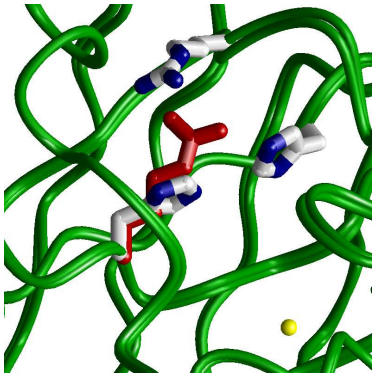


**Рисунок 8.** Гистограмма распределения энергии белка SOD1 (ккал/моль).

Кроме указанных факторов, для мутации His48Arg имеет значение изменение размера и геометрии боковой цепи белкового остатка. Несмотря на одинаковый положительный заряд у нативного и мутированного остатка, их боковые цепи существенно различаются по размеру, аргинин обладает более массивной боковой цепью, что проиллюстрировано при помощи вычисленной нами модели на рисунке 9.

Остальные изученные мутации приводили к снижению энергии белка, а значит – к повышению стабильности белковой молекулы SOD1. При этом максимально стабильными являлись молекулы белка с внесенными заменами Leu84Val, Asp90Ala, Ser105Leu, Glu133Gly и Leu144Phe (см. рис. 8). Такое изменение энергии белка по данным молекулярного моделирования, как правило, сопровождается повышенной

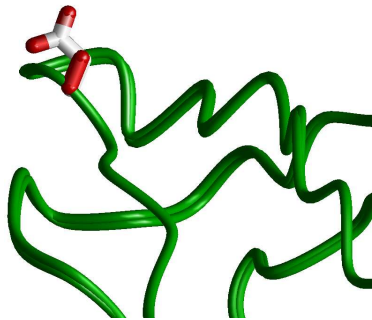
склонностью «инертной» мутантной молекулы к мисфолдингу и внутриклеточной агрегации, что подтверждает принадлежность БАС к классу так называемых конформационных болезней центральной нервной системы, или протеинопатий (Иллариошкин, 2003; Rubinsztein, 2006) .



**Рисунок 9.** Структурная модель влияния мутации His48Arg.

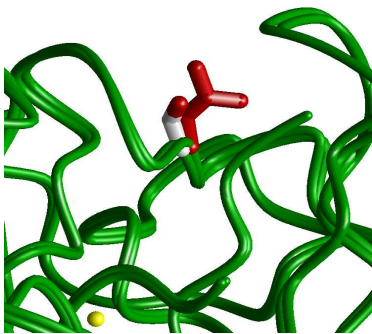
На рисунке показан в увеличенном виде участок одной из субъединиц SOD1, содержащий остатки H48, N120 и R148. Боковая цепь мутированного остатка R49 выделена красным цветом. Атомы водорода на рисунке не показаны. Желтый шар изображает ион  $Zn^{2+}$  в активном центре. Синим цветом показаны атомы N, серым – атомы C.

Примеры вычисленных нами моделей указанных выше мутаций представлены на рисунках 10–12.



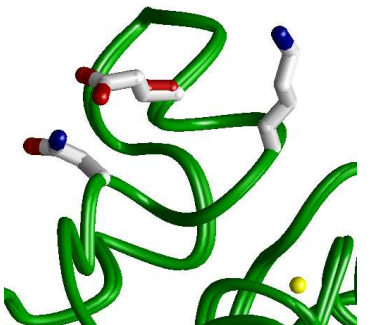
**Рисунок 10.** Структурная модель влияния мутации Asp90Ala.

В данном случае происходит замена отрицательно заряженного аминокислотного остатка на гидрофобный. При этом D90 попадает в триплет DKD, где три заряженных аминокислотных остатка расположены рядом, что должно создавать напряжение на С-альфа цепи. В случае замены на гидрофобный остаток это напряжение теряется.



**Рисунок 11.** Структурная модель влияния мутации Ser105Leu.

Боковая цепь S105 смотрит наружу (не внутрь глобулы белка), однако она расположена как бы в кармане, между цепями 21-19 и 106-112 остатков. Боковая цепь лейцина более массивна, чем у серина, и занимает больше пространства в этом кармане. Таким образом, у S105L можно предположить нарушение взаимодействия по типу «ключ-замок» с неким внешним агентом.



**Рисунок 12.** Структурная модель влияния мутации Glu133Gly.

В данном случае также происходит замена отрицательно заряженной аминокислоты на гидрофобную. Кроме того, происходит замена большого аминокислотного остатка (Glu) на малый (Gly), что ухудшает взаимодействие с окружающими аминокислотными остатками N139 и K136.

### Мутации в гене *TARDBP*.

Учитывая большие размеры гена и противоречивые данные о частоте мутаций в нем при БАС нами было выполнено секвенирование лишь 6-го экзона гена, в котором локализовано подавляющее большинство описанных при БАС мутаций (Mackenzie, 2010). При прямом секвенировании указанного экзона гена *TARDBP* кодирующих мутаций выявлено не было.

У одного пациента 36 лет, страдающего бульбарной формой заболевания с медленным прогрессированием симптоматики, была обнаружена замена с.\*44A>G (\*NT\_021937.19), локализованная в 5-м интроне *TARDBP*, которая, с учетом ее локализации в глубине интрона, может рассматриваться как незначимый полиморфизм. Частота указанной замены оценивалась в группе контроля, состоящей из 203 здоровых лиц и сопоставимой по полу и возрасту, методом ПЦР в режиме реального времени: ни в одном контрольном случае носительства с.\*44A>G обнаружено не было.

Кроме того, у 79 (38%) пациентов была обнаружена делеция с.715-126delG (rs3835416), в том числе у 72 пациентов в гетерозиготном и у 7 – в гомозиготном состоянии. Частота носительства делеции с.715-126delG в группе контроля (n=203) составила 26,6% (данная делеция была выявлена у 49 лиц в гетерозиготном и у 5 – в гомозиготном состоянии). При исследовании распределения аллелей и генотипов по локусу rs3835416 путем сравнения наблюдаемой и ожидаемой частот (таб. 3) было выявлено статистически значимое увеличение частоты встречаемости данной делеции в группе пациентов ( $\chi^2=13,17$ ; p=0,002).

**Таблица 3.** Анализ частот встречаемости генотипов локуса rs3835416.

Показатель	Группа БАС		Группа контроля		$\chi^2$	p
	N	%	N	%		
Частота аллелей:						
<b>G</b>	331	80	347	85,5	<b>13,17</b>	<b>0,002</b>
<b>delG</b>	85	20	59	14,5		
Частота генотипов:						
<b>G/delG</b>	71	34	49	24	<b>14,24</b>	<b>0,008</b>
<b>delG/delG</b>	7	3,4	5	2,5		
<b>GG</b>	130	62,6	149	73,5		

При анализе отношения шансов (ОШ) было выявлено, что в группе пациентов с БАС шанс носительства описанной делеции в 1,7 раза выше (ДИ 1,11–2,57; p=0,013) (таб. 4). Данный шанс увеличивался в подгруппе пациентов среднего (45–59 лет)

возраста (ОШ=1,9; ДИ 1,02–3,62;  $p=0,04$ ). Ассоциации носительства данной делеции с клиническими особенностями заболевания (формой БАС и характером течения заболевания) выявлено не было. Дозозависимого эффекта (усугубление тяжести течения БАС в зависимости от носительства делеции в гомо- и гетерозиготном состоянии) также не отмечалось. В гомозиготном состоянии делеция встречалась в 4 случаях при медленном течении и в 3 – при быстром, в 5 случаях при спинальной форме БАС и в 2 случаях бульбарного дебюта.

**Таблица 4.** Анализ ОШ для локуса rs383541 гена *TARDBP*.

delG+delGdelG vs. GG	Группа БАС		Группа контроля		ОШ	ДИ	$\chi^2$	p
	N	%	N	%				
<b>Все</b>	<b>78</b>	<b>37,5</b>	<b>54</b>	<b>26,6</b>	<b>1,7</b>	<b>1,11–2,57</b>	<b>6,1</b>	<b>0,013</b>
Мужчины	39	35,7	27	24,1	1,75	0,98–3,16	3,6	0,057
Женщины	39	39,4	27	29,7	1,54	0,84–2,83	1,99	0,16
Возраст до 45 лет	23	37,1	18	27,7	1,54	0,72–3,28	1,3	0,29
<b>Возраст 45–59 лет</b>	<b>37</b>	<b>42,5</b>	<b>25</b>	<b>27,7</b>	<b>1,9</b>	<b>1,02–3,62</b>	<b>4,25</b>	<b>0,04</b>
Возраст $\geq 60$ лет	18	30,5	11	22,9	1,48	0,61–3,57	0,78	0,38

#### Мутации в гене *ANG*.

При исследовании единственного кодирующего экзона гена *ANG* были выявлены 2 гетерозиготные мутации у 3 неродственных пациентов, страдающих спорадической формой БАС (таб. 5).

**Таблица 5.** Кодирующие мутации в гене *ANG*.

ID пациента	Мутация	rs	Возраст/пол	Форма заболевания
192	Pro21Ser	rs149672657	69/м	Шейно-грудная, спорадическая
207	Pro21Ser	rs149672657	30/ж	Бульбарная, спорадическая
68	Pe46Val	rs121909541	70/ж	Шейно-грудная, спорадическая

У двух неродственных пациентов была обнаружена замена в области сигнальной последовательности Pro21Ser (Pro(–4)Ser) и у одной пациентки – мутация Pe46Val – самая часто встречающаяся мутация в данном гене, обнаруженная во многих когортах пациентов с БАС. При определении возможных ассоциаций носительства мутации в гене *ANG* с фенотипическими проявлениями БАС обращало на себя внимание быстрое

прогрессирование заболевания у всех пациентов – носителей мутаций. При этом единственная носительница замены Le46Val страдала шейно-грудной формой БАС, которая дебютировала на 7-м десятилетии жизни, а носителями мутации Pro21Ser были пациент 69 лет, также страдающий шейно-грудной формой БАС, и пациентка 30 лет с бульбарной формой заболевания.

Таким образом, частота мутаций при спорадическом БАС в обследованной группе составила 1,5%. Среди пациентов, страдающих семейной формой заболевания, носительства мутаций в гене *ANG* обнаружено не было.

### Исследование гена *ATXN2*.

Первый экзон гена *ATXN2* несет участок CAG-повторов, определяющий полиглутаминовую последовательность (полиQ) его продукта – белка атаксина-2. Значительная степень CAG-экспансии в данном гене (> 33 копий) обуславливает развитие спиноцереbellарной атаксии 2-го типа (СЦА2) (Stevanin et al., 2000). Изменение копийности CAG при БАС соответствует экспансии промежуточного числа повторов («предэкспансии») – в диапазоне от 24 до 33 (Van Damme et al. 2011). Для оценки порогового значения числа CAG-повторов, ассоциированного с развитием заболевания, нами был выполнен ROC-анализ. Результаты показали, что для развития заболевания значимым является носительство 28 и более CAG-повторов в гене *ATXN2*.

В обследованной группе пациентов было выявлено 10 случаев *ATXN2*-ассоциированного варианта БАС. Таким образом, «предэкспансия» тандемных CAG-повторов встречалась с частотой 5% среди пациентов со спорадическим БАС. Частота встречаемости CAG-повторов оценивалась также в группе здоровых лиц, состоящей из 353 человек и сопоставимой с группой БАС по полу и возрасту. В контрольной группе было выявлено 6 случаев «предэкспансии» тринуклеотидных повторов в гене *ATXN2* (свыше 27, но менее 33 копий), что составило 1,7%. Частота встречаемости данной мутации в гене *ATXN2* среди больных была статистически значимо выше ( $\chi^2=3,89$ ;  $p=0,0486$ ). При анализе ОШ шанс развития заболевания у носителей «предэкспансии» CAG увеличивался до 3,36 (ДИ 1,1–10,4,  $\chi^2 4,98$ ,  $p=0,026$ ).

При анализе соотношения определенного генотипа *ATXN2* с клиническими особенностями заболевания зависимости между степенью экспансии CAG-повторов и возрастом дебюта заболевания обнаружено не было (в отличие от СЦА2, при которой с увеличением числа CAG-копий в данном гене дебют заболевания наступает в более

молодом возрасте). Однако обращал на себя внимание преимущественно быстрый темп прогрессирования БАС у носителей свыше 30 копий CAG-повторов. И хотя с учетом малого числа таких пациентов-носителей (4 больных) получить статистическую значимость здесь не представляется возможным, данная тенденция важна с точки зрения демонстрации универсальности механизмов нейродегенерации (БАС и СЦА2).

Анализ ассоциаций БАС с генами *VEGF* и *APOE*.

При анализе ассоциаций БАС с генами *VEGF* и *APOE* были обследованы пациенты исключительно славянской этнической группы, чье происхождение было прослежено до 3-го поколения. Обследованную группу БАС при этом составили 192 человека. Группа сравнения, полностью сопоставимая по полу, возрасту и этническому составу, включала 149 клинически здоровых лиц.

В ходе исследования методом ПЦР-РВ оценивалась ассоциация полиморфизма -2578C/A (rs699947) в гене *VEGF* с риском развития БАС. При оценке распределения аллелей и генотипов по данному локусу (таб. 6) в двух группах были получены статистически значимые различия как для рискованного аллеля А ( $\chi^2=7,14$ ;  $p=0,008$ ), так и в случае носительства рискованного гомозиготного генотипа АА ( $\chi^2=13,46$ ;  $p=0,001$ ).

**Таблица 6.** Анализ частот встречаемости генотипов локуса rs699947 гена *VEGF*.

Показатель	Группа БАС		Контроль		$\chi^2$	p	
	N	%	N	%			
Частота аллелей							
<b>А</b>	196	51,0	132	44,3	<b>7,14</b>	<b>0,008</b>	
<b>С</b>	188	49,0	166	55,7			
Частота генотипов							
<b>СА</b>	82	42,7	74	49,7	<b>13,46</b>	<b>0,001</b>	
<b>АА</b>	57	29,7	29	19,4			
<b>СС</b>	53	27,6	46	30,9			

При анализе ОШ методом вычисления логистической регрессии (таб. 7) шанс носительства рискованного генотипа АА был статистически значимо выше в группе БАС и составлял 1,7 (ДИ 1,05–2,93;  $\chi^2=4,85$ ;  $p=0,027$ ). При этом в подгруппе мужчин было выявлено увеличение шанса носительства АА генотипа до 2,1 раз (ДИ 1,06–4,17;  $\chi^2=4,7$ ;  $p=0,03$ ). При анализе клинических особенностей было выявлено, что шанс развития БАС при носительстве АА-генотипа повышается до 2,8 в подгруппе лиц до 45 лет. Полученный результат был на границе статистической значимости (ОШ 2,8; ДИ 0,91–

8,65,  $\chi^2=3,61$ ;  $p=0,058$ ), и ее отсутствие могло быть связано с небольшой выборкой данной подгруппы лиц. Для остальных возрастных подгрупп отличий получено не было. При анализе ассоциаций с другими клиническими особенностями было установлено, что у носителей определенных генотипов ассоциация с быстрым темпом прогрессирования не имеет статистической значимости (ОШ 1,61, ДИ 0,85–3,07;  $\chi^2=2,1$ ;  $p=0,14$ ). При анализе по формам заболевания также ассоциаций получено не было.

**Таблица 7.** Анализ ОШ для локуса rs699947 гена *VEGF*.

AA vs. CC+CA	Группа БАС		Группа контроля		ОШ	ДИ	$\chi^2$	p
	N	%	N	%				
<b>Все</b>	<b>57</b>	<b>29,7</b>	<b>29</b>	<b>19,5</b>	<b>1,7</b>	<b>1,05–2,93</b>	<b>4,85</b>	<b>0,027</b>
<b>Мужчины</b>	<b>31</b>	<b>30,1</b>	<b>16</b>	<b>16,8</b>	<b>2,1</b>	<b>1,06–4,17</b>	<b>4,7</b>	<b>0,03</b>
Женщины	26	29,2	13	24	0,8	0,37–1,77	0,29	0,59
Возраст до 45 лет	14	24,4	5	11,3	2,8	0,91–8,65	3,61	0,058
Возраст 45–59 лет	23	27,3	20	24,1	0,98	0,37–2,56	0,001	0,97
Возраст после 60 лет	20	36,4	4	18,2	2,36	0,85–6,6	2,77	0,096

Таким образом, выявленная ассоциация БАС с полиморфизмом в гене *VEGF* обуславливает актуальность исследований данного гена как одного из генов-кандидатов при БАС. Наблюдаемый возможный модулирующий эффект рискового аллеля (генотипа) требует дальнейшего уточнения.

При исследовании ассоциации БАС с полиморфизмом гена *APOE* анализировались аллели E2, E3 и E4, последний из которых является доказанным фактором риска некоторых нейродегенеративных заболеваний (Иллариошкин, 2003). Частота носительства определенных аллелей и генотипов *APOE* в группе обследованных пациентов с БАС не отличалась от таковой в контроле ( $\chi^2=0,12$ ,  $p=0,94$  и  $\chi^2=1,53$ ,  $p=0,91$  соответственно) (таб. 8).

При анализе ОШ шанс носительства рискового аллеля в гомо- или гетерозиготном состоянии в группе пациентов не увеличивался (ОШ=1,02; ДИ 0,58–1,8;  $\chi^2=0,007$ ;  $p=0,931$ ). Каких-либо ассоциаций аллелей и генотипов *APOE* с клиническими особенностями БАС (формой заболевания, возрастом дебюта, темпом прогрессирования) выявлено не было.

Таким образом, проведенное исследование не показало патогенетической роли гена *APOE* в развитии БАС у российских пациентов.

**Таблица 8.** Анализ частот встречаемости генотипов *APOE*.

Показатель	Группа БАС		Группа контроля		$\chi^2$	p
	N	%	N	%		
Частота аллелей						
<b>E2</b>	39	10	30	10	0,12	0,94
<b>E3</b>	299	78	234	78,5		
<b>E4</b>	46	12	34	11,5		
Частота генотипов						
<b>E2/E2</b>	5	2,5	4	2,7	1,53	0,91
<b>E2/E3</b>	29	15	21	14		
<b>E3/E3</b>	115	60	92	62		
<b>E3/E4</b>	40	21	29	19,3		
<b>E4/E4</b>	3	1,5	2	1,3		
<b>E2/E4</b>	0	0	1	0,7		

**Таблица 9.** Анализ ОШ для полиморфного локуса гена *APOE*.

E4 vs. E2+E3	Группа БАС		Группа контроля		ОШ	ДИ	$\chi^2$	p
	N	%	N	%				
Все	46	12	34	11,4	1,02	0,58–1,81	0,007	0,93
Мужчины	27	13,1	20	10,5	1,3	0,7–2,4	0,66	0,42
Женщины	19	10,7	13	12	0,87	0,41–1,85	0,12	0,72
Возраст до 45 лет	12	11,3	10	11,4	1	0,38–2,6	0	1,0
Возраст 45–59 лет	21	12,5	18	10,8	1,17	0,6–2,25	0,21	0,64
Возраст после 60 лет	13	11,8	5	11,4	1,07	0,36–3,23	0,16	0,9

Таким образом, настоящая работа была выполнена на самой большой (свыше 200 пациентов) выборке российских пациентов с БАС, прошедшей молекулярно-генетическое тестирование. Данная выборка включает широкий спектр клинических вариантов БАС, дебютирующих в молодом, среднем и пожилом возрасте, затрагивающих первично все возможные уровни поражения и имеющих различный темп прогрессирования. Работа позволила оценить частоту отдельных генетических форм БАС в России и вклад генов *SOD1*, *ANG*, *TARDBP*, *ATXN2*, *VEGF* и *APOE* в развитие данного заболевания.

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю благодарность за помощь в выполнении работы научным сотрудникам ДНК-лаборатории V неврологического отделения Н.Ю. Абрамычевой и М.С. Степановой, а также ведущему научному сотруднику лаборатории функциональной синаптологии А.В. Россохину.



## ВЫВОДЫ

1. В обследованной невыборочной серии случаев БАС, представляющей все основные клинические варианты заболевания, частота семейных форм составила 4,3%, а частота спорадической формы болезни – 95,7%. Для семейного БАС характерным оказался более ранний возраст дебюта симптомов по сравнению со спорадической формой заболевания (40,5 vs 48 лет), других клинических различий между указанными группами больных не выявлено.

2. При анализе клинико-генетических корреляций установлено, что БАС характеризуется выраженным полиморфизмом клинических проявлений как в рамках конкретных молекулярных форм болезни (ALS1, ALS9), так и у носителей одной и той же мутации (например, мутации Leu84Val и Asn86Ser в гене *SOD1*, Pro21Ser в гене *ANG*). При этом вариабельность симптоматики БАС касается возраста дебюта заболевания, его формы и темпа прогрессирования

3. При спорадической форме БАС установлены спектр и частота мутаций в генах *SOD1* и *ANG*, составившие в российской популяции 3% и 1,5% соответственно, и не обнаружены кодирующие мутации в 6-м (наиболее часто мутирующем) экзоне гена *TARDBP*. Выявленные частоты мутаций в изученных генах отражают особенность российской выборки пациентов с БАС, которую необходимо учитывать при проведении ДНК-тестирования.

4. Большинство наследуемых форм БАС связано с повреждениями гена *SOD1*, частота мутаций в котором составила 50% в обследованных случаях БАС в российских отягощенных семьях.

5. В славянской популяции европейской части России риск развития БАС ассоциирован с:

- носительством А-аллеля и А/А-генотипа в полиморфном сайте -2578A/C гена *VEGF* (соответственно, 51% vs. 44% в контроле,  $p=0,008$  и 28% vs. 19% в контроле,  $p=0,001$ );
- носительством делеции c.715-126delG в пятом интроне гена *TARDBP* (20% vs. 14,5% в контроле,  $p=0,002$ );
- носительством 28–32 копий tandemных тринуклеотидных CAG-повторов в гене *ATXN2* (5% vs. 1,7% в контроле,  $p=0,048$ ).

6. Проведенное исследование позволило уточнить ряд патогенетических механизмов гибели мотонейронов при БАС:

- роль конформационных изменений белка SOD1 обоснована данными молекулярного моделирования (понижение энергии мутантного белка в результате выявленных точковых мутаций гена);
- нарушения метаболизма РНК при БАС подтверждено наличием мутаций в гене *ANG* и ассоциаций болезни с генами *ATXN2* и *TARDBP*.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты комплексного клиничко-генетического исследования позволяют обосновать необходимость проведения скрининга на наличие мутаций в гене *SOD1* и процедуры медико-генетического консультирования ближайшим кровным родственникам больных БАС при наличии семейного анамнеза заболевания с использованием разработанных в данном исследовании оригинальных протоколов молекулярно-генетического анализа.

Вариабельность симптоматики семейных и спорадических форм БАС не позволяет сформулировать четкие рекомендации по отбору кандидатных генов для поиска мутаций в зависимости от фенотипа, поэтому при необходимости осуществления медико-генетического консультирования и ДНК-диагностики у российских пациентов следует проводить тотальный мутационный скрининг основных генов БАС, начиная с генов *SOD1* и *ANG*.

### СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кутакова (Лысогорская) Е.В., Ключников С.А., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н., Завалишин И.А., Иванова-Смоленская И.А. Роль аполипопротеина Е у больных боковым амиотрофическим склерозом (клиничко-генетическое исследование) // Журн. неврол. и психиатрии им. С.С.Корсакова. – 2009. – № 2. – С.51-54.
2. Лысогорская Е.В., Абрамычева Н.Ю., Иллариошкин С.Н., Захарова М.Н. Роль метаболизма РНК в патогенезе бокового амиотрофического склероза // Нейрохимия. – 2012. – № 3. – С. 247-252.
3. Лысогорская Е.В., Абрамычева Н.Ю., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н. Ассоциация полиморфизма –2578С/А гена *VEGF* с боковым амиотрофическим склерозом в

- русской популяции // Журн. неврол. и психиатрии им. С.С.Корсакова. – 2012. – № 11. – С.42-45.
4. Лысогорская Е.В., Абрамычева Н.Ю., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н. Частота мутаций в гене *SOD1* у русских пациентов с боковым амиотрофическим склерозом // Медицинская генетика. – 2013. — №4. – С. 32-37.
  5. Лысогорская Е.В., Россохин А.В., Абрамычева Н.Ю., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н. Мутации в гене *SOD1* при боковом амиотрофическом склерозе: возможности метода молекулярного моделирования // Молекулярная биология – 2013. – №5. – Принято в печать в №5.
  6. Kutakova (Lysogorskaia) E.V., Zakharova M.N., Illarioshkin S.N., Kliushnikov S.A. Apolipoprotein E in ALS pathogenesis // 7th European ALS Congress - Research Workshop and Young Investigators Meeting: Abstracts. – Turin. – 2009. – P.132.
  7. Лысогорская Е.В., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н., Ключников С.А., Иванова-Смоленская И.А. Роль аполипопротеина Е у больных боковым амиотрофическим склерозом // Мед. генетика. – 2010 (Мат–лы VI Съезда Русского общества медицинских генетиков: Тез. докл.). – С.23.
  8. Лысогорская Е.В., Абрамычева Н.Ю., Иллариошкин С.Н., Захарова М.Н. Исследование ассоциации -2578 A/A в гене *VEGF* при боковом амиотрофическом склерозе // Вестн. Военно-медицинской. акад. – 2010. – Приложение 4 (Мат–лы Российской науч.-практ. конф. «Актуальные нейродегенеративные заболевания XXI века»). – С.49–50.
  9. Лысогорская Е.В., Абрамычева Н.Ю., Иллариошкин С.Н., Захарова М.Н. Исследование полиморфизма 2578C/A в гене *VEGF* у больных боковым амиотрофическим склерозом // X Всероссийский съезд неврологов: Тез. докл. – Нижний Новгород. – 2012. – С.437.
  10. Lysogorskaia E.V., Abramychева N.Iu., Zakharova M.N., Illarioshkin S.N. The association between *VEGF* -2578C/A polymorphism and amyotrophic lateral sclerosis in Russian population // Eur. J. Neurol. – 2012. – Vol. 19 (Suppl. 1). – P. 278.
  11. Лысогорская Е.В., Абрамычева Н.Ю., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н. Спектр генетических мутаций в русской популяции пациентов, страдающих боковым амиотрофическим склерозом // Мед. академ. журн. – 2012. – № 4. – С.74-76.
  12. Лысогорская Е.В., Абрамычева Н.Ю., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н. Спектр генетических мутаций в русской популяции пациентов, страдающих боковым амиотрофическим склерозом // Всероссийская науч. конф. молодых ученых-медиков «Инновационные технологии в медицине XII века»: Тез. докл. – Москва. – 2012. – С.466.

13. Pestov N.B., Lysogorskaia E.V., Chervyakov A.V., Zakharova M.N. Amine oxidases of the cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: is there soluble D-amino acid oxidase? // 5th Conference on Advances in Molecular Mechanisms Underlying Neurological Disorders: Abstracts. – Bath, – 2013. – P.83.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АпоЕ – аполипопротеин Е  
 БАС – боковой амиотрофический склероз  
 ДИ – доверительный интервал  
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
 МЕК – минимальная энергетическая конформация  
 МКМ – Монте-Карло минимизация  
 ОШ – отношение шансов  
 ПЦР – полимеразная цепная реакция  
 ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени  
 РНК – рибонуклеиновая кислота  
 СЦА2 – спиноцеребеллярная атаксия 2-го типа  
 ALS FRS-R – revised ALS functional rating scale  
 ANG – ген, кодирующий ангиогенин  
 ATXN2 – ген, кодирующий атаксин2  
 APOE – ген, кодирующий апоЕ  
 SNP – олигонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism)  
 SOD1 – медь-цинксодержащая супероксиддисмутаза  
 SOD1 – ген, кодирующий белок SOD1  
 TDP43 – TAR-ДНК-связывающий белок  
 TARDBP – ген, кодирующий белок TDP43  
 VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor)  
 VEGF – ген, кодирующий белок VEGF