

Сравнение фенотипических проявлений периодической болезни у гетерозиготных носителей мутаций гена *MEFV* и гомозигот по тем же мутациям*

Айрапетян А.С.^{1,2}, Саркисян Т.Ф.^{1,2}, Атоян С.А.^{1,2}

¹ — Центр медицинской генетики и первичной охраны здоровья, Армения, Ереван, 0009, ул. Абовяна 34/3, e-mail: tamsar@sci.am

² — Ереванский Государственный Медицинский Университет им. Мхитара Гераци, Армения, Ереван, 0025, ул. Корюна 2

Семейная средиземноморская лихорадка (ССЛ) — наиболее распространенное аутовоспалительное заболевание, относящееся к периодическим наследственным лихорадкам. ССЛ характеризуется эпизодами лихорадки, продолжающимися 2–3 дня, которые повторяются в среднем каждый месяц, периодическими приступами асептического перитонита, абдоминалгией, торакалгией, полисерозитами разной локализации, артритом и иными симптомами. ССЛ — моногенное заболевание, в большинстве случаев с аутосомно-рецессивным типом наследования. В популяциях с часто встречаемой ССЛ описаны случаи симптомокомплекса ССЛ у гетерозигот. Цель настоящей работы — сравнить фенотипические проявления ССЛ у пациентов-гетерозигот и гомозигот по наиболее частым мутациям в армянской популяции.

Ключевые слова: семейная средиземноморская лихорадка, гетерозиготы, гомозиготы, мутации гена *MEFV*

Введение

Семейная средиземноморская лихорадка (ССЛ) часто встречается у представителей наций, имеющих происхождение из Средиземноморского региона (армяне, евреи, турки, арабы, итальянцы, греки, испанцы). В настоящее время болезнь встречается в разных регионах мира, что, по всей вероятности, связано с миграционными процессами [1].

ССЛ обусловлена мутациями гена *MEFV*, расположенного на коротком плече хромосомы 16p13.3, который был клонирован в 1997 г. одновременно двумя независимыми консорциумами [2]. В разных популяциях наиболее распространены мутации V726A, M694V, M694I, M680I, которые обуславливают около 74% всех типичных случаев ССЛ [3].

Приступ ССЛ может быть спровоцирован разными факторами и проявляется лихорадкой с локализованными или генерализованными болями в области живота, грудной клетки, суставов, артритами, иногда с эризипеллоидным высыпанием. В межприступном периоде жалоб у больных практически не бывает [4]. Кроме типичного течения болезни возможны атипичные проявления. Клинический полиморфизм может наблюдаться у пациентов с одинаковым генотипом, а также у членов одной семьи [5, 6]. Разные фенотипические варианты обусловлены широким спектром мутаций гена *MEFV*, в настоящее время включаемым 200 мутаций. Клиническая диагностика ССЛ основывается на критериях, предложенных клиникой Tel-Hashomer («золотой стандарт»), включающих большие и малые критерии клинических проявлений. Чувствительность данного метода диагностики составляет около 95% [7]. Для подтвержде-

ния диагноза определяют мутации гена *MEFV*, ответственные за развитие ССЛ [9].

В течение последних десятилетий основным лекарственным препаратом, который используется для лечения ССЛ, является колхицин. При назначении соответствующей дозировки, а также при нормальном функционировании печени и почек, колхицин считается относительно безвредным препаратом [9]. Некоторые исследователи отмечают, что эффективность колхицина может зависеть от генотипа больного. У пациентов с мутацией M694V в гомозиготном состоянии даже большие дозы колхицина могут быть неэффективными, что свидетельствует о необходимости создания новых средств для лечения ССЛ [10]. Недостаточная эффективность препарата может быть следствием применения неправильных схем терапии или его малых доз [11]. При развитии амилоидоза почек (АП) у больного ССЛ колхицин более эффективен на ранних стадиях протеинурии с низкими показателями белка в моче [12].

Многолетние исследования генетических особенностей ССЛ позволили определить, что данное моногенное заболевание наследуется в большинстве случаев аутосомно-рецессивно (OMIM 249100), а в определенных случаях — аутосомно-доминантно (OMIM 134610) [13]. В Израиле до 25% диагностированных случаев ССЛ с типичной клинической картиной заболевания, могут быть обусловлены одной единственной мутацией [13]. Среди клиницистов наиболее обсуждаемой и не до конца выясненной проблемой является постановка диагноза ССЛ у носителей одной мутации, что часто затрудняет назначение им своевременного лечения. Во многих случаях сложность постановки диагноза заболевания у гетерозиготных носителей обусловлена нетипичной

* Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов

клинической картиной, отсутствием «классического рецессивного генотипа», семейного анамнеза, что может намного отсрочить лечение пациентов.

Цель настоящей работы — сравнить фенотипические проявления ССЛ у пациентов — гетерозигот и гомозигот — по наиболее частым мутациям в гене *MEFV* в армянской популяции.

Материалы и методы

Материалом для определения мутаций гена *MEFV* служила цельная периферическая кровь. Забор крови проводили из локтевой вены в специальные пробирки с EDTA для предотвращения свертывания крови и деградации ДНК. Выделение ДНК проводили с использованием набора «MOBIO laboratories» (Ultra Clean Blood DNA Isolation Kit, USA). Мутации гена *MEFV* определяли методами амплификации участка ДНК, содержащего исследуемый ген, путем мультиплексной ПЦР, с последующей детекцией продуктов амплификации методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Следующий этап анализа мутаций, локализованных в экзонах 2, 3, 5, 10 гена *MEFV*, основан на реверс-гибридизации полученных ампликонов (Vienna Lab FMF Assay). Определялись 12 самых распространенных мутаций в армянской популяции (M694V, V726A, M680I(G/C), M680I(G/A), M694I, E148Q, R761H, P369S, A744S, F479L, K695R, I692del), которые обуславливают ССЛ у армян более чем в 98% случаев [14]. Высокая чувствительность и точность использованного метода определения мутаций гена *MEFV* была доказана ранее при параллельном секвенировании образцов ДНК 1299 пациентов-носителей одной мутации гена *MEFV* с типичными клиническими симптомами ССЛ. Лишь у двух гетерозиготных носителей была выявлена вторая мутация; анализ всех остальных образцов ДНК подтвердил наличие одной мутации [15], на основании чего сделан вывод, что метод, позволяющий определять 12 мутаций, обладает достаточной чувствительностью для генодиагностики ССЛ в армян-

ской популяции и не требует последующего секвенирования гена *MEFV* [15].

Из базы данных, включающей информацию о 28 000 лицах с ССЛ, обследованных в Центре медицинской генетики и первичной охраны здоровья, были отобраны данные о клинических проявлениях у гетерозиготных носителей каждой из выявленных мутаций гена *MEFV* и гомозигот по той же мутации. Всего проанализированы данные о 3087 гетерозиготных носителях мутаций в гене *MEFV* (соотношение женщин и мужчин 1:1,2), у которых были отмечены различные клинические проявления ССЛ по критериям диагностики Tel-Nashomer, и 11 848 гомозигот и компаунд-гетерозигот по этим мутациям (соотношение женщин и мужчин 1:1,1). Соотношение гетерозиготных, гомозиготных и компаунд-гетерозиготных генотипов приведены в табл. 1.

Результаты исследования обрабатывались методами вариационной статистики, рекомендуемыми для медико-биологических исследований на персональном компьютере Intel Pentium CPU 2020M с использованием пакета прикладных программ «SPSS Statistics 16.0». Для статистического анализа полученных данных применяли метод критерий согласия Пирсона (χ^2). Сравнение частот признаков в группах проводили попарно в таблицах сопряжения 2x2. Достоверность различий определяли с использованием критерия χ^2 , различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования были сопоставлены клинические проявления ССЛ у носителей наиболее часто встречающихся мутаций в армянской популяции. Среди обследованных нами пациентов типичная клиническая симптоматика ССЛ отмечена у 3087 пациентов с одной мутацией.

Выявлено небольшое различие в возрасте манифестации болезни между пациентами с одной и двумя мутациями гена *MEFV*, что показано в табл. 2. Манифеста-

Таблица 1

Количество пациентов с разными генотипами, вошедших в исследование

Генотип		n
Гетерозиготы	M694V	1434
	V726A	695
	M680I	363
	P369S	51
	F479L	59
	A744S	32
	K695R	10
	M694I	9
Гомозиготы		2839
Компаунд-гетерозиготы		9009

ция заболевания в возрасте 20 лет и старше отмечена почти у четверти пациентов — гетерозиготных носителей одной из мутаций (табл. 2).

Проведен анализ частоты симптомов (периодическая лихорадка, боли, связанные с асептическим перитонитом и плевритом, суставные боли, артриты, мышечные боли, кожные высыпания, протеинурия, АП) у носителей мутаций в гетерозиготном состоянии, имевших клинические проявления ССЛ, в сравнении с гомозиготами и компаунд-гетерозиготами. На рисунке приводятся результаты анализа фенотипических проявлений заболевания у гетерозигот и больных с двумя мутациями. Установлено, что такие типичные клинические симптомы ССЛ, как лихорадка, плеврит, артриты и миалгия у гетерозигот наблюдаются достоверно реже.

Далее был проведен анализ частоты клинических признаков у гетерозигот в сравнении с гомозиготами по той же мутации.

Мутация М694V. Мутация М694V — наиболее распространенная среди армян, предрасполагающая к тяжелым проявлениям заболевания и развитию осложнений. Частота фенотипических проявлений заболевания у гетерозигот и гомозигот приведена в табл. 3.

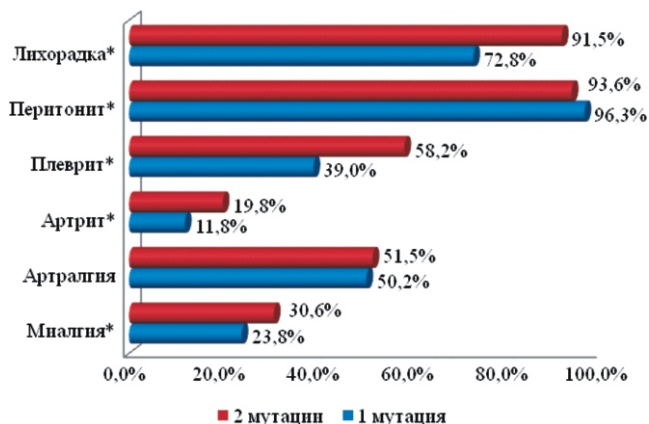
У гетерозиготных носителей мутации М694V самыми частыми проявлениями заболевания были лихорадка и перитонит, встретившиеся с почти одинаковой частотой (64,3% и 63,9% соответственно), артралгия (42,6%) и миалгия (34,4%). Плеврит, артрит и кожная сыпь наблюдались менее чем в трети случаев.

У гомозигот по мутации М694V распределение симптомов по частоте было таким же, но все клинические симптомы ССЛ наблюдались чаще, чем у гетерозиготных носителей данной мутации. Достоверные различия в частоте обнаружены по большинству перечисленных симптомов.

У пациентов-гомозигот по мутации М694V АП выявлен в 2,7% случаев, достоверно чаще, чем у гетерозигот. Следует обратить особое внимание на то, что у 0,2% (6 чел.) носителей мутации М694V в гетерозиготном состоянии с клиническими симптомами ССЛ, отмечена терминальная стадия поражения почек в виде АП.

Данные результаты являются подтверждением полученных ранее на небольшой выборке пациентов [16, 17].

Мутация V726A. Мутация V726A выявлена у 22,3% гетерозиготных пациентов с ССЛ. В отличие от гетерозиготных носителей мутации М694V, у гетерозиготных носителей мутации V726A самым частым симптомом



Частота симптомов ССЛ у пациентов с одной и двумя выявленными мутациями в гене *MEFV*:

* — $p < 0,005$

был перитонит (63,5%), вторым по частоте — лихорадка (51,4%), третьим — плеврит (25,5%), реже встречались миалгия (16,8%) и артриты (5,2%) (табл. 4).

Наблюдаются статистически достоверные различия по частоте таких наиболее типичных симптомов ССЛ, как лихорадка, перитонит, плеврит, артрит между гетерозиготами и гомозиготами по мутации V726A. Как видно из табл. 4, у гомозигот лихорадка, перитонит и плеврит встречаются достоверно чаще, чем у гетерозиготных носителей, в то время как для поражения суставов достоверной разницы не было выявлено.

В совместных исследованиях с Г.Г.Амарян ранее нами было показано, что частота развития плевритов у пациентов с компаунд-гетерозиготным генотипом V726A/M694V (81,6%) выше, чем у M694V-гомозигот (71,9%) ($\chi^2 = 10,27$, $p < 0,05$) и M694V-гетерозигот (68,9%) ($\chi^2 = 4,60$, $p < 0,05$).

Мутация M680I. Мутация M680I — третья по распространенности среди наших пациентов с ССЛ. Клинические проявления, встречающиеся у лиц с одним и двумя мутантными аллелями приведены в табл. 5.

Как видно из таблицы, у гетерозигот наиболее частыми симптомами являются перитонит (66,6%), лихорадка (57,8%), артралгия (43,8%) и плеврит (31,3%). Реже отмечаются миалгия (17,5%) и кожная сыпь (14,8%).

Те же симптомы, но статистически достоверно чаще встречаются у гомозигот: лихорадка (82,3%), перитонит (81,2%), плеврит (56,2%), но не артралгия (45,2%).

Таблица 2

Сравнение возраста начала ССЛ в группах пациентов с одной и двумя мутациями гена *MEFV*

Генотип	Начало ССЛ до 20 лет	Начало ССЛ после 20 лет	χ^2 , p
Гетерозиготный	75,0% (2315)	25,0% (772)	$\chi^2 = 11,48$; $p = 0,0007$
Гомозиготный и компаунд-гетерозиготный	77,8% (9225)	22,2% (2623)	

Мутация P369S считается редкой и отмечена у 51 пациента. Гетерозиготные носители мутаций P369S имеют клиническую симптоматику, типичную для ССЛ. В частности, больше половины носителей одной мутации P369S отмечают наличие лихорадки и перитонита во время приступов (58,2% и 68,1% соответственно), а около четверти больных отмечают наличие плеврита (27,5%). У 38,5% пациентов-гетерозигот по мутации P369S отмечаются артралгии. Острые артриты и миалгии встречаются сравнительно редко (7,7%, 11% соответственно). Му-

тация F479L наблюдалась у 59 пациентов-гетерозигот. Самыми частыми симптомами у носителей данной мутации являются перитонит и лихорадка (62,3%; 56,1% соответственно), артралгии (38,6%), плеврит у 24,6% пациентов, миалгии (15,8%). Мутации A744S, K695R у пациентов с ССЛ в гетерозиготном и гомозиготном состояниях встречаются достаточно редко [18], а именно: мутация K695R — у 27; мутация A744S — у 78 чел. Гомозиготы по указанным мутациям встретились в единичных случаях и их клинические данные не приводятся.

Таблица 3

Частота клинических проявлений ССЛ у носителей мутации M694V гена *MEFV*

Клинические проявления	Гетерозиготы по мутации M694V (1434)		Гомозиготы по мутации M694V (2043)			
	п	%	п	%	χ^2	р
Лихорадка	922	64,3	1669	81,7	134,1	р<0,001
Перитонит	916	63,9	1581	77,4	75,97	р<0,001
Плеврит	401	28,0	948	46,4	120,64	р<0,001
Артрит	341	23,8	754	36,9	67,3	р<0,001
Артралгия	610	42,5	1243	60,8	113,4	р<0,001
Миалгия	494	34,4	740	36,2	1,16	0,28
Кожная сыпь	283	19,7	371	18,2	1,37	0,24
АП	6	0,4	56	2,7	25,95	р<0,001

Таблица 4

Частота клинических проявлений ССЛ у носителей мутации V726A гена *MEFV*

Клинические проявления	Гетерозиготы по мутации V726A (695)		Гомозиготы по мутации V726A (401)			
	п	%	п	%	χ^2	р
Лихорадка	357	51,4	319	79,6	85,46	р<0,001
Перитонит	441	63,5	323	80,5	35,19	р<0,001
Плеврит	177	25,5	161	40,1	35,91	р<0,001
Артрит	74	10,6	32	8,0	2,07	0,15
Артралгия	286	41,1	158	39,4	0,32	0,57
Миалгия	117	16,8	93	23,2	6,64	0,01
Кожная сыпь	103	14,8	57	14,2	0,07	0,78

Таблица 5

Частота клинических проявлений ССЛ у носителей мутации M680I гена *MEFV*

Клинические проявления	Гетерозиготы по мутации M680I (363)		Гомозиготы по мутации M680I (356)			
	п	%	п	%	χ^2	р
Лихорадка	209	57,5	293	82,3	52,15	р<0,001
Перитонит	242	66,7	289	81,2	19,6	р<0,001
Плеврит	113	31,1	200	56,2	48,88	р<0,001
Артрит	37	10,2	75	21,1	16,16	р<0,001
Артралгия	159	43,8	161	45,2	0,15	0,652
Миалгия	63	17,4	96	27,0	9,64	0,0019
Кожная сыпь	54	14,9	48	13,5	0,29	0,572

Изучение клинико-генетических характеристик лиц-носителей одной мутации гена *MEFV* помогло расширить наши представления и понять особенности клинического течения, а самое главное — ведения данной группы больных для правильного и своевременного назначения лечения. Как показали результаты анализа пациентов, прошедших клиническое обследование и генетическое тестирование в Центре медицинской генетики и первичной охраны здоровья, а также находившихся на стационарном лечении в терапевтических отделениях, среди пациентов с гетерозиготным генотипом выраженность клинических симптомов и, следовательно, воспалительного процесса варьирует в широком диапазоне. В данной работе нами проведен анализ проявлений каждой отдельной мутации у гетерозигот в сравнении с гомозиготами по той же мутации, который позволил выявить их ассоциации с различными проявлениями ССЛ. Показано, что некоторые «патогенные» мутации в гетерозиготном состоянии определяют довольно выраженную клиническую картину. Полученные результаты имеют существенную клиническую значимость в плане постановки диагноза, ведения больных, медико-генетического консультирования семей и назначения корректной дозы колхицина.

Список литературы

1. Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial mediterranean Fever in the world. *Arthritis Rheum.* 2009;61(10):1447-1453. doi:10.1002/art.24458.
2. The International FMF Consortium. Ancient Missense Mutations in a New Member of the RoRet Gene Family Are Likely to Cause Familial Mediterranean Fever. *Cell.* 1997;90(4):797-807. doi:10.1016/S0092-8674(00)80539-5.
3. Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. 2001:473-483.
4. Samuels J, Aksentjevich I, Torosyan Y, et al. Familial Mediterranean fever at the millennium. Clinical spectrum, ancient mutations, and a survey of 100 American referrals to the National Institutes of Health. *Medicine (Baltimore).* 1998;77(4):268-297. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9715731>. Accessed September 20, 2014.
5. Ben-Zvi I, Brandt B, Berkun Y, Lidar M, Livneh A. The relative contribution of environmental and genetic factors to phenotypic variation in familial Mediterranean fever (FMF). *Gene.* 2012;491(2):260-263. doi:10.1016/j.gene.2011.10.005.
6. Erten S, Erzurum C, Altunoglu A. Three family members with familial Mediterranean fever carrying the M694V mutation showed different clinical presentations. *Intern Med.* 2012;51(13):1765-1768. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22790142>. Accessed September 21, 2014.
7. Berkun Y, Eisenstein EM. Diagnostic criteria of familial Mediterranean fever. *Autoimmun Rev.* 13(4-5):388-390. doi:10.1016/j.autrev.2014.01.045.
8. The International FMF Consortium. Ancient Missense Mutations in a New Member of the RoRet Gene Family Are Likely to Cause Familial Mediterranean Fever. *Cell.* 1997;90(4):797-807. doi:10.1016/S0092-8674(00)80539-5.
9. Ben-Chetrit E, Levy M. Colchicine: 1998 update. *Semin Arthritis Rheum.* 1998;28(1):48-59. doi:10.1016/S0049-0172(98)80028-0.
10. Lidar M, Yonath H, Shechter N, et al. Incomplete response to colchicine in M694V homozygote FMF patients. *Autoimmun Rev.* 2012;12(1):72-76. doi:10.1016/j.autrev.2012.07.025.
11. La Regina M, Ben-Chetrit E, Gasparyan AY, Livneh A, Ozdogan H, Manna R. Current trends in colchicine treatment in familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol.* 31(3 Suppl 77):41-46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24064013>. Accessed January 19, 2015.
12. Unverdi S, Inal S, Ceri M, et al. Is colchicine therapy effective in all patients with secondary amyloidosis? *Ren Fail.* 2013;35(8):1071-1074. doi:10.3109/0886022X.2013.811345.
13. Marek-Yagel D, Berkun Y, Padeh S, et al. Clinical disease among patients heterozygous for familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* 2009;60(6):1862-1866. doi:10.1002/art.24570.
14. Т.Ф. Саркисян*, А.С. Айрапетян, Г.Р. Шахсуварян АРЕ. Молекулярная диагностика семейной средиземноморской лихорадки (периодической болезни) среди армян. 2007;1.
15. Moradian MM, Sarkisian T, Ajrapetyan H, Avanesian N. Genotype-phenotype studies in a large cohort of Armenian patients with familial Mediterranean fever suggest clinical disease with heterozygous *MEFV* mutations. *J Hum Genet.* 2010;55(6):389-393. doi:10.1038/jhg.2010.52.
16. Shohat M, Magal N, Shohat T, et al. Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *Eur J Hum Genet.* 1999;7(3):287-292. doi:10.1038/sj.ejhg.5200303.
17. Ben-Chetrit E, Backenroth R. Amyloidosis induced, end stage renal disease in patients with familial Mediterranean fever is highly associated with point mutations in the *MEFV* gene. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(2):146-149. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1753463&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed November 5, 2014.
18. Soylemezoglu O, Kandur Y, Duzova A, et al. Familial Mediterranean fever with a single *MEFV* mutation: comparison of rare and common mutations in a Turkish paediatric cohort. *Clin Exp Rheumatol.* May 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26005881>. Accessed June 14, 2015.

Phenotype-genotype comparative characteristics of FMF heterozygous patients with the homozygous patients for the same mutations

Hayrapetyan H.S.^{1,2}, Sarkisian T.F.^{1,2}, Atoyán S.A.^{1,2}

¹ — Center of Medical Genetics and Primary Health Care, 34/3 Abovyan str. Yerevan, 0009, Armenia, e-mail: tamsar@sci.am

² — Yerevan State Medical University after MkhitarHeratsi, 2 Koryun str., Yerevan, 0025, Armenia

Familial Mediterranean fever (FMF) is the most common autoinflammatory disease of Hereditary periodic fevers. FMF is characterized by attacks of periodic fever, aseptic peritonitis, abdominalgia, thoracalgia, arthritis, and other symptoms, typically lasting 2–3 days, once a month in average. FMF is monogenic disease with autosom-recessive type of inheritance in most cases. Although in populations with high frequency of FMF there is evidence of clinical manifestations among heterozygous patients. The aim of this study is to show our comparative data on FMF phenotypic manifestations among heterozygous and homozygous patients with the most common mutation in Armenian population.

Key words: Familial Mediterranean fever, homozygotes, heterozygotes, *MEFV* gene mutations