

На правах рукописи
Учреждение Гематологический научный центр
Российской Академии Медицинских Наук

Лучинина Юлия Алексеевна

***“Молекулярно-генетическая диагностика
острой перемежающейся порфирии”.***

14.01.21 - Гематология и переливание крови

03.02.07 - Генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
Академик РАН и РАМН, д.м.н., проф. Воробьев А.И.

к.б.н. Лукьяненко А.В.

Москва, 2010

Содержание:

Список использованных сокращений	4
Введение	5
Глава I: Обзор литературы	
1.1. Биосинтез гема.	10
1.2. Порфирии и их классификация.	13
1.3. Острая перемежающаяся порфирия.	14
1.3.1. История.	14
1.3.2. Патогенез и клиника ОПП.	18
1.3.3. Биохимическая диагностика.	20
1.4. Порфобилиногендезаминаза.	22
1.4.1. Структура ПБГД.	22
1.4.2. Ген ПБГД.	25
1.4.3. Спектр мутаций гена ПБГД.	26
1.5. Система детоксикации ксенобиотиков и ее гены.	32
1.5.1. Гены и ферменты 1 фазы детоксикации ксенобиотиков.	34
1.5.1.1. Цитохромы <i>P450</i> .	34
1.5.1.2. Цитохром <i>P450 1A1</i> . (<i>CYP1A1</i>).	35
1.5.1.3. Цитохром <i>P450 2E1</i> . (<i>CYP2E1</i>).	36
1.5.2. Гены и ферменты 2 фазы детоксикации ксенобиотиков.	37
1.5.2.1. Ариламин-N-ацетилтрансферазы (<i>NAT</i>).	37
1.5.2.2. Ариламин-N-ацетилтрансфераза 2 (<i>NAT2</i>).	38
1.5.2.3. Глутатион-S трансферазы. (<i>GST</i>).	40
1.5.2.4. Глутатион-S трансфераза класса М. (<i>GST M</i>).	41
1.5.2.5. Глутатион-S трансфераза класса Т. (<i>GST T</i>).	41
1.5.2.6. Эпоксидгидролазы.	42
1.5.2.7. Микросомальная эпоксидгидролаза (<i>mEPHX1</i>).	42

Глава II.

2. Материалы и методы.	44
2.1. Выделение ДНК и РНК.	44
2.2. ОТ-ПЦР.	46
2.3. ПЦР.	47
2.4. Электрофорез в полиакриламидном геле.	49
2.5. Выделение ПЦР и ОТ-ПЦР фрагментов и определение их первичной структуры.	49
2.6. Рестрикционный анализ мутаций.	50
2.7. Анализ SNP и гаплотипов гена ПБГД.	50
2.8. Секвенирование полноразмерного гена ПБГД.	52
2.9. Исследование полиморфизмов генов детоксикации.	53
2.10. Математические методы анализа.	55

Глава III.

3. Результаты и обсуждение.	56
3.1. Клиническая характеристика больных ОПП.	56
3.2. Поиск мутаций в гене ПБГД.	58
3.2.1. Миссенс - мутации.	63
3.2.2. Мутации сплайсинга.	69
3.2.3. Нонсенс-мутации.	71
3.2.4. Делеции, микроинсерции.	72
3.3. Скрининговый анализ.	76
3.4. Семейная диагностика носительства.	78
3.5. Анализ гаплотипов.	82
3.6. Поиск функционально-неполноценных аллелей гена ПБГД.	85
3.7. Изучение генов системы детоксикации.	91
3.7.1. Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей генов фазы 1 системы детоксикации ксенобиотиков.	92
3.7.1.1. Ген <i>CYP1A1</i> .	93

3.7.1.2. Ген <i>CYP2E1</i> .	94
3.7.2. Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей генов фазы 2 системы детоксикации ксенобиотиков.	96
3.7.2.1. Ген <i>NAT 2</i> .	96
3.7.2.2. Ген <i>mEPHX 1</i> .	99
3.7.2.3. Ген <i>GST</i> .	105
Заключение.	110
Выводы.	112
Приложение.	113
Список использованной литературы.	122

Список используемых сокращений:

АЛА-С - синтетаза дельта-аминолевулиновой кислоты

ОПП – острая перемежающаяся порфирия

ПБГД – порфобилиногендезаминаза

ЭПП – эритропоэтическая протопорфирия

ПКП – поздняя кожная порфирия

Х-сПП – Х-сцепленная доминантная протопорфирия

НКП – наследственная копропорфирия

ВП – variegate порфирия

δ - АЛК – δ -аминолевулиновая кислота.

ПБГ – порфобилиноген.

CYP1A1 – цитохром P450 1A1

CYP2E1 – цитохром P450 2E1

NAT 2 – N-ацетилтрансфераза

mEPHX 1 – микросомальная эпоксидгидролаза

GST – глутатионтрансфераза

dpm - дипирролметан

ГНЦ РАМН – Гематологический научный центр Российской академии медицинских наук

Введение.

Порфирия - редкое наследственное заболевание, имеющее восемь нозологических форм, каждая из которых ассоциирована с дефицитом одного из ферментов системы биосинтеза гема [Hindmarsh J.T., 1986.]. Для всех нозологий этого заболевания характерно накопление тех или иных промежуточных продуктов порфиринового обмена в зависимости от дефицита ферментов соответствующих метаболических стадий, избыток которых приводит к клиническому проявлению болезни. Острая перемежающаяся порфирия (ОПП) вместе с вариегатной порфирией (ВП), врожденной копропорфирией (ВКП) и порфирией, обусловленной дефицитом дегидратазы δ -аминолевулиновой кислоты, образует группу острых печеночных порфирий. Все острые порфирии имеют аутосомно - доминантный тип наследования. Повышенный интерес клиницистов и генетиков к группе острых порфирий обусловлен тем, что эти заболевания, проявляющиеся в виде повторяющихся острых приступов с преимущественным поражением нервной системы, при неправильной диагностике и лечении представляют серьезную угрозу для жизни пациентов. Приступы провоцируются рядом эндогенных и экзогенных факторов (лекарственные препараты, алкоголь, изменение гормонального статуса и др.), стимулирующих экспрессию синтетазы дельта-аминолевулиновой кислоты (АЛА-С), первого фермента в цепи биосинтеза гема.

В ГНЦ РАМН работы по обследованию и лечению больных с нарушением порфиринового обмена ведутся с 1996г. За это время с направительным диагнозом острая порфирия было обследовано 638 человек, среди которых было выявлено 133 больных с острыми формами порфирий, а с диагнозом ОПП оказалось 102 человека. Такое доминирование ОПП, наиболее тяжелой и распространенной формы из группы острых

порфирий, диктует нам необходимость в наиболее детальном обследовании пациентов с таким диагнозом.

ОПП вызывается частичным дефицитом фермента порфобилиногендезаминазы (ПБГД) и клинически чаще всего проявляется после достижения пубертатного возраста. В мире известны единичные случаи заболевания детей, и все они связаны с гомозиготным носительством дефектного гена, [Hessels et al, 2004] в то время как взрослые за редчайшими исключениями являются гетерозиготными носителями. Своевременная точная диагностика и адекватная терапия позволяют спасти подавляющее большинство больных. В период развернутых острых проявлений заболевания, как правило, удается установить правильный диагноз ОПП, основываясь на клинических признаках и биохимической диагностике. Что же касается асимптомных носителей, то для них даже биохимическая диагностика, основанная на измерении активности ПБГД в эритроцитах, далеко не всегда дает однозначный ответ на вопрос о носительстве заболевания, поскольку диапазоны уровней активности фермента у таких пациентов перекрываются с нормальными значениями. Поэтому особое значение приобретает молекулярно-генетическое исследование, позволяющее выявлять латентных, асимптомных носителей дефектного гена, потенциально имеющих риск развития клинической стадии заболевания.

ОПП, имея доминантный характер наследования, характеризуется невысокой пенетрантностью (по максимальным оценкам до 10-15%), свидетельствующей о том, что мутация в гене ПБГД является необходимым, но не достаточным условием клинического проявления болезни, основная тяжесть которого связана не с недостатком конечного продукта ферментативной реакции, катализируемой ПБГД, а с накоплением избытка токсичного субстрата-предшественника. Поскольку 50% - ное снижение активности ПБГД за счет мутантного аллеля не является достаточным основанием для образования патологического фенотипа, должны

существовать какие-то дополнительные генетические факторы, предопределяющие клиническое проявление у гетерозиготных носителей мутантного гена. Интенсивные исследования в области молекулярной генетики острых порфирий ведутся во многих странах мира. Однако, многие авторы отмечают неполноценность современного медико-генетического консультирования острых порфирий из-за невозможности дифференцированного подхода к асимптомным носителям заболевания (особенно, детям и подросткам) и выделения среди них каких-либо групп риска. Это обусловлено отсутствием информации о дополнительных генетических факторах, сонаследующихся с мутантными генами и принципиально влияющих на патогенез заболевания. Такие факторы в настоящее время обнаружены только для двух доминантно наследуемых форм порфирий, не относящихся к острым – эритропоэтической протопорфирии (ЭПП) и поздней кожной порфирии (ПКП) [Gouya et al, 1999, Badminton et al, 2005]. Для острых порфирий, к которым относится ОПП, о таких факторах ничего не известно.

Цели исследования: Определение спектра мутаций в гене ПБГД и характера их возникновения у больных ОПП из различных регионов РФ и стран СНГ, наблюдаемых в ГНЦ РАМН, с использованием эффективных систем генетической диагностики. Выявление дополнительных генетических факторов, предопределяющих клиническое проявление у гетерозиготных носителей мутантного гена.

Задачи исследования:

- 1) Поиск мутаций в гене ПБГД у больных ОПП, наблюдаемых в ГНЦ РАМН.
- 2) Разработка скрининговых методов тестирования наиболее часто встречающихся мутаций в гене ПБГД.
- 3) Выявление асимптомных носителей в семьях больных ОПП, у которых найдено мутационное нарушение в гене ПБГД.
- 4) Установление происхождения (полифилетическое или монофилетическое) наиболее распространенных мутаций в гене ПБГД у пациентов с ОПП при помощи анализа гаплотипов.
- 5) Поиск при помощи анализа полиморфных вариантов гена ПБГД функционально неполноценных аллелей этого гена, сочетание которых с мутантным аллелем может определять клиническое проявление ОПП.
- 6) Изучение возможного влияния на клинику ОПП сочетаний мутантного гена ПБГД с аллельными вариантами различных генов 1-й и 2-й фаз системы детоксикации: цитохромов Р450 (*CYP1A1*, *CYP2E1*), микросомальной эпоксидгидролазы (*mEPXH1*), глутатионтрансфераз (*GSTM1*, *GSTT1*), N-ацетилтрансферазы (*NAT2*).

Научная новизна: Проведено исследование российских больных ОПП с целью выяснения распределения мутаций в гене ПБГД по типу и локализации в сравнении с другими популяциями. Мутационный анализ, проведенный для 75 больных, выявил 50 различных дефектов в гене ПБГД, 29 из которых ранее в мировой популяции не встречались. Выявлен характер возникновения наиболее часто встречающихся мутаций и показано, что мутации 53delT и IVS13+2T→G;+6(+G) имеют монофилетическое происхождение. Впервые изучена возможная ассоциация аллельных вариантов генов фазы 1: *CYP1A1* (A2455G), *CYP2E1* (G-1259C) и 4-х генов фазы 2: *NAT2* (C481T , G590A G857A), *mEPHX1*: Tyr113His - 3-й экзон,

His139Arg - 4-й экзон, *GSTM1* (Del), *GSTT1* (Del) с клиническим проявлением ОПП.

Практическая ценность: установление носительства мутантного гена ПБГД у родственников больных ОПП и их своевременное информирование позволяет избежать развития тяжелой клинической стадии болезни, что приводит к сокращению сроков их лечения, снижению инвалидизации и значительному улучшению качества жизни.

Анализ генетического полиморфизма гена N-ацетилтрансферазы и глутатионтрансферазы можно рекомендовать в качестве прогностического теста для оценки риска клинического проявления ОПП.

Апробация работы. Материалы диссертации опубликованы в 6 печатных работах и докладывались на международной конференции по генетике человека (Прага, 2005г.) и Всероссийской научно-практической конференции «Молекулярные методы диагностики моногенных заболеваний: возможности и перспективы» (Москва, 2006г.)

ГЛАВА I

1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биосинтез гема.

Порфирии представляют собой группу наследственных заболеваний, причиной возникновения которых является дефицит ферментов системы биосинтеза гема [Hindmarsh, 1986]. Биосинтез гема проходит в восемь этапов, каждый из которых катализируется соответствующим ферментом (рис.1). Первый и последние три фермента локализованы в митохондриях, ферменты промежуточных стадий синтеза гема находятся в цитоплазме. На первом этапе происходит образование δ -аминолевулиновой кислоты (δ -АЛК) из глицина и сукцинил-коэнзима А. Эта реакция катализируется синтетазой δ -аминолевулиновой кислоты. Далее, две молекулы δ -аминолевулиновой кислоты при участии дегидратазы δ -аминолевулиновой кислоты образуют монопиррол порфобилиногена (ПБГ). На третьем этапе четыре молекулы порфобилиногена при участии порфобилиногендезаминазы (ПБГД) образуют нестабильный тетрапиррол - оксиметилбилан. Четвертый фермент, уропорфириноген III-синтетаза, катализирует переход оксиметилбилана в уропорфириноген III, завершая тем самым формирование тетрапиррольного кольца. В отсутствие уропорфириноген III-синтетазы оксиметилбилан, посредством неферментативной реакции, может образовывать уропорфириноген I. При нормальных условиях синтеза эта изоформа присутствует в очень малых количествах. Далее, посредством связывания четырех карбоксильных групп уксусной кислоты уропорфириногена образуется копропорфириноген III. Эта реакция катализируется уропорфириноген III-декарбоксилазой, которая находится в цитоплазме. На шестом этапе, в присутствии кислорода, копропорфириноген III-оксидаза катализирует превращение двух пропионовых групп пиррольного кольца в винильные, тем самым образуя протопорфириноген III. На седьмом этапе

биосинтеза гема из протопорфириногена удаляются шесть атомов водорода с образованием протопорфирина. Реакция катализируется протопорфириногенаксидазой. Окисление протопорфириногена также может проходить неферментативно. На завершающей стадии протопорфирин в присутствии митохондриальной феррохелатазы присоединяет атом железа и образуется гем.

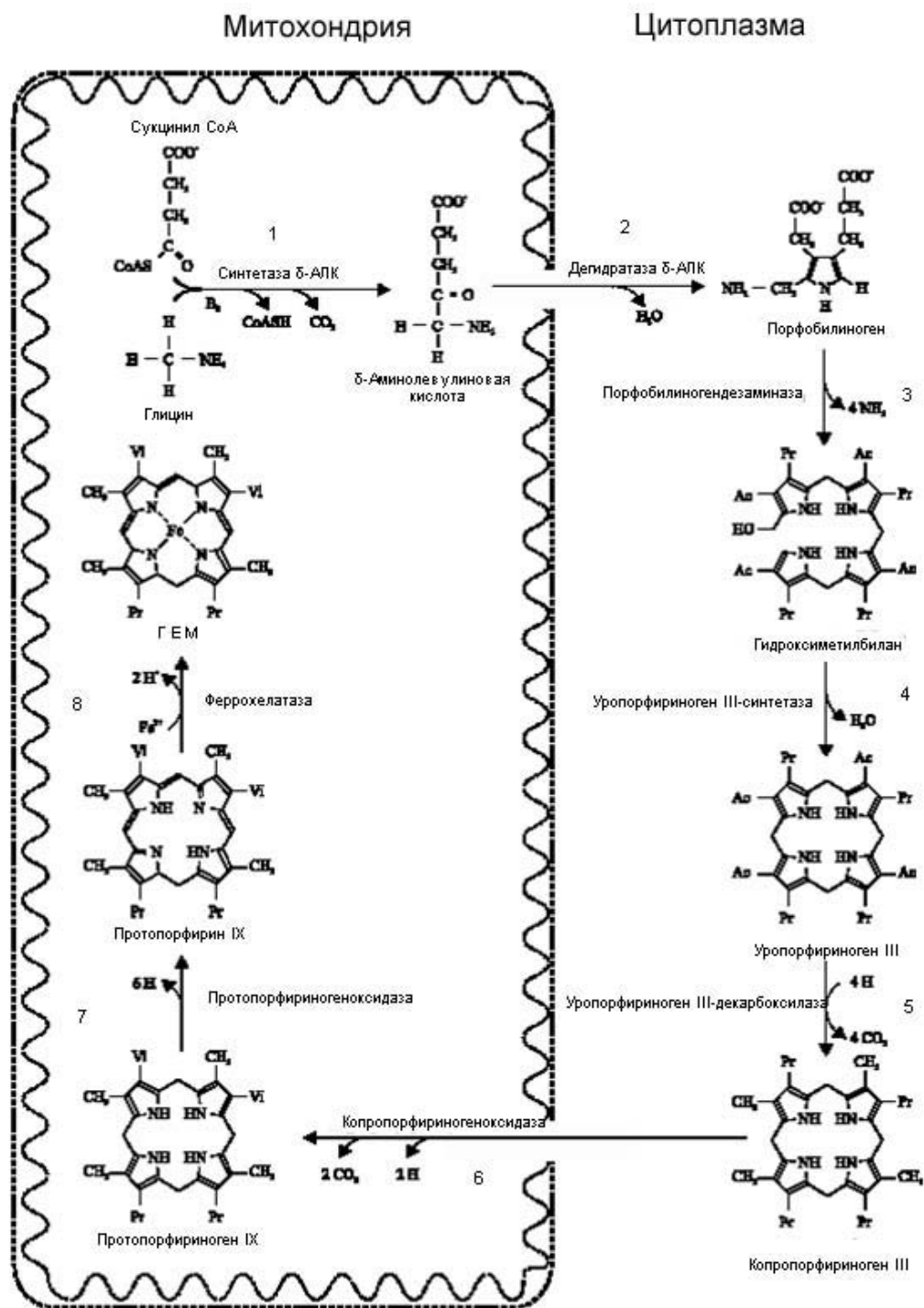


Рис.1. Схема биосинтеза гема и формы порфирий, обусловленные нарушениями активности отдельных ферментов. (Ac=—CH₂COOH; Pr=—CH₂CH₂COOH; Vi=—CH=CH₂). Нозологические формы порфирий обозначены арабскими цифрами:

- | | |
|---|------------------------------------|
| 1- X-сцепленная доминантная протопорфирия | 5- Поздняя кожная порфирия |
| 2- Порфирия, обусловленная дефицитом дегидратазы δ-аминолевулиновой кислоты | 6- Наследственная копропорфирия |
| 3- Острая перемежающаяся порфирия | 7- Вариегатная порфирия |
| 4- Врожденная эритропоэтическая порфирия | 8- Эритропоэтическая протопорфирия |

1.2. Порфирии и их классификация.

Обычно выделяют 7 нозологических форм порфирии, для которых характерны специфические изменения в обмене порфиринов, определяющие их клиническую картину. В 2008 году Whatley и соавт. выявили еще одну форму порфирии, названную ими X-сцепленной доминантной протопорфирией (X-сдПП), которая обусловлена терминальными делециями в гене синтазы дельта-аминолевулиновой кислоты, повышающими активность этого фермента [Whatley et al, 2008]. Нозологические формы и ферменты, дефицит которых обуславливает тот или иной тип порфирии, представлены на рис.1. В зависимости от основного места нарушения синтеза гема, порфирии делятся на две группы: эритропоэтические и печеночные [Kappas et al, 1989]. К первой группе относятся врожденная эритропоэтическая порфирия (болезнь Гюнтера) и эритропоэтическая протопорфирия. Во вторую группу включают шесть нозологических форм: порфирия, обусловленная дефицитом дегидратазы δ -аминолевулиновой кислоты, острая перемежающаяся порфирия, наследственная копропорфирия (НКП), variegate порфирия (ВП), поздняя кожная порфирия и X-сдПП,. Вместе с тем, часто порфирии подразделяют на острые формы и формы, протекающие с преимущественным поражением кожных покровов. К острым порфириям относятся: порфирия, связанная с дефицитом дегидратазы δ -аминолевулиновой кислоты, острая перемежающаяся порфирия, наследственная копропорфирия и variegate порфирия. Характер наследования порфирий может быть как аутосомно-доминантным, так и аутосомно-рецессивным. Все печеночные порфирии за исключением порфирии, связанной с дефицитом дегидратазы δ -аминолевулиновой кислоты, и спорадической формы поздней кожной порфирии имеют доминантный тип наследования.

1.3. Острая перемежающаяся порфирия

1.3.1. История

История изучения острых порфирий начинается с конца XIX века, когда Гюнтер описал случаи болей в животе и неврологические симптомы у нескольких пациентов. В 1930 г. Ганс Фишер стал нобелевским лауреатом, получив премию за работу по изучению биосинтеза гема [Fischer et al, 1934]. Впоследствии Ян Вальденстром, который работал в лаборатории Фишера, описал истории болезни более чем ста пациентов с симптомами острой перемежающейся порфирии, большинство из которых были из небольшой деревни на севере Швеции. [Waldenstrom, 1937]. В своих работах он описал менделевский тип наследования ОПП. Позже им была высказана гипотеза о том, что порфирии связаны с дефектом ферментов в системе биосинтеза гема. Им же был введен термин «острая перемежающаяся порфирия». Уотсон, который также был коллегой Фишера, совместно с Шварцем разработал скрининговый тест для определения порфобилиногена [Watson and. Schwartz, 1941]. Он же в 1957 году предложил использовать гематин для лечения порфирий. В 1971 году Мияги с соавторами было показано, что острая перемежающаяся порфирия возникает в результате дефектов гена порфобилиногендезаминазы. [Miyagi et al, 1971]. Ген ПБГД был клонирован и секвенирован в 1986 году, после этого начались обширные молекулярно-генетические исследования и поиск мутаций, приводящих к острой перемежающейся порфирии.[Grandchamp et al, 1987; Lee and Anvretpnas, 1991; Namba et al, 1991].

С заболеванием порфирия связаны имена двух исторических личностей: короля Георга III, правившего Великобританией и Ирландией с 1760 по 1820гг., и голландского художника Винсента Ван Гога. Считают, что Ван Гог страдал острой перемежающейся порфирией, так как у него наблюдались «серии неврологических приступов, из – за которых не мог даже двигаться», страдал психическими расстройствами [Loftus et al, 1991]. Авторы статьи,

посвященной болезни художника, полагают, что провоцирующим фактором, вызывающим такие симптомы, стало злоупотребление алкоголем, в частности, абсентом. Если в случае Ван Гога его причастность к заболеванию основывалась на клинических симптомах, описание которых дошло до наших дней, то исследователям, изучавшим причины «безумства» Георга III, удалось не только доказать, что король страдал порфирией, но и установить ее форму, обнаружив мутационное нарушение у прямых потомков [Röhl et al, 1998]. Король Георг III страдал сильными нервными расстройствами, за что получил прозвище «безумного». Известно, что он перенес четыре главных приступа «безумия» в 1788-1789, 1801, 1804 и 1810 гг.

В 1966 году два британских психиатра немецкого происхождения, Ида Макальпин и ее сын Ричард Хантер, исследуя исторические архивы, обнаружили, что приступы психического расстройства Георга III всегда сопровождались физическими симптомами: хромотой, болями в животе, тошнотой, запорами, тахикардией, кожной сыпью и красным цветом мочи. Они предположили, что Георг III был болен острой перемежающейся порфирией. Доказать верность своего предположения авторы не успели, так как оба рано скончались. Спустя несколько лет их последователи, Джон Рел и Мартин Уорренс, попытались найти прямых потомков Георга III и получить генетические доказательства, которые убедили бы всех в болезни короля. Путем изнурительных архивных поисков авторы смогли реконструировать истории болезни Георга III, тринадцати его выживших детей, в том числе принца – регента (впоследствии Георга IV), короля Уильяма IV и герцога Кентского, внучки Георга III королевы Виктории, ее старшей дочери Вики, старшей дочери Вики- Шарлотты и единственной дочери Шарлотты – Феодоры (рис.2). После эксгумации останков Шарлотты и ее дочери Феодоры с помощью анализа ДНК удалось обнаружить мутацию, которая приводит к вариетатной порфирии. Кроме того, были получены медицинские доказательства, что у принца Уильяма Глостерского, внука

Георга V и королевы Марии, погибшего в авиакатастрофе в 1972г., была та же форма порфирии. Основываясь на полученных данных, можно утверждать, что «безумие» Георга III было связано с заболеванием вариетатной порфирией. Изучая природу болезни Георга III, авторы также обратили внимание на подозрительные симптомы его предков, в том числе у шотландской королевы Марии и ее сына короля Джеймса I, который жаловался своему доктору на то, что у него моча «цвета вина аликанте».

С переходом Вики в прусский королевский дом дефектный ген, ответственный за порфирию перекочевал за Ла-Манш в германские земли. До сих пор неизвестно, кто еще кроме Шарлотты и ее дочери Феодоры унаследовал его. Получил ли дефектный ген Кайзер Вильгельм II? Не передал ли он его своему сыну Иоахиму, который в 1920 г. совершил самоубийство после того, как ему был поставлен диагноз наследственной и неизлечимой, хотя и неназванной болезни? Не занесла ли порфирию вместе с гемофилией в российский дом Александра, последняя русская царица и еще одна внучка королевы Виктории?

THE ROYAL HOUSES OF EUROPE

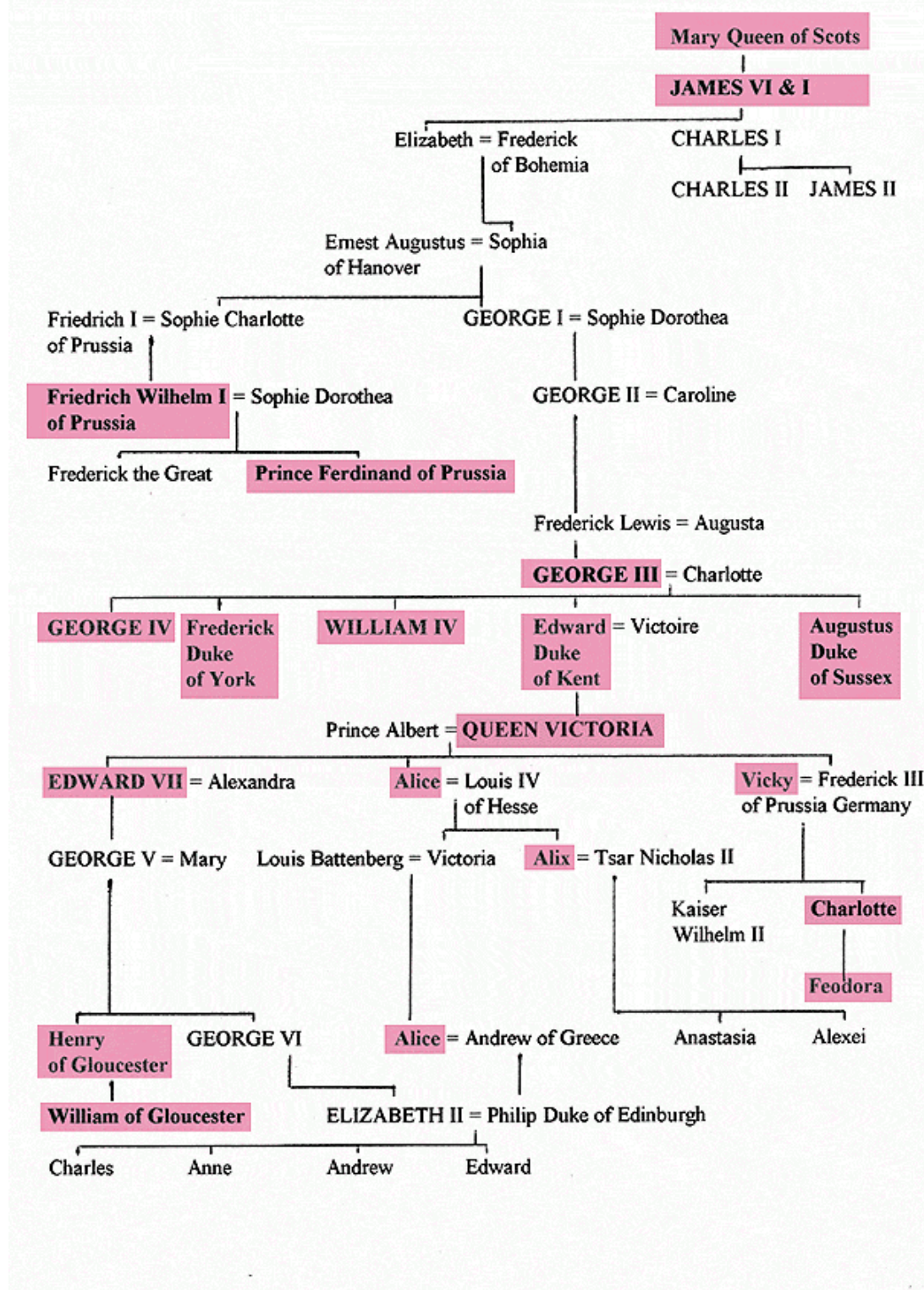


Рис. 2 Королевские дома Европы.

Цветом обозначены персонажи, у которых зафиксированы те или иные симптомы порфирии

К настоящему времени, в развитых западных странах четко налажена и внедрена практически во все клинические центры диагностика острых порфирий, а также медико-генетическая консультация больных и их родственников, в результате чего удалось свести до минимума процент смертности больных ОПП. В России первые работы по изучению нарушений порфиринового обмена были начаты профессором Идельсоном Л.И. [Идельсон, 1969] в конце 60-х, начале 70-х годов XX века. По материалам докторской диссертации им была опубликована первая в стране монография, посвященная ОПП. С 1996 года работы по диагностике и лечению больных с нарушением порфиринового обмена проводятся в отделении ХГЗиИТ (рук. Кравченко С.К., зав. Кременецкая А.М.) ГНЦ РАМН. За этот период работы было выявлено 195 человек, страдающих разными формами порфирии. Среди них 102 человека - с диагнозом острая перемежающаяся порфирия.

1.3.2. Патогенез и клиника ОПП.

Острая перемежающаяся порфирия является самой тяжелой и распространенной формой острых порфирий. По разным оценкам частота встречаемости больных от 1:10 000 до 1:50 000, латентных носителей – от 1:1500 до 1:7500).[Kappas et al, 1995; Mustajoki et al, 1992.; Nordmann et al, 1997]

Заболевание имеет приступообразное течение, провоцируемое одним или сочетанием нескольких порфириногенных факторов экзогенной или эндогенной природы. К ним относятся: алкоголь, некоторые лекарственные препараты (нестероидные противовоспалительные, барбитураты, сульфаниламиды и др.), репродуктивная функция у женщин, инсоляция, гипогликемия, бактериальные и вирусные инфекции (например, гепатит). Эти факторы приводят к повышенному потреблению гема - конечного продукта биосинтеза, который играет важную роль в окислительно-

восстановительных процессах клетки, участвует в транспорте кислорода и является составляющей частью печеночных цитохромов Р 450 [Karras et al, 1989], которые в свою очередь участвуют в детоксикации ксенобиотиков в организме человека. Как следствие, вышеперечисленные факторы стимулируют активность первого фермента системы биосинтеза гема - синтетазы δ -аминолевулиновой кислоты, что приводит к ускорению синтеза всех промежуточных продуктов метаболизма порфиринов. В случае острой перемежающейся порфирии, которая ассоциирована с пониженной активностью порфобилиногендезаминазы (другое название – оксиметилбилансинтетаза), третьего фермента цикла синтеза гема, происходит избыточное накопление δ -АЛК и ПБГ, вызывающее клиническое проявление болезни.

Чаще всего заболевание проявляется после достижения пубертатного возраста. В мире известны единичные случаи заболевания детей и все они связаны с гомозиготным носительством дефектного гена [Hessels et al, 2004], в то время как заболевшие взрослые являются гетерозиготными носителями мутации в гене ПБГД. Среди заболевших преобладают лица женского пола, что связано с функционированием их репродуктивной системы. В клинике ОПП доминирует поражение нервной системы, обусловленные избытком δ -АЛК и ПБГ в тканях больного, приводящих к сегментарной демиелинизации нервных волокон с нарушением их проводимости. Основные симптомы, которые должны привести врача к правильному диагнозу, следующие: боли в животе, часто неопределенного характера и не имеющие точной локализации; парезы или параличи скелетной мускулатуры; боли в конечностях; бульбарные нарушения (дисфония, дизартрия, нарушение глотания); паралич дыхательной мускулатуры; тошнота и рвота; запоры; артериальная гипертензия; тахикардия; моча красного цвета; лихорадка; психические расстройства; судороги.

Острые приступы нередко завершаются летальным исходом, что обычно всего происходит из-за ошибочной или запоздалой диагностики и, как следствие, неправильного лечения пациента. От дебюта заболевания и до верификации диагноза зачастую проходил от одного до четырех месяцев, а в редких случаях несколько лет [Пустовойт и др., 2004]. За это время у больных успевают сформироваться тяжелые осложнения, требующие длительного и дорогостоящего лечения. До недавнего времени летальность при ОПП в среднем составляла 40-60% [Буторов и др., 1995; Jeans et al 1996]. Своевременная точная диагностика и адекватная терапия позволяют спасти подавляющее большинство больных. В период развернутых острых проявлений заболевания, как правило, удается установить правильный диагноз ОПП, основываясь на клинических признаках и биохимической диагностике.

1.3.3. Биохимическая диагностика ОПП

Диагноз острая порфирия верифицируется при помощи количественного определения порфиринов и их предшественников в моче. Для острых приступов характерно высокое содержание общих порфиринов (ОП) (> 150 мкг/л) и их предшественников: ПБГ и δ -АЛК (> 2 мг/л и > 4.5 мг/л, соответственно) в моче [Bissel, 1982]. Кроме того, высокие показатели ОП и предшественников часто остаются высоким и в период латентного течения, что является отличительной чертой ОПП при сравнении с другими формами острых порфирий.

Далее проводится дифференциальная диагностика ОПП, которая основывается на определении содержания общих порфиринов в кале и крови и определении активности ПБГД в эритроцитах [Карпова 1998]. Для всех больных ОПП характерен не превышающий 200 нмоль/г сухого веса уровень общих порфиринов в кале. Содержание общих порфиринов в эритроцитах, как правило, остается в норме и колеблется в пределах $0-1.4$ мкмоль/л. Что

касается содержания общих порфиринов в плазме, то не всегда у больных ОПП эти показатели в норме ($N < 10 \text{ нмоль/л}$), часто они превышают ее в несколько раз. Самые высокие цифры ОП в плазме отмечаются у пациентов в острой фазе заболевания с высокими показателями ОП и ПБГ в моче, т.е. в момент интенсивного накопления в клетках промежуточных продуктов биосинтеза порфиринов. У большинства пациентов с ОПП активность фермента снижена более чем в два раза ($N > 2 \text{ мУ/гHb}$). Однако у некоторых пациентов она остается в норме, либо снижается незначительно [Пустовойт, 2004].

По сочетанию характерных клинических признаков с увеличенным содержанием общих порфиринов и их предшественников в моче, кале и крови, а также сниженной активностью ПБГД в эритроцитах удается установить правильный диагноз больным ОПП. Для асимптомных носителей дифференциальная биохимическая диагностика затруднительна. Измерение активности ПБГД в эритроцитах, далеко не всегда дает однозначный ответ на вопрос о наличии заболевания, поскольку диапазоны уровней активности фермента у таких пациентов перекрываются с нормальными значениями [Gross et al, 1997]. В этом случае единственным способом уточнить диагноз является молекулярно-генетическое исследование, позволяющее выявлять мутации в гене ПБГД.

1.4. Порфобилиногендезаминаза

1.4.1. Структура ПБГД

Изначально выделить фермент ПБГД и установить его кристаллическую структуру удалось из клеток *Escherichia coli* (*E.coli*) [Louie et al, 1992; Louie et al, 1996]. Совсем недавно независимо друг от друга двумя группами исследователей были опубликованы данные о кристаллической структуре всецканевой ПБГД человека [Gill et al, 2009; Song et al, 2009]. Сравнение аминокислотных последовательностей ПБГД *E.coli* и человека показывает 60%-ную степень сходства между ними. (<http://www.BiochemJ.org/bj/420/bj420017add.htm>). Поэтому первоначально исследование влияния мутаций (преимущественно аминокислотных замен) на структуру и активность ПБГД проводилось при использовании 3D – модели кристаллической структуры, выделенной из клеток *E.coli*. Однако, с помощью данной модели было невозможно достаточно точно предсказать функциональные последствия мутаций в регионах с низкой гомологией. С помощью рентгеновской кристаллографии с разрешением 2.8 Å была определена точная кристаллическая структура всецканевой ПБГД человека, что позволило более точно моделировать и предсказывать степень влияния мутаций с учетом структурных особенностей фермента. Установлено, что размер молекулы ПБГД составляет 57×43×32 Å и она состоит из двух асимметричных единиц, связанных между собой прочными поверхностными взаимодействиями, которые представлены в основном гидрофобными контактами, солевыми мостиками и водородными связями. Каждая единица фермента состоит из трех доменов (рис.3)

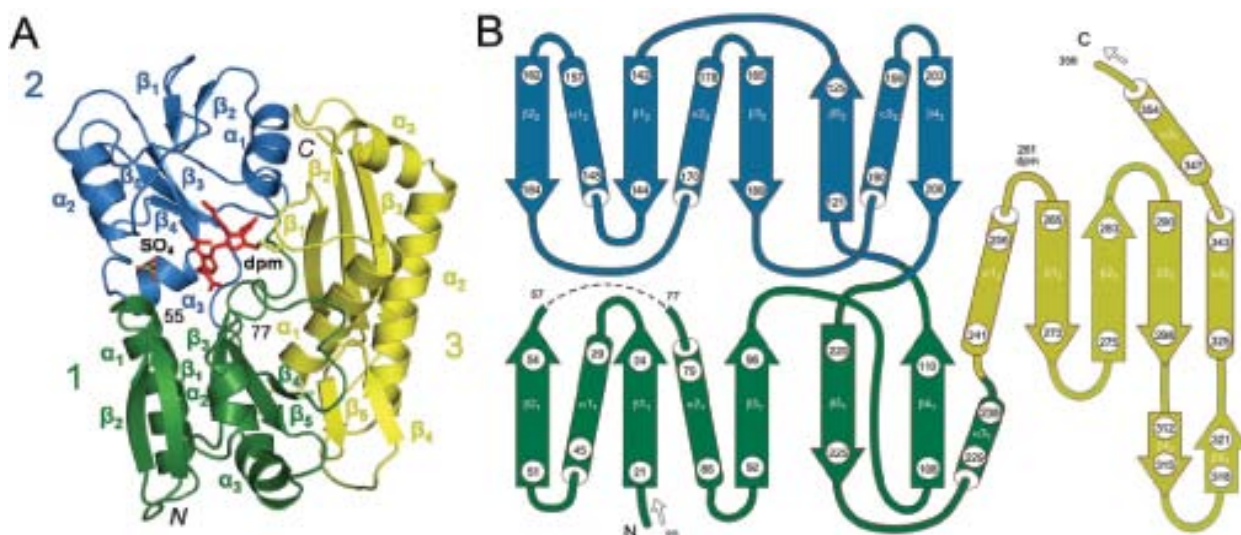


Рис.3.

А) 3D структура всецканевой ПБГД. (домен 1 выделен зеленым цветом, домен 2-голубым и домен 3-желтым. Кофактор дипирролметана (красного цвета) и сульфогруппа расположены в каталитическом сайте между доменами 1 и 2)

В) топологическая диаграмма вторичной структуры молекулы ПБГД (пунктиром обозначены остатки 56-76 и локализация кофактора)

Как видно из рисунка, конфигурации первого (аминокислотные остатки 2-115 и 214-238) и второго (аминокислотные остатки 116-213) доменов похожи. Их структура состоит из пяти β -цепей, четыре из которых параллельны. При этом сегменты α -цепей, находящиеся в структуре двух доменов, располагаются перед β -цепями. В отличие от доменов 1 и 2, третий домен ПБГД (аминокислотные остатки 239-356) содержит три антипараллельные β -цепи и три сегмента α -цепей, которые, как и в случае первых двух доменов, находятся спереди. Полипептидные цепи третьего домена, скручивающиеся на некотором расстоянии от С-конца витка β_3 образуют β -петли из остатков 312-315 (β_4) и 318-321 (β_5), что становится причиной антипараллельности цепей. В петле β_3 третьего домена имеется вставка из 29 аминокислотных остатков, которые отсутствуют в ферменте *E.coli*. Между тремя доменами существуют преимущественно гидрофильные взаимодействия, что делает структуру ПБГД достаточно гибкой. Помимо основных гидрофильных междоменных связей, существуют также некоторые гидрофобные взаимодействия, а именно, между остатками Gln²⁹ и

Met¹⁹⁶ основных цепей доменов 1 и 2, Leu⁹⁷, Leu²⁴⁴ и Cys²⁴⁷ на поверхности доменов 1 и 3 и остатками Ala¹⁵¹, Met²¹² и Leu²⁸⁵ доменов 2 и 3. Активный сайт фермента, содержащий в качестве кофактора молекулу дипирролметана (dpm), локализован между первым и вторым доменом (рис 4). Кофактор связывают с белком свыше 25 различных контактов, наиболее в этом задействованы консервативные остатки Ser¹⁴⁷, Arg¹⁵⁰ и Arg¹⁷³.

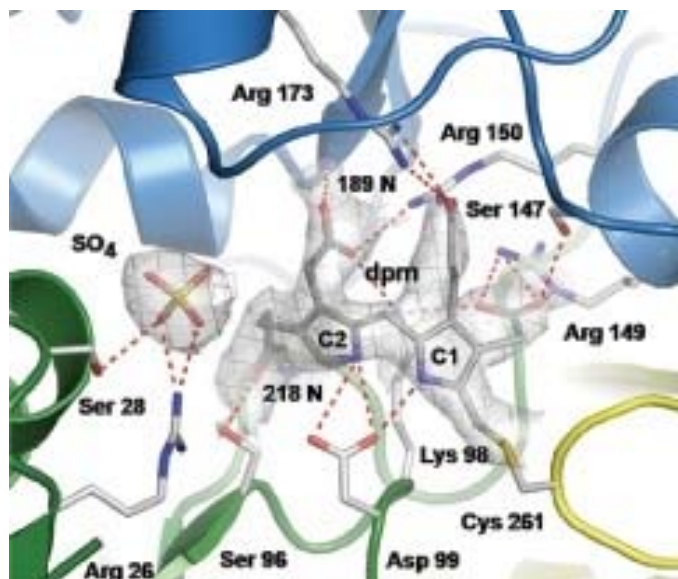


Рис.4 Активный сайт всеклеточной ПБГД человека.

Во взаимодействие между карбоксильными группами пиррольного кольца C1 и ферментом включены различные варианты остатков аргинина (Arg¹⁴⁹, Arg¹⁵⁰, Arg¹⁷³), азот амидной группы Ser⁹⁶ и карбоксильная и гидроксигруппа Ser¹⁴⁷. Кольцо C2 дипирролметана находится сзади по отношению к излому активного центра. В связи с ним задействованы Ser⁹⁶ и азот амидных групп остатков Ala¹⁸⁹ и Gly²¹⁸. Остатки аминокислот Lys⁹⁸ и Asp⁹⁹ взаимодействуют с обоими кольцами кофактора: Lys⁹⁸ образует солевые мостики с CH₃COO⁻ группами, в то время как Asp⁹⁹ образует водородные связи с обоими пиррольными NH-группами кофактора.

1.4.2. Ген ПБГД

Ген ПБГД был клонирован и секвенирован в 1986 году [Raich et al, 1986]. Он локализован на хромосоме 11 (11q24.1-24.2) и имеет размер около 10 тпн, из которых 1,3 тпн составляют кодирующую часть, включающую в себя 15 экзонов (рис.5). ПБГД существует в двух изоформах, одна из которых экспрессируется только в эритроидных клетках, а другая является всетканевой [Grandchamp et al, 1987]. Изоформы ПБГД кодируются двумя различными мРНК, транскрибирующимися с разных промоторов одного и того же гена, один из которых ("housekeeping") локализован в 5'-области гена, а другой (эритроидный) - на расстоянии около 3 тпн от него в интроне 1. Эритроидная мРНК ПБГД начинается с экзона 2 и имеет иницирующий кодон в экзоне 3, тогда как неэритроидная мРНК имеет иницирующий кодон в экзоне 1 и не содержит экзона 2, который удаляется из нее путем альтернативного сплайсинга [Chretien et al, 1988].

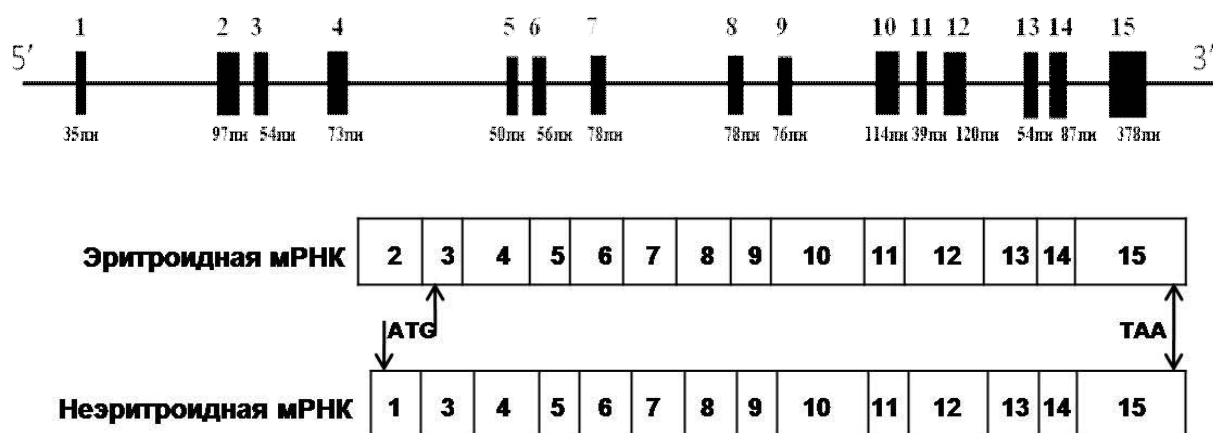


Рис.5 Схематическое изображение гена ПБГД и двух изоформ мРНК .

Две изоформы ПБГД различаются своими NH₂-концами. У неэритроидной формы, содержащей 361 аминокислотный остаток, по сравнению с эритроидной формой имеются 17 дополнительных остатков, одиннадцать из которых кодируются первым экзоном и 6 - небольшим

участком третьего экзона. В классическом варианте ОПП (~ 90% всех семей, затронутых ОПП) оба фермента, и эритроидный и всецканевой, имеют пониженную активность, однако в 5% случаев уровень активности ПБГД эритроидного происхождения остается нормальным и снижается только активность неэритроидной ПБГД.[Mustajoki et al, 1981]. Это объясняется наличием мутаций в первом экзоне гена ПБГД, отсутствующем в эритроидной форме мРНК. Такая картина наблюдалась у голландских пациентов с ОПП, имеющих замену G-A в донорном сайте сплайсинга интрона 1 [Grandchap et al, 1996]. Данный пример еще раз подтверждает, что с помощью биохимической диагностики не всегда можно точно поставить диагноз ОПП, и тогда единственным достоверным способом его уточнения является анализ дефектов гена ПБГД.

1.4.3. Спектр мутаций гена ПБГД

Первые мутации в гене ПБГД были обнаружены в 1989г [Grandchamp et al, 1989]. К настоящему времени в различных популяциях мира выявлено свыше 350 мутаций, приводящих к ОПП (см. приложение). Из всех мутаций наиболее распространены миссенс мутации (34%), приводящие к аминокислотным заменам и мутации сплайсинга (27%) (рис. 6А). Далее следуют делеции (19%), инсерции (12%) и наименее распространенными являются нонсенс мутации (8%). Анализируя спектр известных к настоящему времени мутаций, можно сказать, что они достаточно равномерно распределены по всему гену ПБГД с некоторым преобладанием в экзонах 10 и 12 (рис. 6Б), что, по-видимому, связано с наибольшей протяженностью этих экзонов по сравнению с другими. Длина экзонов 10 и 12 составляет 114пн и 120пн, соответственно. Никаких мутаций, приводящих к ОПП, не обнаружено в экзоне 2. Это связано с тем, что второй экзон присутствует только в мРНК эритроидного типа, у которой иницирующий кодон располагается в начале третьего экзона. На данный момент известна только одна мутация в промоторной области гена (-154delG) [Whatley et al,

2000], которая приводит к нарушению транскрипции. Также хочется отметить работу итальянских коллег, которые обнаружили крупную делецию с инверсией хромосомы 11, затрагивающей ген ПБГД и смежные с ним области. Несмотря на то, что эта крупная инверсия затрагивала и соседние гены, пациенты с такой мутацией не имели никаких других клинических симптомов кроме ОПП [Di Pierro et al 2006].

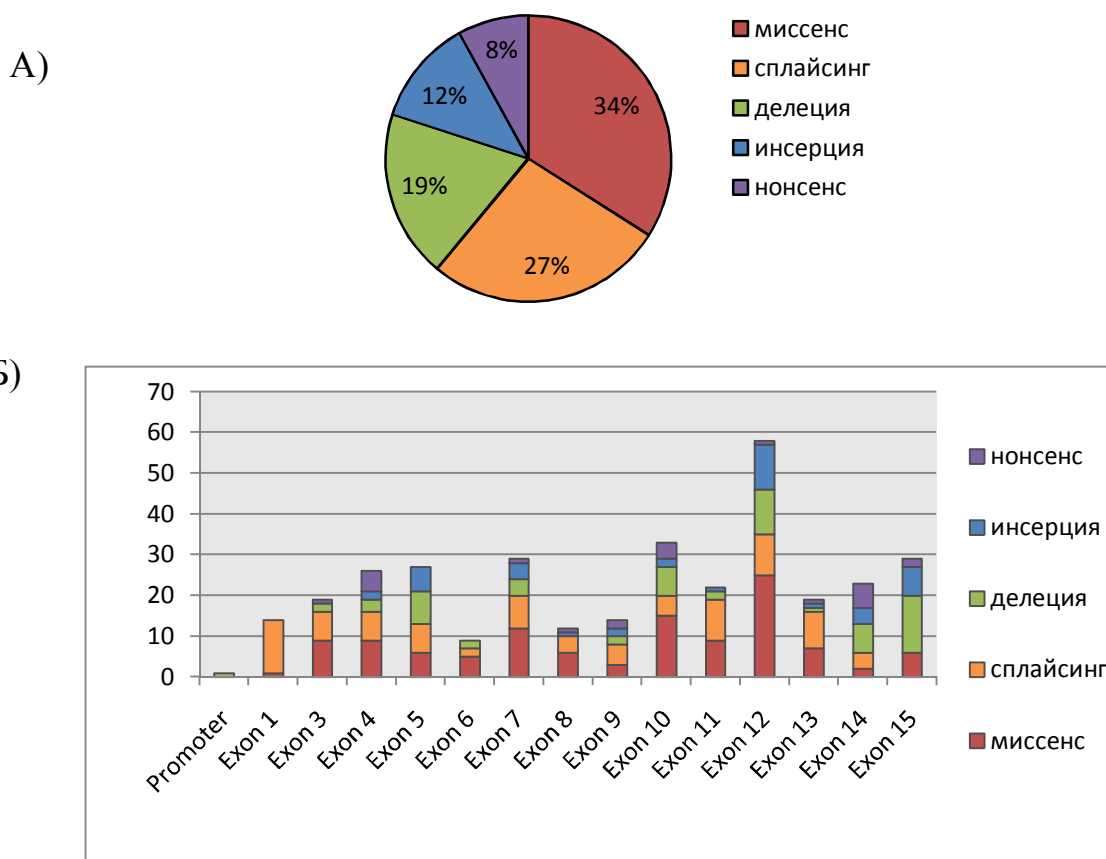


Рис.6

А) распределение мутаций в гене ПБГД, обнаруженных в мировой популяции.

Б) локализация, число и тип мутаций в гене ПБГД, обнаруженных в мировой популяции.

Мутационный фонд гена ПБГД постоянно пополняется за счет возникновения мутаций *de novo*, доля которых для ОПП составляет около 3% [Whatley et al, 1995]. Большинство мутаций уникальны, т.е. обнаружены в единичных семьях, что говорит о высокой гетерогенности генетических дефектов, приводящих к ОПП. Тем не менее, существуют мутации, которые

широко распространены по всему миру и встречаются с повышенной частотой в различных популяциях, как например, миссенс-мутация Arg173Trp. В этом случае речь идет о нарушениях, независимо возникающих в “горячих точках” мутаций (чаще всего это CG-динуклеотиды). Другие мутации могут встречаться с достаточно высокой частотой в отдельных популяциях, как например, делеция 669-698del, найденная только в Испании [Gullen-Navarro et al, 2004]. В этом случае можно говорить о том, что мутация является следствием «эффекта основателя». Кроме вышеупомянутой делеции монофилетическое происхождение было показано для мутации Trp198Term, найденной в Швеции [Lee and Anvert 1991], Trp283Term, обнаруженной у 60 % пациентов из Швейцарии [Schneider-Yin et al, 2002], и Gly111Arg, которая встретила у 12 из 26 неродственных пациентов из Аргентины [De Servi et al, 1999]. Во всех случаях «эффект основателя» был подтвержден с помощью гаплотипирования по известным внутригенным полиморфизмам гена ПБГД, которых к настоящему времени насчитывается около 40. Полиморфизмы гена ПБГД, за редкими исключениями, как например полиморфизмы 3615C>T [Puy et al.1997] и 6479G>T [Gu et al.1991], находящиеся в 4 и 10 экзонах соответственно, локализованы в интронных областях гена.

Очевидной корреляции между типом мутационного нарушения и клинической картиной развития заболевания не наблюдается. При наличии у разных пациентов одной и той же мутации течение болезни может быть как острым, так и ослабленным, с единичными или многократными приступами [Grandchap 1998; Пустовойт и др, 2004]. Однако единого мнения по этому вопросу до сих пор нет, и отдельные исследователи полагают, что некоторые мутации могут вносить определенный вклад в клиническую экспрессию ОПП [Andersson et al, 2000; Floderus et al, 2002; Von und zu Flaundberg et al, 2005].

Все острые порфирии, имея доминантный характер наследования, характеризуются невысокой пенетрантностью (по максимальным оценкам до

10-15%), свидетельствующей о том, что мутация в гене одного из ферментов системы биосинтеза гема является необходимым, но не достаточным условием клинического проявления болезни. Должны существовать какие-то дополнительные генетические факторы, предопределяющие клиническое проявление у гетерозиготных носителей мутантного гена. Интенсивные исследования в области молекулярной генетики острых порфирий ведутся во многих странах мира. В развитых странах организованы общества больных порфириями и специализированные на этой патологии медико-генетические центры, обеспечивающие молекулярно-генетическую диагностику и консультирование больных и их родственников, являющихся бессимптомными носителями заболевания. С 2005 года реализуется Европейский проект [Deybach J.-Ch et al, 2006], направленный на развитие международного сотрудничества в исследовании и лечении порфирий (EPI – European Porphyria Initiative), частью которого является веб-сайт (<http://www.porphyrria-europe.org/>). Многие авторы отмечают, однако, неполноценность современного медико-генетического консультирования острых порфирий из-за невозможности дифференцированного подхода к асимптомным носителям заболевания (особенно, детям и подросткам) и выделения среди них каких-либо групп риска, обусловленной отсутствием информации о дополнительных генетических факторах, сонаследующихся с мутантными генами и принципиально влияющих на патогенез заболевания. Такие факторы в настоящее время обнаружены только для двух доминантно наследуемых порфирических нозологий, не относящихся к острым – эритропоэтическая и поздняя кожная порфирии [Badminton et al, 2005]. Для ЭПП показана определяющая роль в формировании клинического фенотипа сонаследования мутантного гена феррохелатазы с полиморфным аллелем этого же гена дикого типа (полиморфизм Т/С в позиции – 48 интрона 3), в котором активирован криптический акцепторный сайт сплайсинга, генерирующий aberrантную лабильную мРНК [Gouya et al, 1999; Gouya et al,

2004]. Для ПКП показано участие в патогенезе совместного наследования мутантных аллелей основного гена уропорфириногендекарбоксилазы и распространенного мутантного варианта C282Y гемохроматозного гена HFE [Brady et al, 2000], а также полиморфизма Thr 461Asp в кодоне гена CYP1A1 [Gardlo et al, 2003] и генотипа A/A по C/A-полиморфизму в интроне 1 гена CYP1A2 [Christiansen et al, 2000]. Ни для одной из острых печеночных порфирий никаких дополнительных генетических факторов не выявлено. Как уже говорилось выше, для развития клинической картины ОПП необходимо воздействие по крайней мере, одного из ряда провоцирующих факторов, имеющих экзогенную или гормональную природу. В различных исследованиях последних лет показано, что практически все широко распространенные заболевания, включая почти 90% всех онкологических заболеваний, в той или иной степени связаны с неблагоприятными внешними факторами. В зависимости от особенностей генома различные индивидуумы могут сохранять устойчивость или, наоборот, обнаруживать повышенную чувствительность к повреждающим агентам [Nebert, 1997; Nebert and Carvan, 1997].

Острую перемежающуюся порфирию можно считать моногенным заболеванием только в первом приближении. Наличие мутации в гене ПБГД является необходимым, но не достаточным условием для клинической манифестации заболевания. Даже в пределах одной семьи могут наблюдаться значительные вариации от асимптомного носительства до тяжелых проявлений болезни. При этом порфириногенные факторы столь многочисленны и разнообразны, что любой человек сталкивается с теми или иными из них достаточно часто. Поэтому объяснить асимптомное носительство ОПП, которое может продолжаться в течение всей жизни человека тем, что он с этими факторами не сталкивался, вряд ли возможно. По всей вероятности, в случае ОПП, также как для ЭПП и ВКП, помимо наличия основной мутации в гене ПБГД должны существовать

дополнительные генетические детерминанты, влияющие на развитие заболевания. В качестве одной из гипотез мы рассматривали возможное участие аномальных аллелей генов системы детоксикации в патогенезе ОПП, поскольку с одной стороны клиническое проявление болезни определяется накоплением токсичных промежуточных продуктов биосинтеза гема, а с другой – к порфириногенным факторам относятся многие ксенобиотики (лекарственные препараты, алкоголь и др.). В настоящее время интенсивно ведутся работы по созданию «генетического паспорта», индивидуального для каждого человека [Баранов и др, 2000; Баранов и др, 1999]. Тестирование обширного набора дефектов системы генов «предрасположенности» позволяет проводить досимптоматическую диагностику многих заболеваний, оценивать терапевтическое действие лекарственных препаратов, а также правильно организовывать образ жизни человека в гармонии с возможностями собственного генома. Гены «предрасположенности» условно можно разделить на три группы [Баранов и др, 2000]:

- Гены детоксикации ксенобиотиков или гены «внешней среды».

Данные гены контролируют синтез ферментов, отвечающих за детоксикацию ксенобиотиков, к которым относятся любые чужеродные вещества, включая фармпрепараты, поступающие в организм [Кулинский, 1999].

- Гены-триггеры.

Белковые продукты данных генов играют важную роль во многих биохимических реакциях, особенно часто в механизмах активации и дегидратации естественных метаболитов (например, аминокислот)

- Гены рецепторов.

Эту группу образуют гены, кодирующие мембранные белки, которые регулируют внутриклеточное поступление ксенобиотиков и инфекционных агентов.

Далее рассмотрены некоторые представители первой группы, которые были исследованы в данной работе.

1.5. Система детоксикации ксенобиотиков и ее гены

Большинство ксенобиотиков, попадая в организм, не оказывают прямого биологического эффекта и вначале подвергаются различным превращениям, так называемой биотрансформации. Под биотрансформацией понимают ферментативное превращение жирорастворимых экзогенных или эндогенных соединений в полярные водорастворимые метаболиты, легко выводимые из организма. В процессе биотрансформации ксенобиотики, как правило, превращаются в менее активные метаболиты. Однако промежуточные продукты биотрансформации могут быть более токсичными, чем исходные соединения. Происходит так называемая токсификация ксенобиотиков, например, превращение хлороформа в сильнейший печеночный яд – фосген [Кулинский, 1999]. Биотрансформация ксенобиотиков является трехступенчатым процессом, включающим в себя активацию (фаза 1), детоксикацию (фаза 2) и выведение из организма (фаза 3), в котором одновременно или поочередно участвуют многие ферменты системы детоксикации.

Эффективность действия всей системы детоксикации обеспечивается слаженной работой ферментов каждой фазы. Десинхронизация их активности может быть причиной оксидативного стресса, токсичности или мутагенности.

Фаза 1 (активации) обеспечивается, главным образом, суперсемейством цитохромов P-450, а также многочисленным семейством нецитохромных

окислителей (эстеразы, амидазы, алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы и др.). Их основные функции заключаются в присоединении к молекуле ксенобиотика гидрофильных групп, благодаря чему происходит детоксикация десятков тысяч веществ. Активные промежуточные электрофильные метаболиты являются основным субстратом для ферментов фазы 2. Важной особенностью системы ферментов фазы 1 является ее избирательная локализация и высокая мощность на главных путях поступления ксенобиотиков в организм – пищевом (печень, ЖКТ) и дыхательном (легкие, бронхи).

Главным назначением фазы 2 является нейтрализация (детоксикация) гидрофильных и зачастую токсичных продуктов фазы 1 при помощи различных гидролаз и трансфераз. Ферменты фазы 2, в отличие от ферментов фазы 1, существуют во всех клетках, т.е. функционируют при любых путях поступления ксенобиотиков, осуществляют или завершают детоксикацию. В этой фазе принимают участие глутатионтрансферазы, глюкуронилтрансферазы, сульфотрансферазы, ацетилтрансферазы и др., которые превращают токсические промежуточные продукты метаболизма фазы 1 в полярные, водорастворимые, нетоксичные соединения, подлежащие выведению из организма. Одними из представителей ферментов фазы 2 являются ферменты суперсемейства глутатион-S-трансферазы, которым принадлежит важная роль внутриклеточных переносчиков билирубинов, гормонов. Они также участвуют в биосинтезе некоторых физиологически активных веществ, таких как, простагландин [Саприн и Калинина, 1999; Nebert 1997]. В фазе 3 биотрансформации (эвакуация) осуществляется выведение из организма продуктов детоксикации через легкие, почки, кишечник. Активная секреция ксенобиотиков или их метаболитов в мочу, желчь и кишечник осуществляется гликопротеином-P (белок множественной лекарственной устойчивости-multi-drug-resistance protein), а

также транспортерами органических анионов и катионов [Баранов и др, 2000].

Все ферменты системы детоксикации отличаются высоким полиморфизмом и существуют в большом количестве изоформ с различающейся и перекрывающейся субстратной специфичностью. Совместное функционирование первых двух фаз детоксикации обеспечивает обезвреживание десятков тысяч ксенобиотиков всех химических классов [Саприн и Калинина, 1999]. Десинхронизация процесса детоксикации может наступить вследствие одновременного действия разных ксенобиотиков или в результате неблагоприятного сочетания в организме разных по своей активности изоформ ферментов детоксикации, в результате чего возникает повышенная чувствительность организма к различным ксенобиотикам.

1.5.1. Гены и ферменты фазы I детоксикации ксенобиотиков

1.5.1.1. Цитохромы P-450

Для обозначения цитохромов P450 используют аббревиатуру CYP (cytochrome P450). Суперсемейство цитохромов P450 подразделяется на семейства, подсемейства и индивидуальные гены. Белки, имеющие более 40% гомологии аминокислотных последовательностей объединяют в одно семейство, а имеющие более 60% гомологии – в одно подсемейство [Daly, 1995]. Цитохромы P-450 осуществляют не только метаболизм ксенобиотиков, но и участвуют в синтезе стероидных гормонов, холестерина, желчных кислот. Цитохромы P-450 являются гемопротейнами и в восстановленной форме связывают монооксид углерода с образованием комплекса с максимальным поглощением света при длине волны 450.

Наибольшее количество разнообразных ферментов этого суперсемейства находится в гепатоцитах, несколько меньше содержится в клетках кишечника, почек, легких, надпочечниках, головном мозге, коже,

плаценте, миокарде. Важнейшим свойством *CYP* является способность метаболизировать практически все известные химические соединения. Наиболее важной реакцией при этом является гидроксилирование. На данный момент выделено более 1000 различных изоформ цитохромов Р-450 [Кукес, 2004].

1.5.1.2. Цитохром Р-450 1A1(*CYP1A1*).

Изоферменты семейства *CYP I* метаболизируют многие лекарственные средства и полициклические ароматические углеводороды. Одним из первых в этом семействе был охарактеризован ген *CYP1A1*. Он локализован на хромосоме 15 в локусе 15q22-q24 и кодирует фермент арилуглеводородкарбоксилазу, представляющий собой белок, состоящий из 512 аминокислотных остатков и имеющий массу 58 кД. [Кукес, 2004] Фермент обнаружен в основном в легких, в меньшей степени – в лимфоцитах и плаценте. Арилуглеводородкарбоксилаза участвует в метаболизме эстрогенов - осуществляет гидроксилирование эстрадиола, что приводит к его активации [Badawi et al, 2001].

Как и многие другие представители семейства цитохромов Р450, ген *CYP1A1* является полиморфным. Наиболее хорошо изученные полиморфные варианты гена *CYP1A1* приведены на рис 7.

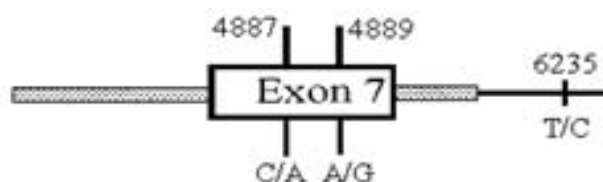


Рис.7 Полиморфные сайты *CYP1A1*

Один из полиморфных сайтов представляет собой трансверсию *T* на *C* в позиции 6235 в 3'-фланкирующей последовательности гена *CYP1A1*. Другие

два полиморфных сайта находятся в седьмом экзоне, один из них содержит замену *A* на *G* в позиции 4889, которая является причиной замещения *Ile* на *Val* в кодоне 462[Hayashi et al, 1992]; другой содержит замену *C* на *A* в позиции 4887, что приводит к замещению *Thr* на *Asp* в кодоне 461.

Наличие полиморфизма в гене *CYP1A1* может приводить к изменению ферментативной активности *CYP1A1*, что, в свою очередь, модулирует риск развития различных мультифакториальных заболеваний. Так, полиморфизм *Ile462Val* встречается почти у 7% представителей европеоидной расы и рассматривается как фактор риска возникновения рака легких [Daly, 1995]. В случае полиморфного варианта *Thr461Asp* была выявлена четкая ассоциация с развитием эндометриоза [Arvanitis et al, 2003]. Кроме того, как уже говорилось выше, немецким исследователям удалось найти ассоциацию между полиморфизмом *Thr 461Asp* гена *CYP1A1* и развитием поздней кожной порфирии.

1.5.1.3. Цитохром P-450 2E1(CYP2E1).

Ген *CYP2E1* находится на хромосоме 10 в локусе 10q24.3-qter и кодирует белок, состоящий из 493 аминокислотных остатков и имеющий молекулярную массу 56 кД. Фермент обнаружен в основном в печени и составляет около 7% от всех изоферментов цитохромов P-450 [Кукес, 2004].

CYP2E1 вовлечен в биотрансформацию как ксенобиотиков, так и эндогенных субстратов [Bauer et al, 2005]. Экзогенными субстратами данного изофермента являются лекарственные средства, а также этанол, нитрозамины, небольшие ароматические углеводороды (бензол, анилин) и алифатические хлоруглеводороды. Индукторами *CYP2E1* являются этанол, изониазид, пиридин и некоторые другие ксенобиотики, а ингибиторами - дисульфирам и ритонавир. Ген *CYP2E1* имеет ряд полиморфных вариантов, однако распространенных мутаций, ведущих к существенному изменению метаболизма ЛП и других ксенобиотиков, не описано [Кукес, 2004].

1.5.2. Гены и ферменты фазы 2 детоксикации ксенобиотиков

Основной функцией фазы 2 метаболизма, как и фазы 1, является увеличение гидрофильности и снижение токсичности ксенобиотиков, путем присоединения к их функциональным группам других групп или молекул (конъюгация). По сравнению с исходными соединениями конъюгаты лучше растворяются в воде и легко выводятся из организма [Кулинский, 1999].

1.5.2.1. Ариламин-N-ацетилтрансферазы (NAT)

У человека известно три гена *NAT*, один из которых является псевдогеном. Два экспрессирующихся гена *NAT1* и *NAT2* расположены на одной хромосоме и кодируют N-ацетилтрансферазу-1 (NAT1) и N-ацетилтрансферазу-2 (NAT2), соответственно. Оба фермента обеспечивают фазу 2 детоксикации и играют важную роль в нейтрализации ксенобиотиков, катализируя перенос ацетильной группы с ацетил-кофермента А (ацетил-CoA) на концевой атом азота арилгидразинов и ариламин-содержащих лекарственных препаратов и канцерогенов. Данная реакция N-ацетилирования представляет собой основной путь биотрансформации ароматических и гетероциклических аминов, содержащих гидразогруппу R-NH-NH₂, которые превращаются в амиды R-NH-COCH₃ или гидразиды R-NH-NH-COCH₃. Типичным примером лекарств, содержащих аминную группу, являются сульфаниламиды, которые включены в список запрещенных препаратов при ОПП, так как, будучи порфириногенами, они могут спровоцировать приступ заболевания. N-ацетилтрансферазы экспрессируются преимущественно в клетках печени, но также они обнаружены в легких, толстом кишечнике, почках и мочевом пузыре [Баранов и др, 2000]. Считается, что NAT2 обладает меньшей специфичностью и метаболизирует более широкий круг веществ, поэтому привлекает большее внимание исследователей [Артамонов и др, 2004].

1.5.2.2. Ариламин-N-ацетилтрансфераза 2 (NAT 2).

Ген *NAT2* локализован на коротком плече хромосомы 8 (8p23.1-21.3), имеет протяженность около 9900 пн., содержит 2 экзона и преимущественно экспрессируется в печени и кишечнике [Кулес, 2004]. Фермент, кодируемый данным геном, представляет собой белок, состоящий из 290 аминокислотных остатков, с молекулярной массой 33 кД, который локализован в цитоплазме.

Кодирующий район гена *NAT2* включает в себя последовательность длиной 701 п.о., которая содержит 16 полиморфных участков, включающих 15 точечных замен (111T/C; 190C/T; 191G/A; 282C/T; 341T/C; 364G/A; 481C/T; 499G/A; 759C/T; 803A/G; 857G/A; 859T/C; 411A/T; 434A/C; 845A/C) и 1 делецию, приводящую к сдвигу рамки считывания (859del) [Артамонов и др, 2004]. Сочетания этих мутаций создают 36 аллельных вариантов гена *NAT2*, при этом каждый из 36 аллелей кодирует фермент с различной скоростью ацетилирования [Артамонов и др, 2004]. В гене *NAT2* выделяют 3 основных «медленных» аллеля *NAT2* (T341C, C481T), *NAT2* (G590A), *NAT2* (G857A) и один «дикий» (немутантный вариант) «быстрого» аллеля *NAT2* (wild type) (рис.8). Сочетание «быстрого» и «медленных» аллелей приводит к формированию «промежуточного» фенотипа ацетилирования.

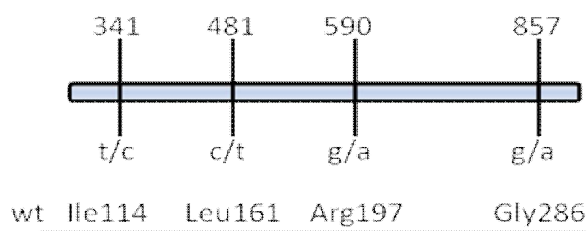


Рис.8. Полиморфизмы гена *NAT2*.

Соотношение «быстрых» и «медленных» ацетиляторов значительно варьирует в популяциях с различным этническим и географическим

происхождением. К наиболее распространенным среди европеоидов «медленным» аллелям относятся аллели NAT2 (T341C) и NAT2 (G590A), аллель NAT2 (G857A) представлен в основном у монголоидов, а аллель NAT2 (G191A) встречается только у негроидов. [Hein et al, 2000]. Из данных литературы известно, что полиморфные варианты гена *NAT2*, которые обуславливают фенотип «медленного» ацетилирования, приводят либо к снижению активности фермента, либо к снижению его стабильности. Так, например, замена Т на С в позиции 341 приводит к аминокислотной замене Ile114Thr и снижает максимальную скорость N-ацетилирования, тогда как замены G на A в позициях 590 (Arg197Gln) и 857 (Gly286Glu) обуславливают образование менее стабильного фермента.

В настоящее время установлена ассоциация полиморфизма гена *NAT2* с различными заболеваниями и различной чувствительностью к лекарственным препаратам [Nebert 1997]. Так, например, наличие «медленного» фенотипа ацетилирования является фактором риска развития рака молочной железы [Ambrosone et al, 1996] и рака мочевого пузыря [Баранов и др, 2000]. Кроме того, генетический полиморфизм *NAT2* может определять токсикологическое и фармакологическое действие лекарственных препаратов, которые подвергаются N-ацетилированию посредством данного фермента. Например, «медленные» ацетиляторы характеризуются более продолжительным фармакологическим эффектом, и, в то же время, обнаруживают повышенную чувствительность к некоторым лекарственным препаратам и побочным иммунотоксическим эффектам ариламинов и гидразинов [Баранов и др, 2000].

1.5.2.3. Глутатион-S-трансферазы (GST).

Глутатион – S- трансферазы катализируют взаимодействие глутамата с различными алифатическими, ароматическими, эпоксидными и гетероциклическими радикалами широкого спектра соединений. Коферментом глутатион -S- трансфераз является глутатион-низкомолекулярный водорастворимый трипептид, который присутствует в высокой концентрации почти во всех клетках, а также вне клеток [Кольман Я, 2000]. Глутатионовая антиоксидантная система эффективно защищает клетки от оксидативного стресса.

Функциональная роль суперсемейства глутатион-S-трансфераз (GSTs) заключается в ферментативной конъюгации сульфгидрильной (SH₂) группы с электрофильными молекулами самих ксенобиотиков или их метаболитов, образовавшимися в процессе фазы 1. Синтез глутатион-S-трансфераз контролируется генами, расположенными на различных хромосомах, для каждого из них описан ряд полиморфных вариантов, которые влияют на функциональную активность ферментов. Полиморфизм ферментов семейства глутатион-S-трансфераз определяет индивидуальную чувствительность организма к воздействию факторов внешней среды [Кукес, 2004].

К настоящему времени у человека описано несколько классов цитозольных глутатион-S-трансфераз: α (GST A), μ (GST M), π (GST P), θ (GST T) и т.д. Деление на классы основано на степени гомологии аминокислотных последовательностей этих ферментов и их иммунореактивности.

1.5.2.4. Глутатион-S-трансфераза класса M.

Среди глутатион-S-трансфераз класса μ выделяют 5 групп: *GSTM1*, *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* и *GSTM5*. Кроме *GSTM2*, которая экспрессируется только в мышцах, остальные представители класса GST определяются в печени, клетках крови, почках, надпочечниках, желудке. Все формы глутатионтрансфераз являются результатом альтернативного сплайсинга гена *GSTM*, который картирован в области 1q13.3. *GSTM1* имеет четыре аллельных варианта: *GSTM1 A*, *GSTM1 B*, *GSTM1 C*, и *GSTM1 0*. Первые два аллеля функционально не отличаются. Аллель *GSTM1 C* встречается в разных популяциях крайне редко. Вариант *GSTM1 0* – нулевой аллель (делеция внутри гена протяженностью около 10 т.п.н.) проявляется как отсутствие фермента *GSTM1*. Гомозиготное носительство делеции гена *GSTM1* (генотип *GSTM1 0/0*, "нулевой" генотип) широко представлено в популяции человека, достигая в некоторых популяционных группах до 50% [Garte et al, 2001]. Многочисленные исследования указывают на ассоциацию генотипа *GSTM1 0/0* с заболеваниями мультифакториальной природы, особенно с онкологическими заболеваниями [Hatajima et al, 2002].

1.5.2.5. Глутатион-S-трансфераза класса T.

Уровень активности фермента глутатион-S-трансферазы класса T почти в 10 раз выше, чем ферментативная активность белков A, M и P классов. Существуют данные о том, что фермент *GSTT1* быстрее связывается с субстратом (ксенобиотиком) и нейтрализует активированные ксенобиотики, а также быстрее, чем другие GST, вступает в новый цикл [Jugonen et al, 1996].

Ген *GSTT1* картирован на хромосоме 22 (22q11.2) [Meyer et al, 1991]. Его основной полиморфизм обусловлен делецией, которая сопровождается формированием двух типов аллелей: функционально активного (*GSTT1 1*) и неактивного или нулевого (*GSTT1 0*). Аллель *GSTT1 0* приводит к отсутствию синтеза фермента. Глутатион-S-трансфераза T может влиять на уровень

эйкозаноидов (гормонов-медиаторов), метаболитов арахидоновой кислоты, через модуляцию уровня свободных радикалов [Fryer et al, 2000]. К эйкозаноидам относятся простагландины, простациклины, тромбоксаны и лейкотриены, которые стимулируют биосинтез стероидных гормонов, гормонозависимые липазы, болевые и воспалительные реакции, сокращение гладкомышечной ткани и агрегацию тромбоцитов [Кольман, 2000].

1.5.2.6. Эпоксидгидролазы.

Эпоксидгидролазы осуществляют промежуточный этап детоксикации, присоединяя воду к образованным цитохромом P450 эпоксидам, превращающимся в трансгидродиолы и далее, под действием других ферментов, в конъюгаты с глюкуроновой кислотой и глутатионом [Артамонов и др.2004; Кукес, 2004]. Выделяют 2 типа эпоксидгидролаз – микросомальные и цитоплазматические. Ферменты обоих типов локализованы преимущественно в печени, но различаются субстратной специфичностью [Артамонов и др.2004].

1.5.2.7. Микросомальная эпоксидгидролаза (*mEPHX1*).

Ген *mEPHX* локализован на хромосоме 1 в локусе 1q42.1. Фермент *mEPHX* состоит из 445 аминокислотных остатков, и имеет молекулярную массу 52 кД.

mEPHX может находиться в двух функционально различных состояниях – «медленном» и «быстром», которые обусловлены однонуклеотидными заменами в 3-м экзоне (мутация T337C(Tyr113His), генотип S/S) и в 4-м экзоне (мутация A415G(His139Arg), генотип F/F). Данные полиморфные варианты четко коррелируют с уровнем ферментативной активности *mEPHX*. Полиморфизм Tyr113His характеризуется снижением активности фермента у гомозигот (генотип S/S) на 50% и на 25% у гетерозигот (генотип S/N). Также “низкая” активность фермента наблюдается у гомозигот или

гетерозигот His113 в комбинации с гомозиготами His139. «Промежуточную» активность фермента имеют гомозиготы Tyr113 и His139 или гетерозиготы Tyr113 и His139. У гомозигот Arg139 и гетерозигот Arg139 в комбинации с гомозиготами Tyr113 проявляется «высокая» активность фермента [Zusterzeel et al, 2001]. Показано, что «медленный аллель» гена *mEPHX1* встречается примерно у 6% европейцев и приводит к нарушению процесса окисления ксенобиотиков.

ГЛАВА II

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В настоящей работе представлены результаты обследования 75 неродственных больных с диагнозом ОПП и их родственников (всего 236 человек).

Регионы проживания

Российская федерация (больных): Москва – 17; Московская область – 9; Свердловская область – 5; Самарская область – 3; респ.Чувашия – 4; респ.Татарстан – 3; Ярославская область – 1; Тверская область – 3; Брянская область – 1; Краснодарский край – 1; респ.Якутия – 1; Тюменская область – 2; респ.Коми – 1; Нижегородская область – 1; респ.Дагестан – 1; Калужская область – 1; Пензенская область – 1; респ.Мордовия – 1; Тульская область – 1; Сахалинская область – 1; Астраханская область – 1; респ.Удмуртия – 1; Вологодская область – 1; Ульяновская область – 1; Курская область – 1; Воронежская область – 1; Кировская область – 1; Калининградская область – 1; Челябинская область – 1; Волгоградская область – 1; Владимирская область – 1; Приморский край – 1; Тамбовская область – 1; Саратовская область – 1.

Зарубежные страны:

респ.Украина – 2; респ. Хорватия – 1.

Дифференциальный диагноз ОПП устанавливали на основе сочетания характерных клинических признаков с увеличенным содержанием порфиринов и их предшественников в моче, нормальным содержанием общих порфиринов в кале и сниженной активностью ПБГД в эритроцитах [Пустовойт и др, 2004]. Данные по клинической характеристике больных, использованные в работе, были предоставлены к.м.н. Пустовойтом Я.С.

2.1. Выделение ДНК и РНК.

ДНК и РНК выделяли из ядерных клеток периферической крови. Для выделения ядросодержащих клеток периферическую кровь (5мл) смешивали в соотношении 1:10 с 0,8%-ным раствором хлорида аммония (NH_4Cl) с целью селективного лизиса эритроцитов, выдерживали 2 минуты во льду и осаждали нелизированные ядерные клетки центрифугированием (1500 об/мин 20 минут, при температуре $+4^\circ\text{C}$). Супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в 1 мл раствора STE (раствор NaCl -трис-ЭДТА) и переносили по 0,5 мл в пробирки «эппендорф» объемом 1,5 мл для последующего выделения ДНК и РНК.

Геномную ДНК выделяли по стандартной методике, включающей обработку протеиназой К (200 мкг/мл) и додецилсульфатом натрия (0,5%) в течение ночи при температуре 37°C или 3-4 часов при 55°C . К полученному лизату добавляли 0,5 мл фенола, суспендировали в течение 5 минут и разделяли фазы с помощью центрифугирования (12000 об/мин, 10 мин, при комнатной температуре). Верхнюю водную фазу отбирали в отдельный «эппендорф» объемом 1,5 мл и добавляли 0,5 мл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24:1). Полученную смесь суспендировали в течение 5 минут, затем разделяли фазы с помощью центрифугирования (12000 об/мин, 10 минут, при комнатной температуре). Верхнюю водную фазу отбирали в отдельный «эппендорф» объемом 1,5 мл, для осаждения ДНК к ней добавляли 3М ацетат натрия (1/10 объема) и 96%-ный этанол (2,5 объема), выдерживали 2 часа при температуре -20°C и центрифугировали (12000 об/мин, 10 мин, при комнатной температуре). Полученный осадок ДНК промывали 80%-ным этанолом. С целью длительного хранения ДНК к осадку добавляли 0,6 мл 80%-ного этанола и хранили при температуре -20°C . Для использования в ПЦР осадок ДНК высушивали и растворяли в 50-100 мкл деионизованной воды.

Тотальную РНК из ядерных клеток периферической крови выделяли при помощи лизиса в гуанидин-изотиоцианатном буфере (4М). К лизату ядерных клеток объемом 0,5 мл добавляли равный объем фенола, 35 мкл 3М ацетата натрия (рН=5) и 120 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (49:1). Полученную смесь инкубировали в течение 15 минут при температуре +4°C, затем разделяли фазы с помощью центрифугирования (12000 об/мин, 10 мин, при комнатной температуре). Верхнюю водную фазу отбирали в отдельный «эппендорф» объемом 1,5 мл, добавляли равный объем изопропилового спирта и инкубировали в течение 8-ми часов при температуре -20°C. После этого для получения осадка тотальной РНК пробирку центрифугировали (12000 об/мин, 10 мин при комнатной температуре). Полученный осадок промывали 80%-ным этанолом и центрифугировали 2 минуты при 12000 об/мин. Спирт убирали. С целью длительного хранения РНК к осадку добавляли 1 мл 80%-ного этанола и хранили при температуре -70°C. Для использования в ОТ-ПЦР осадок РНК высушивали и растворяли в 50 мкл деионизированной воды.

2.2. ОТ-ПЦР.

Реакцию обратной транскрипции проводили в течение 1 часа при 37°C в 20 мкл реакционной смеси, содержавшей 1-2 мкг тотальной РНК, буфер (“Promega”), смесь 4 dNTP (1 мМ по каждому), 15 пмоль праймера pp15ga, 40 ед. акт. РНКазина (“Promega”) и 200 ед. акт. обратной транскриптазы (“Promega”).

ПЦР проводили в стандартной смеси (25мкл), содержавшей 20 мМ трис-НСl, рН 8.9, 15 мМ сульфат аммония, 170 мкг/мл BSA, смесь dNTP (200 мкМ по каждому), 2 мМ хлористый магний, по 15 пмоль каждого из праймеров и 2 ед. активности Taq-полимеразы, в две стадии (“nested” PCR): ПЦР I - с аликвотой ОТ-смеси (2 мкл) в качестве матрицы и парой внешних

праймеров pp1d (или pp2d) и pp15ra в режиме : 94°C 1 мин., 56°C 1 мин., 72°C 3 мин., 30 циклов; ПЦР II - с аликвотой ПЦР I-смеси (2 мкл) и парой внутренних праймеров pp1da и pp15rb в режиме - 94°C 1 мин., 62°C 1 мин., 72°C 3 мин., 30 циклов.

2.3. ПЦР.

Амплификацию фрагментов гена ПБГД, содержащих отдельные экзоны с фланкирующими их интронными последовательностями, проводили с использованием в качестве матрицы ядерной ДНК (0,1-0,2 мкг) в описанной выше реакционной смеси с парами праймеров, приведенными в таблице 1, в универсальном режиме - 94°C 1 мин., 60°C 1 мин., 72°C 3 мин., 30 циклов.

Таблица 1. Праймеры, использованные для ОТ-ПЦР, ПЦР и секвенирования фрагментов кДНК и гена ПБГД

Название	Структура	Локализация	Позиция*
Праймеры для ОТ-ПЦР			
pp1d	CCCACACACAGCCTACTTTCC	экзон 1	1070-1089
pp2d	GTCCTACTATCGCCTCCCTC	экзон 2	4081-4100
pp1da	CCTACTTTCCAAGCGGAGCC	экзон 1	1081-1100
pp1db	GCCATGTCTGGTAACGGCAA	экзон 1	1098-1117
pp15ra	TAATCACTCCCCAGATAGCA	экзон 15	9437-9418
pp15rb	GGGATGTAGGCACTGGACAGC	экзон 15	9394-9374
Праймеры для ПЦР			
pp1-1	GCCTATTTCAAGGTTGTAGCA	5'-область	769-789
pp1-2	ATGGCAACCTGGGGCCAATC	интрон 1	1208-1189
pp3-1	ACACTAGAAACAGAGGGGAC	интрон 2	4270-4289
pp1m	GCAGGAAGAAAACAGCCCGAAG	экзон 3	4310-4332
pp4-2	ACGGGCTTTAGCTATAGGCA	интрон 4	4864-4845
pp47m	GGTAAACAGGCTTTTCTCCACAAT	экзон 6	5300-5276
pp6-2	GCAAGAGACCTAGCATACTA	интрон 6	5403-5384
pp7-1	CTCATACCCTTTCTCTTTGCC	интрон 6	5702-5722
pp119m	GTGGTGGGAACCAGCACCT	экзон 9	6250-6270
pp9-2	GCTGTCTCCGTCACTCTTCC	интрон 9	6376-6357
pp10	GCTGAGAGCTGGAAGATGAC	интрон 9	7351-7370
pp10-2	AAGGAGATGCAGATGAGCTG	интрон 10	7630-7611
pp11-1	GGAACCTCCCATCTCACTGCC	интрон 10	8106-8125
pp155m	CCTAGGATGTTTTTCCATCC	интрон 11	8442-8462
pp12-2	CAGCTCTCCAAGTCCCCAGC	интрон 12	8628-8609
pp 28m	TAAGAGCCCTTGCACTCCCCA	интрон 12	8779-8800
pp14-1x	GCATTTCTTCCTGTGCATCC	интрон 14	8917-8937
pp15r	AGTGATGCCTACCAACTGTG	экзон 15	9212-9193
pp15-2	CCTATCTTCCCGCCAACCTCC	3'-область	9642-9623
Праймеры для секвенирования			
pp3d	AGATGAGAGTGATTCGCGTG	экзон 3	4331-4350
pp3	CCACCCCATCTCCTTCATAC	интрон 3	4480-4461
pp4	GCCCCTTCTCATGCCAGAT	интрон3	4575-4594
pp5-6	CCCCATCATGAATCGTAGCA	интрон 4	5059-5078
pp7	TCTGCCACCAGTCAACACTC	интрон 7	5950-5931
pp8-9	CGAGAGAGAATAGAGGTGAT	интрон 7	5981-6000
pp10-1	GCAGAGGGAACCGCACGAGG	интрон 9	7409-7428
pp12	AAAAGGCGCTGGGGAGCAAG	интрон 11	8363-8382
pp11	CACCTCTATCTACTTGCTCC	интрон 11	8394-8375
pp13-14	CTCAGGTCTGTGGTCACAGG	интрон 12	8751-8770
pp14r	GACTCCAGACTCCTCCAGTC	интрон 14	9020-9001
pp14-1	TTCTAGGTAGTCCCCTCTCA	интрон 13	8941-8960

*- GenBank NCBI Acc.№M95623

2.4. Электрофорез в полиакриламидном геле.

Анализ полученных ПЦР-фрагментов осуществляли при помощи электрофореза в 6%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), приготовленном на трис-боратном буфере (ТВЕ) в аппарате для вертикального электрофореза. Буфер для нанесения проб содержал 0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксиленцианола и 15% глицерина. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили в 1х ТВЕ при удельном напряжении 150 В/см. Гель окрашивали водным раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл), просматривали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе «VILBER LOURMAT» и фотографировали в системе видео-гель-документации («DigiDoc-It System»)

2.5. Выделение ПЦР- и ОТ-ПЦР-фрагментов и определение их первичной структуры.

ПЦР- и ОТ-ПЦР-фрагменты очищали для секвенирования с помощью электрофореза в 6%-ном полиакриламидном геле. Для этого участки геля, содержащие необходимые фрагменты, вырезали, тщательно растирали и суспендировали в 400 мкл высокосолевого элюирующего буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl pH 8.0, 1.0 М NaCl, 2 мМ ЭДТА. Образцы инкубировали при температуре +55°C в течение ночи, затем осколки геля осаждали с помощью центрифугирования в течение 5 мин при 12000 об/мин. Супернатант переносили в другую пробирку, осаждали элюированную ДНК тремя объемами 96%-ного этанола с 3-кратным вымораживанием в жидком азоте и центрифугировали 15 мин при 12000 об/мин. Супернатант удаляли, полученный осадок промывали 70%-ным этанолом, высушивали и растворяли в 20 мкл деионизированной воды. Качество препаративного выделения ПЦР-фрагмента проверяли с помощью электрофореза в 6%-ном ПААГ, используя 2 мкл приготовленного материала. В начале наших исследований секвенирование проводили вручную по модифицированному

методу Сэнгера [Tagiev A.F.] с использованием системы "Macrophone" (Sweden) (исследование выполнялось совместно с сотрудниками лаборатории генной инженерии ГНЦ РАМН с.н.с. В.Л.Суриным, к.б.н. А.В.Лукьяненко).

С 2005 года секвенирование проводили в ЦКП "Геном" ИМБ РАН с помощью набора реактивов ABI PRISM®BigDye™Terminator v.3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant.

2.6. Рестрикционный анализ мутаций.

Рестрикционный анализ ПЦР-фрагментов на наличие в них мутаций проводили в реакционной смеси (10 мкл), содержащей 5 мкл ПЦР-смеси, 1 мкл 10-кратного буфера, поставляемого вместе с ферментом, 3 мкл воды и 2 ед. активности соответствующей рестрикционной эндонуклеазы фирмы "Сибэнзим" в объеме 1 мкл. Продукты гидролиза анализировали при помощи ЭФ в 6%-ном ПААГ.

2.7. Анализ SNP и гаплотипов гена ПБГД.

Используя полимеразную цепную реакцию, мы анализировали 12 известных внутригенных SNP: -234 т/с (rs686624 в базе данных SNP/NCBI) в промоторной области, -64 с/т (rs589925) в промоторной области, 2377 с/а (rs1799993) и 2479 г/а (rs474201) в интроне 1, 3530 с/т (rs1144041) в интроне 3, 3581 г/а (rs17075) в интроне 3, 3982 с/т (rs549893) в интроне 4, 5237 г/а (rs4272791) в интроне 9, 7064 с/а (rs1784304) в интроне 10, 7539 с/т (rs28990986) в интроне 12, 8578 г/а (rs640603) и 8693 с/т (rs12276235) в 3'-области гена ПБГД. (табл. 2) Нуклеотиды были пронумерованы, начиная с первой буквы иницирующего кодона АТГ для всеканевой изоформы (+1). Амплификацию фрагментов гена ПБГД проводили как описано выше с парами праймеров, указанных в таблице 2. Рестрикционный анализ ПЦР-продуктов осуществляли также по описанной выше схеме, с использованием соответствующих рестрикционных эндонуклеаз (табл.2). В анализ были

включены больные и их родственники из 19 семей. Всего было обследовано 63 человека.

Таблица 2. Праймерные системы, использованные для гаплотипирования гена ПБГД.

SNP	Сочетания праймеров и их структура	Размер ПЦР-продукта (пн)	Эндонуклеаза рестрикции
-234 T/A	pp1-1(GCCTATTTCAAGGTTGTAGCA)/ pp234R (AGTGGACCTCCCCATTCGAG)	119	AluI
-64T/C	pp1-1x(GAGTCAGACTGTAGGACGAC)/ pp1-2 (ATGGCAACCTGGGGCCAATC)	233	MnII
2377A/C	ppSNP1D (GACCTCCGTCTTAGACTGAA/ ppSNP1R (TACAGTCCTGCTCAGCCTCT)	376	AsuHPI
2479G/A	-/-	-/-	MspR9I
3530 C/T	pp4 (GCCCCTTCTCATGCCCAGAT)/ pp4-2(ACGGGCTTTAGCTATAGGCA)	291	Acc36I
3581G/A	pp3-1 (ACACTAGAAACAGAGGGGAC)/ pp4-2 (ACGGGCTTTAGCTATAGGCA)	595	BsoMAI
3982C/T	pp5-6(CCCCATCATGAATCGTAGCA)/ pp6-2(GCAAGAGACCTAGCATACTA)	345	AspLEI
5237 G/A	pp8-9(CGAGAGAGAATAGAGGTGAT)/ pp9-2(GCTGTCTCCGTCACTCTTCC)	396	DraI
7064C/A	pp11-1 (GGAACCTCCATCTCACTGCC)/ pp12-2 (CAGCTCTCCAAGTCCCCAGC)	523	Hinfl
7539 C/T	pp12du (GAGACTCTGCTTCGCTGCAT)/ pp12dr(GCATTTCATGTAAGAAATCTTCCC)	130	Rsa I
8578G/A	pp3endD (GAGTTGGCGGGAAGATAGGA/ pp3endR (GGCTCTACTGTAACTGAAGG)	211	MnII
8693 C/T	-/-	211	DraI

2.8. Секвенирование полноразмерного гена ПБГД.

Полноразмерный ген ПБГД амплифицировали в виде 15-ти перекрывающихся фрагментов длиной от 580 до 1100 пн (табл.3). Для секвенирования использовали те же праймеры, что и для амплификации. Прочитанная нуклеотидная последовательность охватывала область между позицией - 616 с 5'-стороны от сайта кэпирования и позицией 209 с 3'-стороны от сайта полиаденилирования (соответствуют позициям 1748 и 11107 в GenBank NCBI NT_033899) и имела общую протяженность 9360 пн.

Таблица 3. ПЦР-системы, использованные для определения первичной структуры полноразмерного гена ПБГД.

Система праймеров	Позиция в GenBank NCBI NT_033899	Область гена	Размер, пн
pp5end CTCTCTGAACCAGTTTCCTC pp1-2 ATGGCAACCTGGGGCCAATC	1721-1740 2504-2485	5'-область интрон 1	784
pp1-1 GCCTATTTCAAGGTTGTAGCA pp1Dr CCTCCACCAGCTCTGCAGTT	2065-2085 3081-3062	5'-область интрон 1	1017
pp1Dd CACACCTACTGAATTACTACC pp1Cr CTGGTCTACTCCATGTGATC	2970-2990 3612-3593	интрон 1 интрон 1	643
pp1Cd GACCTTAGAGTCCTTTCTGT pp1Br TTTGAGACAGAGTCTCCCTC	3481-3500 4229-4210	интрон 1 интрон 1	749
pp1BdGGAACATACATAGGATGAACATC pp1Ar ACAGTGGGGAAAGCTGACAG	4243-4264 5016-4997	интрон 1 интрон 1	774
pp1Ad AGCAGGACTGTACGTCAGAT pp2R AGCTGAGTCTCAGAGTGGGG	4921-4940 5500-5481	интрон 1 интрон 2	580
pp2D GTCCTACTATCGCCTCCCTC pp5R CAGTATCAAGAATCTTGTCCTC	5384-5403 6483-6462	экзон 2 экзон 5	1100
pp5-6 CCCCATCATGAATCGTAGCA pp7 TCTGCCACCAGTCAACACTC	6362-6381 7253-7234	интрон 4 интрон 7	892
pp7-1 CTCATACCCTTTCTCTTTGCC pp9-2 GCTGTCTCCGTCACTCTTCC	7005-7025 7679-7660	интрон 6 интрон 9	675
pp8i CTCATTGTAACCTTCTCTCTGG pp9Ri AAACCTTCCCTGACACCCCA	7528-7548 8460-8441	интрон 8 интрон 9	933
pp9Di TAGTATGTGCTAAGTGCTCC pp10-2x TGGGGATGACTGTAAGGCAG	8361-8380 8955-8936	интрон 9 интрон 10	595
pp10D CCATCATCCTGGCAACAGCT pp11 CACCTCTATCTACTTGCTCC	8831-8850 9699-9680	экзон 10 интрон 11	869
pp11-1 GGAACCTCCCATCTCACTGCC pp14r GACTCCAGACTCCTCCAGTC	9411-9430 10325-10306	интрон 10 экзон 14	915
pp14-1x GCATTTCTTCTGTGCATCC pp3endRCCGAGATGACAATTGACTTCC	10221-10240 11139-11119	интрон 13 3'-область	919

2.9. Исследование полиморфизмов генов детоксикации.

Данная часть исследования проводилась в тесном сотрудничестве с д.м.н. Иващенко Т.Э. (лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний человека ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, г. Санкт-Петербург., рук. чл. корр. РАМН Баранов В.С.).

С использованием полимеразной цепной реакции были изучены генетические полиморфизмы 2-х генов фазы 1 системы детоксикации (*CYP1A1*, *CYP2E1*) и 4-х генов фазы 2 (*GSTM1*, *GSTT1*, *NAT2*, *mEPHX1*). Исследования проводили на образцах ДНК, выделенных из лимфоцитов периферической крови. Амплификацию фрагментов генов детоксикации проводили как описано выше с парами праймеров, указанных в таблице 4.

Таблица 4. Праймерные системы, использованные для исследования генов детоксикации.

Ген	Полиморфизм	Сочетание праймеров	Размер ПЦР-продукта	Эндонуклеаза рестрикции
<i>CYP1A1</i>	A2455G (Ile462Val)	F:GAACTGCCACTTCAGCTG TCT/ R:GAAAGACCTCCCAGCGGTCA	187 пн	Hinc II
<i>CYP2E1</i>	G1259C	D:CCAGTCGAGTCTACATTGTCA/ R:TTCATTCTGTCTTCTAACTGG	410 пн	RsaI
<i>NAT2</i>	C481T	F:GCTGGGTCTGGAAGCTCCTC/ R:TTGGGTGATACATACACAAGGG	547 пн	KpnI
	G590A		547 пн	TaqI
	G857A		547 пн	BamHI
<i>mEPHX1</i> экзон 3	T337C (Tyr113His)	F:GATCGATAAGTTCCGTTTCACC/ R:ATCCTTAGTCTTGAAGTGAGGAT	162 пн	EcoR V
<i>mEPHX1</i> экзон 4	A415G (His139Arg)	F:ACATCCACTTCATCCACGT/ R:ATGCCTCTGAGAAGCCAT	210 пн	Rsa I
<i>GSTM1</i>		F:GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC/ R:GTTGGGCTCAAATATACGGTGG	271 пн	
<i>GSTT1</i>		F:TTCTTACTGGTCCTCACATCTC/ R:TCACCGGATCATGGCCAGCA	315 пн	

Условия проведения ПЦР представлены в таблице 5.

Таблица 5. Условия проведения ПЦР.

Ген	Денатурация	Денатурация	Отжиг	Синтез	Синтез
	1 цикл	30 циклов			1 цикл
<i>CYP1A1</i> <i>CYP2E1</i>	94 ⁰ С-5мин	94 ⁰ С-45с	57 ⁰ С -45 с	72 ⁰ С-45 с	72 ⁰ С-7мин
<i>NAT2</i>	95 ⁰ С-4мин	95 ⁰ С-50с	52 ⁰ С -50 с	72 ⁰ С-1 мин	72 ⁰ С-3мин
<i>mEPHX1</i> (экзон3)	94 ⁰ С-5 мин	94 ⁰ С-45с	62 ⁰ С -45 с	72 ⁰ С-45 с	72 ⁰ С-3мин
<i>mEPHX1</i> (экзон4)	94 ⁰ С-5 мин	94 ⁰ С-45с	62 ⁰ С -45 с	72 ⁰ С-45 с	72 ⁰ С-3мин
<i>GSTM1</i> <i>GSTT1</i>	95 ⁰ С-4 мин	95 ⁰ С-40 с	60 ⁰ С- 40 с	72 ⁰ С-40 с	72 ⁰ С-5мин

Для определения полиморфных вариантов генов *NAT2*, *CYP1A1*, *CYP2E1*, *mEPHX1* продукты ПЦР подвергали рестрикционному анализу по описанной выше схеме, с использованием соответствующих рестрикционных эндонуклеаз (табл. 4). Продукты гидролиза анализировали при помощи ЭФ в 6%-ном ПААГ.

При анализе делеций в генах глутатион-S-трансфераз гомозиготы и гетерозиготы по нормальному аллелю “+” определяли на электрофореграммах по наличию продукта амплификации размером 271 п.н. (*GSTM1*) и 315 п.н. (*GSTT1*). Отсутствие соответствующих фрагментов указывало на гомозиготность индивидуума по делеции обоих аллелей. В качестве внутреннего контроля использовали амплификацию фрагмента гена *CYP1A1*. Гетерозиготные особи 0/+ в наших экспериментах не идентифицировались.

2.10. Математические методы анализа.

Математическую обработку результатов исследования генов детоксикации проводили с использованием программы Statistica v. 5.0. Определение соответствия частот генотипов в популяциях равновесию Харди-Вайнберга проводили методом χ^2 по формуле:

$$\chi^2 = (N_1 N_3 - 1/4 N_2^2)^2 N / (n_1^2 n_2^2) \text{ (Животовский, 1991), где}$$

N_1 , N_2 и N_3 – численности генотипов XX, Xx и xx, а N – общий объём выборки,

n_1 и n_2 – число аллелей исследуемых генов в выборке.

Достоверность различий популяционных частот определяли с помощью точного двустороннего критерия Фишера по стандартной формуле с учетом поправки Йетса для парных сравнений с контрольной группой и с помощью критерия хи-квадрат (χ^2) по стандартной формуле с учетом поправки Йетса для парных сравнений и поправки Бонферрони для множественных сравнений с контрольной группой [Гланц, 1999, Реброва, 2003].

ГЛАВА III.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Клиническая характеристика больных.

В обследованной нами выборке больных отмечается значительное преобладание пациентов из Москвы и Московской области, что объясняется территориальной близостью ГНЦ РАМН (г. Москва) и более высоким уровнем медицинского обслуживания в столичном регионе. Принципиальным является то, что ОПП распространена повсеместно на территории стран СНГ и не имеет эндемичности.

Среди больных ОПП наблюдается преобладание женщин. Из 75 пациентов 69 были женщины и только 6 человек – лица мужского пола. Средний возраст пациентов-мужчин – 42.4 года. Самому молодому – 26 лет, самому пожилому – 62 года. Средний возраст пациенток – 38.6 лет. Самой молодой из пациенток – 20 лет.

Значительную роль в провокации приступов ОПП играет гормональный фон, обусловленный функцией яичников. Он определяет преобладание женщин над мужчинами среди страдающих ОПП (11:1), наблюдаемых в ГНЦ РАМН. У 14% пациентов, в том числе у одного мужчины, причиной приступа стал приём порфириногенных лекарственных препаратов. Инфекции, преимущественно вирусные (CMV, HBV, HCV), стали причиной приступов ОПП у пяти пациенток. Приём алкоголя вызвал приступы у четырёх больных. Двое из них мужчины. Стрессовые ситуации явились причинами приступов у двух пациенток. Контакт с бытовыми красителями привел к приступу ОПП у одной больной. Примерно у 20% больных, наблюдаемых в ГНЦ РАМН, порфириногенный фактор остался неизвестным. В том числе, у троих из шести мужчин.

Среди выборки преобладают больные с тяжёлым течением(75%), что характерно для этой патологии, у остальных больных наблюдались приступы средней и легкой степени тяжести. Различные остаточные явления при ОПП отмечаются у 32.6%. Стационарное лечение больных ОП в ГНЦ занимало от 8 до 270 дней. Средний койко-день – 52.1 дня.

Абдоминальный синдром являлся одним из ранних и наиболее типичных проявлений приступов острой порфирии. Частота его встречаемости составляет более 80 процентов среди всех клинических проявлений. Наличие у пациента яркой клиники абдоминальных болей является одной из главных причин, приводящих к задержке постановки правильного диагноза, поскольку требует длительной верификации и служит поводом для госпитализации в хирургические стационары. Лапаротомия (лапароскопия) по поводу абдоминального синдрома была выполнена 43.9% больным ОПП. Хирургическая травматизация тканей и использование во время операции анестетиков, большинство из которых порфириногены, приводят в дальнейшем к кризовому течению ОПП у больных.

Клиника сенсорно-моторной полинейропатии была отмечена в 97%. Этот показатель отражает несвоевременную диагностику заболевания и позднее начало лечения.

Также показателем поздней диагностики и неправильного лечения является бульбарный синдром, который был отмечен у 47% больных ОПП. Бульбарный синдром, являющийся тяжёлым осложнением течения основного заболевания, можно считать оценочным критерием степени тяжести состояния больного ОПП. Исходя из этого, становится очевидным, что около половины больных ОПП были крайне тяжёлыми и имели лечебно-диагностические проблемы на разных этапах лечения.

Вследствии запоздалой диагностики ОПП, из-за ошибочных диагнозов и осложнений основного заболевания больным необходимо длительное

стационарное лечение, которое крайне дорогостояще. Выборка больных достоверно подтвердила, что средний возраст составляет от 35 до 45 лет, это наиболее трудоспособная часть населения, женщины репродуктивного возраста. Поэтому становятся актуальными вопросы профилактики заболевания, которой способствует выявление асимптомных носителей в семьях больных на доклиническом этапе. Молекулярно-генетическая диагностика, позволяющая выявлять мутации в гене ПБГД, поможет резко сократить тяжелые клинические случаи заболевания, требующие дорогостоящего лечения и приводящие к инвалидизации больных ОПП.

3.2. Поиск мутаций в гене ПБГД

Для 75 неродственных больных с диагнозом ОПП были определены мутационные нарушения в гене ПБГД. У одиннадцати человек генетические дефекты были исследованы и опубликованы Пустовойтом Я.С. в ходе проведения его диссертационной работы [Пустовойт Я.С. 2002]. Поиск мутационных нарушений у оставшихся 64 пациентов стал логическим продолжением работы по определению спектра и распределению мутаций гена ПБГД у пациентов с острой перемежающейся порфирией из различных регионов РФ, проходивших обследование в ГНЦ РАМН.

В ходе исследования мы применили стратегию поиска мутаций в гене ПБГД, основанную на комплексном подходе, включающем секвенирование ПЦР-фрагментов кДНК и ДНК (см. раздел Материалы и методы). Использование РНК в качестве исходного материала для анализа в большинстве случаев позволяет существенно сократить объем процедуры секвенирования в расчете на одного пациента. Информацию о первичной структуре кодирующих областей, содержащих полностью экзоны с 3 по 14, мы получали, секвенируя только один ОТ-ПЦР-фрагмент, тогда как для анализа тех же кодирующих областей на уровне ядерной ДНК требуется

исследование, по крайней мере, пяти-семи ПЦР-фрагментов. Метод ОТ-ПЦР также дает возможность легко выявлять большинство мутаций сплайсинга, приводящих к выпадению из мРНК целых экзонов.

Секвенирование укороченных ОТ-ПЦР-фрагментов позволяет установить, какой именно экзон утрачен, однако, точную характеристику подобных мутаций можно получить только с помощью секвенирования соответствующих генных фрагментов ДНК, поскольку дефекты в таких случаях чаще всего локализуются в интронных участках, непосредственно прилегающих к экзонам.

Вместе с тем, метод ОТ-ПЦР имеет некоторые ограничения, обоснованные тремя причинами.

1. Известно, что некоторые аномальные варианты мРНК ПБГД, причем не только утерявшие экзоны вследствие нарушенного сплайсинга, но и несущие определенные миссенс-, нонсенс- или frameshift-мутации, могут иметь существенно меньшую стабильность (или пониженный уровень экспрессии) по сравнению с нормальной мРНК [Mustajoki et al, 1997], что делает обнаружение подобных дефектов на уровне анализа кДНК практически невозможным.

2. Для гена ПБГД характерен альтернативный сплайсинг, который фенотипически никак не проявляется [Ong et al, 1998]. Это явление было обнаружено австралийскими учеными, которые показали, что мРНК ПБГД (как при ОПП, так и в норме) способна спонтанно терять экзон 3, или экзон 12 или оба экзона вместе при отсутствии каких-либо дефектов в соответствующих сайтах сплайсинга, причем доля аномально сплайсированных молекул может достигать 50%. В этом случае исследователь сталкивается с ситуацией, когда при постановке ОТ-ПЦР и последующей визуализации наработанного материала он видит на электрофореграмме укороченный фрагмент, который не является следствием мутаций сплайсинга, приводящих к ОПП. Кроме того, искомая мутация

может находиться в экзонах 3 или 12, которые могут отсутствовать в мРНК из-за произошедшего альтернативного сплайсинга, и тогда обойтись без прочтения последовательности на уровне ДНК уже не представляется возможным.

3. Третья причина обусловлена повышенной лабильностью образцов мРНК (по сравнению с ДНК), часто затрудняющей проведение ОТ-ПЦР на препаратах, хранившихся в течение длительного времени. По этой причине поиск мутаций с использованием метода ОТ-ПЦР следует проводить как можно раньше после взятия образца на анализ.

Основываясь на вышеизложенном, мы пришли к целесообразности использования комплексного подхода при анализе мутаций в гене ПБГД, согласно которому первоначально ведется поиск дефектов на уровне кДНК, а переход к работе с ядерной ДНК происходит при обнаружении на первом этапе мутаций сплайсинга или получении отрицательных результатов (отсутствие мутаций). Экзоны 1 и 15 мы исследовали только по ядерной ДНК и на таком же материале проводили большинство обследований для родственников больных с установленными мутациями.

Предложенная схема анализа позволила нам определить мутации у 75 неродственных больных ОПП, причем большая их часть была найдена при исследовании кДНК. Всего нами выявлено 50 различных мутаций, 29 из которых ранее в мировой популяции не встречались (табл.6). Установленный мутационный спектр характеризуется высоким разнообразием: 41 из 50 генных нарушений зафиксированы однократно. Это лишний раз подтверждает гетерогенность генетических дефектов, приводящих к ОПП, о которой говорилось выше. Аналогичная картина наблюдается и в других популяциях и характерна она не только для ОПП, но и для большинства других наследственных заболеваний. Теоретически могут существовать многие тысячи различных мутантных вариантов гена такого размера и структурной организации, как ген ПБГД. Реальный мутационный фонд гена

ПБГД (как и других генов) для любой популяции находится в динамическом состоянии. Он постоянно пополняется за счет возникновения мутаций *de novo*, доля которых для ОПП составляет около 3% [Whatley et al, 1995]. Некоторые редкие мутации, являющиеся по существу уникальными характеристиками отдельных семей, могут со временем исчезать, другие мутации, наоборот, могут широко распространиться за счет эффекта основателя о котором говорилось в Главе 1.

Обнаружение новых генетических дефектов различного типа расширяет наши знания о тонких молекулярных механизмах мутагенеза и структурно-функциональных связях в исследуемых белках.

Таблица 6. Спектр мутаций в гене ПБГД у больных ОПП, проходивших обследование в ГНЦ РАМН.

№ п/п	Кодон	мутация	тип мутации	ссылка
1	IVS 1+1	G→A	сплайсинг	Grandchamp et al, 1989
2	IVS1+5	G→A	сплайсинг	данная работа
3*(⁸)	18	53delT	делеция	данная работа
4	24	G71A	миссенс	данная работа
5*(²)	26	C76T	миссенс	Kauppinen et al, 1995
6	26	G77A	миссенс	Llewellyn et al, 1993
7	29	C85T	нонсенс/спл	данная работа
8	IVS3+5	G→T	сплайсинг	данная работа
9	31	C92T	миссенс	данная работа
10	32	G95C	миссенс	данная работа
11	42	T125C	миссенс	Whatley et al, 1999
12	60	G178A	миссенс	данная работа
13	68	202-203delCT	делеция	данная работа
14	IVS5-1	G→C	сплайсинг	данная работа
15	IVS5-2	A→C	сплайсинг	данная работа
16	93	T278A	миссенс	данная работа
17*(⁴)	111	G331A	миссенс	Gu et al, 1993b
18	112	C335A	миссенс	данная работа
19	IVS7(+2+5)	delTAAG	сплайсинг	данная работа
20	139	G415T	нонсенс	данная работа
21	IVS8-1	G→A	сплайсинг	данная работа
22	149	C445T	нонсенс	Kauppinen et al, 1995
23*(⁸)	173	C517T	миссенс	Lee et al, 1991b
24*(³)	173	G518A	миссенс	Delfau et al, 1990
25	192	G575A	миссенс	данная работа
26	200-201	delC	делеция	данная работа
27	204	C610T	нонсенс	Mgone et al, 1994
28	IVS10-1	G→C	сплайсинг	данная работа
29	212	T635G	миссенс	данная работа
30*(²)	216	G647A	миссенс	Lundin et al, 1997
31	216	646insA	инсерция	данная работа
32	IVS11(-5-4)	AT→TC	сплайсинг	данная работа
33	IVS11-1	G→C	сплайсинг	Puy et al, 1997
34	225	C673T	нонсенс	Kauppinen et al, 1995
35*(²)	247	T739C	миссенс	Mgone et al, 1993
36	IVS12+1	G→C	сплайсинг	De Siervi et al, 1999
37	IVS12+1	G→T	сплайсинг	Rosipal et al, 1997
38	IVS12-17	A→G	сплайсинг	данная работа
39	IVS13+1	G→A	сплайсинг	Llewellyn et al, 1996
40*(²)	IVS13+2	T→G;insG(+6)	сплайсинг	данная работа
41	IVS13+2	T→A	сплайсинг	Gross et al, 1999
42*(²)	IVS13(+3+6)	delAAGT	сплайсинг	Pischik et al, 2005
43	283	G849A	нонсенс	Schreiber et al, 1995
44	IVS14+2	T→C	сплайсинг	данная работа
45	325	C973T	нонсенс	Lam et al, 2001
46	338	T1013G	миссенс	данная работа
47	338	T1013C	миссенс	данная работа
48	342-364	1024-1091del 67	делеция	данная работа
49	343-345	1029-1033delGAGCA	делеция	данная работа
50	343	T1028C	миссенс	Floderus et al, 2002

*

-мутация найдена более, чем у одного пациента (цифра в скобках обозначает количество человек, у которых обнаружена данная мутация).

Среди обнаруженных нами нарушений в гене ПБГД преобладают миссенс мутации (20) и мутации сплайсинга (18, включая 2 микроделеции в сайтах сплайсинга). Семь раз встретились нонсенс-мутации, 5 раз – микроделеции, у одной пациентки обнаружена микроинсерция. (рис.9) Мутации, обнаруженные у наших больных ОПП также, как и в мировой популяции, распределены по гену ПБГД достаточно равномерно.

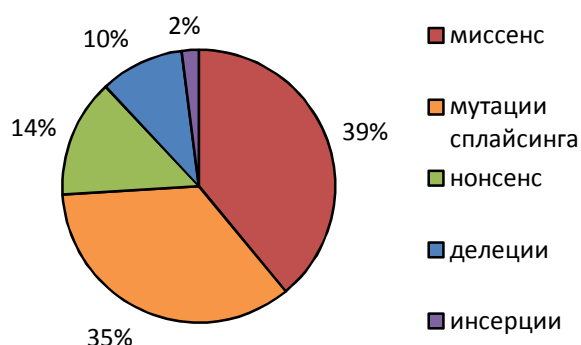


Рис. 9 Распределение мутаций в гене ПБГД, обнаруженных у пациентов с ОПП в данной работе.

Следует отметить, что в ходе данной работы в двух случаях удалось установить возникновение мутаций *de novo* (нонсенс мутация Glu139Term и мутация сплайсинга IVS12+1 G→C). Ниже приводится описание генетических нарушений, обнаруженных в ходе работы, и их возможное влияние на структуру и функции ПБГД.

3.2.1. Миссенс- мутации.

Миссенс – мутации, ассоциированные с ОПП, затрагивают области ПБГД, важные для поддержания структуры белка, его стабильности и каталитических свойств.

Gly24Asp (GGT→GAT): Данная мутация впервые была обнаружена в нашей выборке больных и представляет собой замену глицина на аспарагин в

позиции 24. Опираясь на данные о кристаллической структуре ПБГД человека (Глава 1 обзора литературы), можно предположить, что данное нарушение затрудняет взаимодействие фермента с субстратом, непосредственно затрагивая сайт связывания субстрата, поскольку находится в непосредственной близости от активного центра.

Arg26Cys(CGC→TGC), Arg26His(CGC→CAC): С помощью водородных связей Arg²⁶ участвует в присоединении кофактора ДПМ к молекуле фермента. Замена данной аминокислоты в структуре белка, нарушает это взаимодействие и влияет на связывание субстрата с ферментом.

Ala31Val (GCT→GTT): Данная мутация найдена только в российской популяции. Известен мутантный вариант ПБГД Ala31Thr, в котором предполагается наличие стерических нарушений в непосредственной близости от остатка Arg¹¹, участвующего в связывании субстрата. Вероятно, замена Ala31Val приводит к аналогичным последствиям, хотя выражены они могут быть в меньшей степени, т.к. валин в отличие от триптофана не содержит в своей структуре бензольного кольца.

Arg32Pro (CGC→CCC): Подобно предыдущей мутации, данное нарушение затрудняет взаимодействие фермента с субстратом, вызывая стерические нарушения в непосредственной близости от его сайта связывания.

Leu 42 Ser (TTG→TCG): Leu42 локализован в домене 1 ПБГД, в непосредственной близости от активного центра. Замена лейцина на серин затрудняет взаимодействие фермента с субстратом, затрагивая сайт связывания субстрата.

Gly 60Arg (GGG→AGG): Область связывания кофактора ДПМ локализуется в районе петли, образованной аминокислотными остатками 57-77. Замены аминокислот в данной области, в нашем случае глицина на

аргинин в позиции 60, влияют на правильное расположение кофактора внутри фермента, которое затрудняется в связи со стерическими изменениями в α -цепи, а это в свою очередь влияет на связывание субстрата с ферментом.

Val 93 Asp (GTT $\rightarrow$ GAT): Данная мутация также ранее в мировой популяции не встречалась. Известно, что замена остатка валина-93 на фенилаланин приводит к стерическим нарушениям в структуре белка. В нашем случае замена консервативного гидрофобного остатка Val на гидрофильный остаток Asp в β -структуре, карбоксильный конец которой участвует в формировании активного центра, также должна приводить к резкому снижению активности фермента. У больной, у которой обнаружена данная мутация, активность фермента ПБГД была снижена до 30%.

Gly 111 Arg (GGA $\rightarrow$ AGA): Данная мутация широко распространена во многих популяциях, в частности: Франции, Голландии, Испании и Аргентине [Gu et al, 1993; Solis et al, 1999; De Servi et al, 1999]. Среди наших пациентов она встретилась у четырех неродственных больных. Три из них были женщины и один мужчина. Все они имели тяжелое течение болезни, сопровождаемое значительным снижением активности ПБГД. И хотя, данная мутация не должна приводить к серьезным нарушениям, так как остаток Gly¹¹¹ располагается на поверхности домена 1 и не участвует в каких-либо межбелковых взаимодействиях, функциональные свойства белка снижаются по невыясненным пока причинам, о чем свидетельствуют тяжелое протекание болезни и низкая активность ПБГД.

Ala112Asp (GCC $\rightarrow$ GAC): Замена остатка Ala¹¹², локализованного в гидрофобном коре на поверхности домена 1 и участвующего в образовании гидрофобных контактов с доменом 3, на гидрофильный остаток аспарагиновой кислоты, должна приводить к серьезным нарушениям третичной структуры ПБГД. И действительно, у больной ОПП, у которой

было выявлено данное нарушение, болезнь, спровоцированная второй беременностью, протекала в очень тяжелой форме. Отчасти это связано с тем, что находясь в стационарах по месту жительства, она 4 месяца оставалась без точного диагноза. В ГНЦ РАМН она была доставлена в критическом состоянии и находилась на стационарном лечении в течение 9-ти месяцев, 5 из которых провела в реанимации.

Arg173 Trp (CGG→TGG): Можно сказать, что данное мутационное нарушение является самым распространенным среди больных ОПП. Мутация обусловлена заменой С на Т в динуклеотиде CG, которые в эукариотических геномах являются горячими точками мутаций. Цитозин в таких динуклеотидах часто представлен своим аналогом 5-метилцитозином, способным к спонтанному дезаминированию, превращающему его в остаток тимина. С этим связано такое повсеместное распространение данной мутации по всему миру, в том числе и в России. Замена аргинина-173 на триптофан составляет 11% от общего числа мутаций у наших больных. С такой же высокой частотой у наших пациентов встретилась только мутация 53delT.

Arg¹⁷³ входит в группу инвариантных аргининовых остатков (Arg¹⁴⁹, Arg¹⁵⁰, Arg¹⁷³), задействованных во взаимодействиях с кофактором ДПМ. Он участвует в образовании солевых мостиков с карбоксильными группами пиррольного кольца C1 кофактора ДПМ. Данное нарушение может вызывать тяжелое проявление болезни, что и было отмечено при обследовании пациентов с ОПП в Швеции [Andersson et al, 2000]. Что же касается наших пациентов, то течение заболевания у них было различным: от крайне тяжелого до почти полного отсутствия клинических проявлений. Диапазоны активности ПБГД в эритроцитах также оказались весьма широкими.

Arg173Gln (CGG→CAG): Также как и в предыдущем случае замены аргинина на триптофан, данная мутация Arg173Gln нарушает взаимодействие между кофактором ДПМ и белком.

У наших больных данная мутация встретила три раза и во всех случаях болезнь имела тяжелое течение.

Gly 192 Asp (GGC→GAC): Gly¹⁹² локализован на поверхности α-цепи домена 2 и участвует в межмолекулярных связях двух субъединиц фермента. Замена глицина на аспаргин скорее всего не должна кардинально влиять на каталитическую активность фермента, поскольку третичная структура каждой из субъединиц при этом имеет незначительные изменения.

Met212Arg (ATG→AGG): Met²¹² локализован в петле, соединяющей β4 и β5 цепи доменов 1 и 2. Замена метионина на аргинин может понижать подвижность β цепей, которая необходима для вхождения молекулы субстрата в полость фермента и связывания с активным центром. Кроме того остаток Met²¹² задействован в гидрофобных взаимодействиях между доменами 2 и 3, и следовательно это мутационное нарушение может оказывать влияние на третичную структуру белка.

Интересно отметить, что у больной, у которой обнаружена данное нарушение, помимо аминокислотной замены Met212Arg, в мРНК ПБГД обнаружена вставка интрона 11. Замена Т→Г в кодоне 212, локализованном на 3'-конце экзона 11, создает нуклеотидную последовательность, очень близкую по структуре к донорному сайту сплайсинга интрона 11 (рис.10), чем, возможно, и объясняется нарушение нормального сплайсинга в данной области мРНК ПБГД.



Рис. 10 Мутация Met212Arg в гене ПБГД, приводящая к вставке 11 интрона.

Жирной линией подчеркнута область гомологии между сайтом сплайсинга и экзонной последовательностью.

Gly216Asp (GGC→GAC): Замена глицина в положении 216 на аспарагин влияет на связывание субстрата с ферментом подобно предыдущей мутации, так как располагается в той же петле, соединяющей β4 и β5 цепи.

Cys247ArgTGC→GGC: Cys²⁴⁷, находящийся на поверхности домена 3, необходим для образования гидрофильных связей с доменом 1. Замена цистеина на аргинин в этом положении влияет на упаковку белковых цепей, искажая третичную структуру фермента. Данная мутация встретила у двух наших пациентов, у которых наблюдалось тяжелое течение болезни.

Leu338Arg(CTG→CGG) ; Leu338Pro(CTG→CCG): Последствия данных замен в дистальной карбоксильной области молекулы ПБГД оценить достаточно сложно. Не исключено, что она приводит к нарушению гидрофобных взаимодействий между доменами 1 и 3 и, таким образом, существенно искажает третичную структуру фермента. У обеих больных с таким нарушением болезнь протекала тяжело, в клинике преобладали бульбарные нарушения, парезы. Для одной из пациенток потребовалась искусственная вентиляция легких. Следует отметить, что родная сестра пациентки, у которой уже была предварительно обнаружена мутация Leu338Arg, также подверглась клинической манифестации ОПП, но сумела избежать тяжелого течения заболевания, поскольку болезнь была купирована на ранней стадии. Этот пример еще раз подтверждает значимость проведения

молекулярной диагностики в семьях больных с целью выявления носителей мутаций и их информировании о возможных последствиях.

Leu343Pro (CTG→CCG): Данное мутационное нарушение не должно вызывать серьезных нарушений в функционировании ПБГД, поскольку остаток Leu³⁴³ располагается на поверхности домена 3 и не участвует в каких-либо межбелковых взаимодействиях. И действительно, у пациентки с такой мутацией наблюдалось среднетяжелое течение болезни.

3.2.2. Мутации сплайсинга.

Из восемнадцати выявленных мутаций сплайсинга, большая часть представляет собой замены в канонических динуклеотидах донорных и акцепторных сайтов, приводящие к элиминации отдельных экзонов из молекулы зрелой мРНК. (табл.5). Две мутации: IVS7(+2_5) delTAAG и IVS13(+3_6) delAAGT, которые приводят к выпадению экзонов 7 и 13, соответственно, представляют собой микроделеции в донорных сайтах сплайсинга. Потеря целых экзонов должна приводить к серьезным фенотипическим последствиям. Однако в основной массе наших больных с нарушениями такого типа, заболевание протекало в достаточно легкой форме. Некоторые варианты сплайсинговых мутаций, заслуживающие отдельного внимания, представлены ниже.

IVS1+1 G→A: в данном варианте сплайсинговой мутации замена G→A приводит к активации криптоического сайта сплайсинга через 67 п.н.от конца первого экзона и возникновению аномальной мРНК с нарушенной рамкой считывания, так как к экзону 1 присоединяются 67 дополнительных нуклеотидов интрона 1. В результате вставки лишних нуклеотидов, в последовательности мРНК образуется стоп-кодон через 41 триплет, считая от конца экзона 1. К аналогичному нарушению транскрипции приводит и мутация ***IVS1+5 G→A.***

В случае замены *IVS8-1 G→A* происходит потеря не полноразмерного экзона 9, а лишь его первых пяти кодонов, что объясняется активацией внутриэкзонного криптоического акцепторного сайта сплайсинга (рис.11).

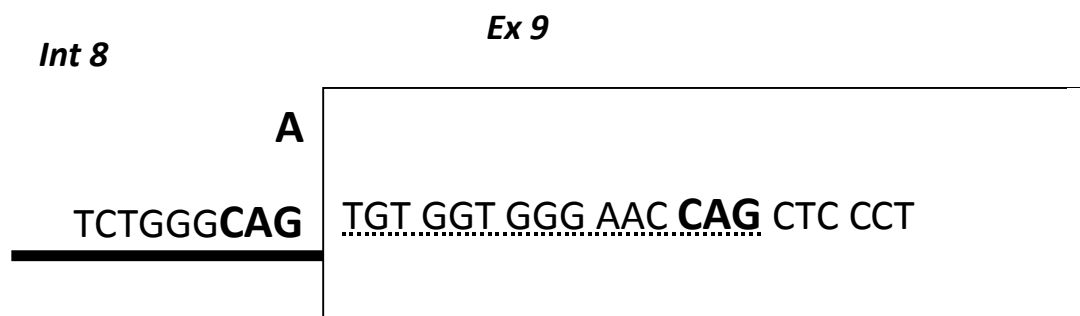


Рис. 11 Мутации *IVS8-1G→A* в гене ПБГД

Пунктиром подчеркнута область экзона 9, удаляющаяся в ходе сплайсинга.

Жирная линия – интрон, прямоугольник – экзон.

IVS12-17A→G: Эта мутация, по всей вероятности, приводит к формированию аномального акцепторного сайта сплайсинга – tcaCAGG, который может использоваться вместо нормального – ttaCAGG. Обычно нарушения такого рода имеют достаточно слабое фенотипическое проявление, однако в данном случае у больной ОПП течение болезни характеризуется как острое. Больная перенесла несколько приступов, два из которых были наиболее тяжелыми, потребовавшими интенсивной терапии.

IVS13+2T→G;+ 6 insG: Строго говоря, инсерция (+G) практически не меняет структуру донорного сайта сплайсинга интрона 13, и собственно мутацией в данном случае является только замена T→G, приводящая к выпадению из мРНК экзона 13. Эта комплексная аномалия интересна тем, что она встретила у двух неродственных больных ОПП. Кроме наших больных, данная мутация в мировой популяции не встречалась. Можно предположить, что она имеет монофилетическое происхождение, поскольку

независимое возникновение подобных сложных вариаций представляется крайне маловероятным. В ходе дальнейших исследований мы доказали верность нашей гипотезы.

3.1.3. Нонсенс-мутации

Нонсенс-мутации приводят к преждевременной терминации трансляции за счет замены функционального кодона на стоп-кодон. Нонсенс-мутации должны приводить к серьезным фенотипическим проявлениям, поскольку у белка нарушается его структура и свойства, вследствие утери значительной части аминокислотной последовательности. По-видимому, к более легким можно отнести нонсенс-мутации, которые локализованы ближе к 3' концу и приводят к элиминации небольшого количества аминокислотных остатков. При этом белок, несмотря на свою неполноценность, может сохранять свои каталитические свойства.

Gln29Term Так как эта нонсенс - мутация локализована в самом начале последовательности, кодирующей ПБГД, замена С→Т в кодоне 29 приводит к почти полному отсутствию белка и должна сопровождаться серьезными фенотипическими последствиями. И действительно, пациентка, которая была носителем мутации Gln29Term, имела тяжелое течение болезни.

Glu139Term Образование стоп-кодона в данном случае приводит к отсутствию в структуре белка 220 аминокислот, включающих 24 остатка в домене 1, 73 в домене 2 и все 123 остатка в домене 3.

Похожие последствия вызывает мутация **Arg149Term**, из-за которой белок теряет 210 аминокислот, в 1 и 3 доменах такое же количество как при предыдущей мутации, а во 2 домене на 10 аминокислотных остатков меньше.

Gln204Term. Мутация должна вызывать серьезные нарушения, так как ее последствия отражаются на всех трех доменах, участвующих в

формировании третичной структуры. В общей сложности белок теряет 139 аминокислот.

Arg225Term В данном случае мутация уже не затрагивает домен 2 и приводит к потере всех аминокислот домена 3 и 13 аминокислотных остатков, расположенных в домене 1.

Последние 2 нонсенс-мутации: ***Trp283Term*** и ***Arg325Term***, найденные у наших больных ОПП, приводят к потере 79 и 37 аминокислотных остатков, соответственно. Эти аминокислотные последовательности располагаются в концевых цепях третьего домена, и по видимому, белок с такой урезанной структурой сохраняет свои ферментативные свойства. Среднетяжелое протекание болезни у обоих больных с данными нарушениями может косвенно подтверждать данное предположение.

3.2.4. Делеции, микроинсерции.

Все выявленные микроделеции, равно как и одна найденная нами микроинсерция, являются frameshift-мутациями, приводящими к сдвигу трансляционной рамки и образованию аномального стоп-сигнала на небольшом расстоянии от мутировавшей области. Как и при нонсенс-мутациях, различные укороченные варианты белка, образовавшиеся при потере или вставке нуклеотидов в количестве, не кратном трем, нестабильны и ферментативно неактивны.

53delT. Данная мутация наравне с Arg173Trp является самой распространенной в нашей выборке больных ОПП. Она встретила у восьми неродственных пациентов, и по всей вероятности, может считаться генетической характеристикой, специфичной для отечественной популяции, поскольку больше нигде в мире не встречалась. Данный генетический дефект, представляющий собой делецию центрального нуклеотида в стартовом кодоне эритроидной формы мРНК ПБГД или кодоне Met18

всетканевой формы фермента с образованием терминирующего кодона через один триплет, приводит к практически полному отсутствию синтеза белка ПБГД, соответствующего мутантному аллелю, и можно было бы предположить тяжелое клиническое течение ОПП у его носителей. Однако, ретроспективный анализ течения заболевания у пациентов с этой мутацией показывает, что оно существенно различалось.

У двоих из восьми больных с данной мутацией заболевание имело тяжелое течение. В анамнезе имелись неоднократные, тяжелые приступы, в основе которых доминировали явления моторно-сенсорной полинейропатии с развитием плегий, бульбарными нарушениями, явлениями дыхательной недостаточности. Кроме того, у одной больной в клинике отмечались крайне редко описываемые при ОПП эпилептиформные припадки.

У остальных пациентов отмечалось среднетяжелое течение болезни, которое сопровождалось либо однократным приступом, либо несколькими, часто не требовавшими стационарного лечения. Адекватное лечение нивелировало явления моторносенсорной полинейропатии. Регенерация нервной ткани была полной, без неврологического дефицита и формирования остаточных вялых парезов.

Особый интерес представляют наши две пациентки, являющиеся однойяйцевыми близнецами. Течение заболевания у сестер было практически одинаковым. Дебют заболевания у обеих в 22 года. Течение приступов острое, но без развития тяжелых плегий и бульбарных расстройств. В клинике наблюдались боли в животе, парезы, выделение мочи красного цвета. Приступы, которые у них возникали неоднократно, заканчивались спонтанно, без целенаправленного патогенетического лечения. Такая схожесть в симптомах и течении болезни у людей с идентичным геномом, может косвенно свидетельствовать о том, что проявление и даже течение

заболевания определяется какими-то сопутствующими основной мутации неизвестными генетическими факторами.

202_203delCT Сдвиг рамки считывания, вызываемый этой делецией, приводит к образованию на месте кодона 69 TCT терминирующего кодона TAA. (рис.12)

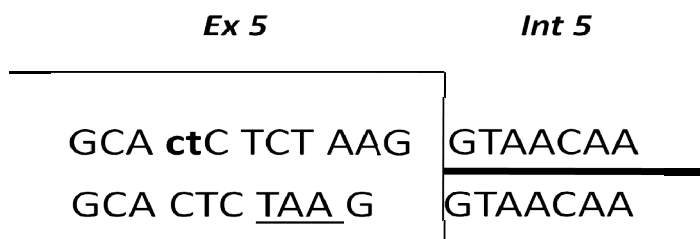


Рис. 12. Мутация 202_203 delCT в гене ПБГД. Прописными буквами обозначена область делеции. Подчеркиванием - аномальный стоп-кодон. Жирная линия – интрон, прямоугольник – экзон.

600_601delC данное нарушение приводит к сдвигу трансляционной рамки, начиная с кодона 201, и образованию терминирующего триплета в области кодона 254.

1029-1033 delGAGCA данная мутация приводит к сдвигу трансляционной рамки и образованию аномального стоп-сигнала за три кодона до нормального. **1024-1090del67** при этой мутации теряется 21 3'-концевой кодон, включая терминирующий, и еще 4 нуклеотида нетранслируемой области с образованием нового стоп-сигнала через 30 триплетов от точки делеции.

646insA Данная микроинсерция сдвигает рамку считывания белка, начиная с кодона 216, с образованием стоп-сигнала вместо кодона 249.

Если суммировать имеющуюся информацию о спектре мутаций в гене ПБГД у российских пациентов с ОПП, то следует упомянуть совместную

работу отечественных и финских исследователей [Pischik E et al, 2005], определявших мутации в гене ПБГД у пациентов преимущественно из северо-западного региона России. У 11 неродственных больных они обнаружили 9 различных мутаций, три из которых (Leu257Pro, IVS13+5G→C, IVS13(+3+6)del) ранее не были описаны. Четыре из девяти мутаций, а именно: 3 миссенс-мутации (Leu257Pro, Arg195Cys и Glu250Ala) и мутация сплайсинга IVS13+5G→C, обнаруженные в вышеуказанной работе, отсутствуют в нашей выборке пациентов с ОПП и дополняют, таким образом, список дефектов гена ПБГД, найденных в российской популяции, в котором на данный момент представлены 54 мутации, выявленные при молекулярно-генетическом обследовании 86 неродственных больных ОПП. Такое большое разнообразие генных дефектов, по крайней мере отчасти, может являться отражением более высокой популяционной и генетической гетерогенности населения России по сравнению с населением других стран, где проводились аналогичные исследования. Мутационные спектры для гена ПБГД, полученные зарубежными исследователями, также отличаются значительной гетерогенностью, но они тем не менее заметно беднее российского. Так, например, в Финляндии, где практически завершена работа по созданию полного регистра семей, затронутых ОПП, при обследовании 196 неродственных больных найдено только 26 различных мутаций [Kauppinen et al, 2002]. В Швеции, где проводились аналогичные работы, было обследовано 120 семей, затронутых ОПП и обнаружен 41 генный дефект [Thunell et al, 2006].

Следует также отметить, что полученные нами в ходе данного исследования результаты подтверждают вывод об отсутствии значимой корреляции между характером дефекта в гене ПБГД и клиническим фенотипом ОПП. Особенно это подтверждается примерами, когда несколько неродственных больных, с одинаковым генетическим нарушением, имели совершенно разное течение болезни.

3.3. Скрининговый анализ.

Наиболее распространенными в России оказались мутации 53delT и Arg173Trp (встретились по 8 раз, суммарно около 23%). Причем, если мутация Arg173Trp широко распространена во многих исследованных популяциях, то делеция центрального нуклеотида в стартовом кодоне эритроидной формы ПБГД 53delT найдена только в России. Для этих двух мутаций и для мутаций Gly111Arg и Arg173Gln, которые также можно отнести к распространенным в России (встретились 4 и 3 раза соответственно), созданы простые скрининговые тест-системы на основе ПЦР и рестрикционного анализа.

53delT Для тестирования мутации использовали ПЦР с парой праймеров pp1m/pp3. В праймер pp1m была введена искусственная замена pp1m: GCAGGAAGAAAACAGCCCgAAG (отмечена строчной буквой), благодаря которой в мутантном ПЦР-фрагменте образуется сайт узнавания для рестриктазы Bst6I. (рис. 13)

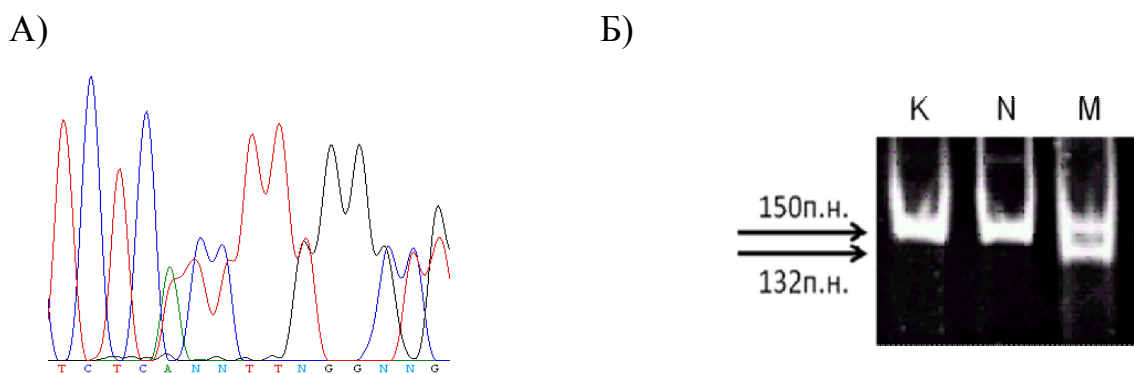


Рис. 13. Рестрикционный анализ мутации 53delT. А) секвенирование ОТ-ПЦР-фрагмента кДНК ПБГД больного ОПП (фрагмент структурной хроматограммы, содержащий точку мутации. б)ЭФ в 6%-ном ПААГ гидролизатов фрагмента pp1m/pp3, полученных при помощи рестрикционной эндонуклеазы Bst6I. Треки:К-негидролизированный ПЦР-фрагмент; N – норма; М - мутация. Мутация идентифицируется по наличию фрагмента 132п.н.

Arg173Trp. Рестрикционный анализ данной мутации основан на гидролизе ПЦР-продуктов, полученных с парой праймеров pp10/pp10-2, эндонуклеазой рестрикции HpaII. Фермент имеет сайт узнавания CCGG, что соответствует нормальному аллелю гена ПБГД, не поврежденному мутацией. Замена С→Т в кодоне 173 приводит к отсутствию данного рестрикционного сайта. (рис.14)

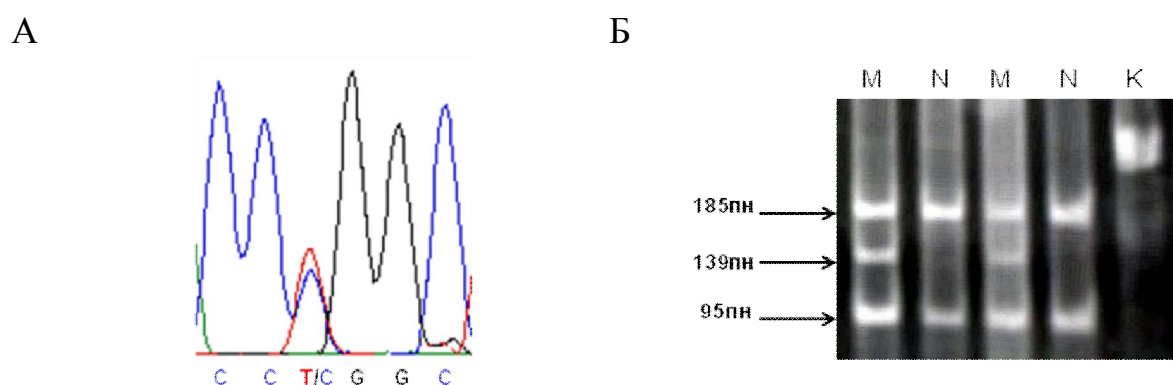
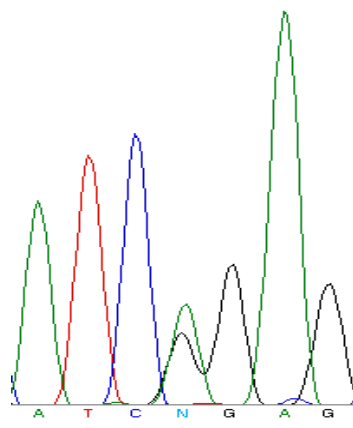


Рис.14. Тестирование мутации Arg173Trp в гене ПБГД у больных ОПП. А) секвенирование ОТ-ПЦР-фрагмента кДНК ПБГД больного ОПП (фрагмент структурной хроматограммы, содержащий точку мутации). Б. Рестрикционный анализ мутации Arg173Trp у больных ОПП. ПЦР-фрагмент гена ПБГД, содержащий экзон 10, гидролизован эндонуклеазой HpaII. Мутация выявляется по наличию фрагмента 139 пн. Электрофорез в 6%-ном ПААГ. М – мутация, N – норма, К – негидролизированный ПЦР-фрагмент.

Gly111Arg При отсутствии мутации последовательность 111 и 112 кодонов (GGAGCC) гена ПБГД является сайтом узнавания рестриктазы PspN4I. Замена G→A в первой позиции 111 кодона приводит к нарушению данного сайта узнавания. Для наработки ПЦР - продуктов использовались праймеры pp7-1 и pp7.(рис.15)

А



Б

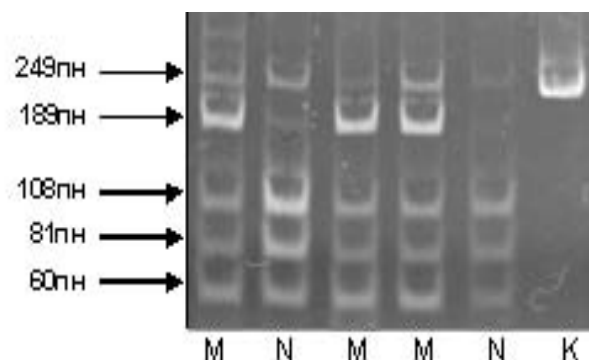


Рис.15. Тестирование мутации Gly111Arg в гене ПБГД у больных ОПП. А) секвенирование ОТ-ПЦР-фрагмента кДНК ПБГД больного ОПП (фрагмент структурной хроматограммы, содержащий точку мутации). Б). Рестрикционный анализ мутации Gly111Arg у больных ОПП. ПЦР-фрагмент гена ПБГД, содержащий экзон 7, гидролизован эндонуклеазой PspN4 I. Мутация выявляется по наличию фрагмента 189 пн. Электрофорез в 6%-ном ПААГ. М – мутация, N – норма, K – негидролизированный ПЦР-фрагмент.

Arg173Gln Это мутационное нарушение тестировалось аналогично мутации Arg173Trp. Для наработки ПЦР-продуктов использовались праймеры pp10 и pp10-2, отличие состояло в используемой эндонуклеазе рестрикции, которой в данном случае являлась Bst2UI.

В настоящее время эти системы используются для предварительного анализа ДНК вновь поступивших больных перед проведением полномасштабного мутационного исследования. В ряде случаев это позволяет сократить время и денежные затраты, необходимые для идентификации мутаций.

3.4. Семейная диагностика носительства.

Определение патологических дефектов в гене ПБГД у больных ОПП дает возможность провести молекулярно-генетический анализ для их близких родственников с целью выявления асимптомных носителей заболевания. Для большинства найденных мутаций были подобраны упрощенные тест-системы, основанные на рестрикционном или

гетеродуплексном анализе, при помощи которых проводилось обследование родственников. В некоторых случаях для анализа мутаций, например 53delT, IVS12-17A→G, не распознаваемых никакими рестрикционными эндонуклеазами, были сконструированы специальные ПЦР-системы, основанные на использовании праймеров с искусственно введенными заменами, создающими рестрикционные сайты только в мутантных ПЦР-фрагментах.

Простой вариант гетеродуплексного анализа, использованный для тестирования делеционных мутаций с выпадением 2-х и более нуклеотидов, не является специальным методом. Гетеродуплексные ПЦР-фрагменты, представляющие собой гибриды между нормальными и мутантными цепями, выявляются с помощью обычного электрофореза в ПААГ непосредственно после ПЦР, благодаря существенно меньшей электрофоретической подвижности по сравнению с гомодуплексами. Пример такого гетеродуплексного анализа для больной с мутацией IVS7+2 delTAAG приведен на рис.16

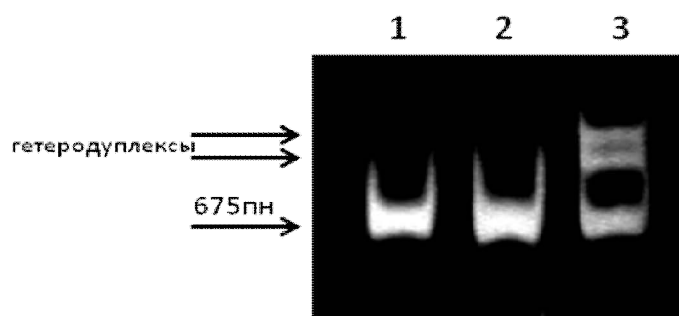


Рис.16 Гетеродуплексный анализ мутации IVS7+2 delTAAG. Электрофорез в 6% полиакриламидном геле фрагментов pp7-1/pp9-2. Треки 1,2) дети больной 3) больная пп16. Мутация идентифицируется по наличию двух фрагментов с аномальной электрофоретической подвижностью.

Когда мутацию было невозможно определить с помощью простых тест-систем, прибегали к секвенированию. При идентификации нарушений в семьях, отличающихся малой репрезентативностью (наличие образцов от одного-двух родственников), для которых было необходимо либо специально конструировать праймерные системы, либо приобретать эндонуклеазы рестрикции, отсутствующие в нашей коллекции, также использовали секвенирование. Всего за время проведения данной работы такое обследование прошли 161 человека из 50 семей и у 62 из них было обнаружено асимптомное носительство ОПП. (табл.7)

Таблица 7. Молекулярно-генетический анализ у родственников больных ОПП.

мутация	Кол-во неродственных пациентов	анализируемый ПЦР-фрагмент	метод анализа	Обследованные родственники	
				все	носители
IVS 1+1G→A	1	pp1-1/pp1-2	секвенирование	2	1
IVS1+5G→A	1	pp1-1/pp1-2	РА(PctI)	6	3
53delT	8	pp1m/pp3	РА(Bst6I)	16	7
Gly24Asp	1	pp3-1/pp3	РА(KpnI)	6	3
Arg26Cys	2	pp3-1/pp3	РА(FauI)	2	2
Arg26His	1	-	-	0	0
Gln29Term	1	pp3d/pp3	РА(Bst2UI)	2	1
IVS3+5G→T	1	-	-	0	0
Ala31Val	1	-	-	0	0
Arg32Pro	1	pp4/pp4-2	РА(BstC8I)	3	1
Leu42Ser	1	pp4/pp4-2-	РА(TagI)-	1	0
Gly60Arg	1	pp5-6/pp6-2	секвенирование	1	0
202-203delCT	1	pp4/pp6-2	ГДА	1	0
IVS5-1G→C	1	pp5-6/pp47m	РА(DraIII)***	2	0
IVS5-2A→C	1	pp5-6/pp6-2	РА(HaeIII)	2	0
Val93Asp	1	pp7-1/pp7	РА*(FokI)	14	5
Gly111Arg	4	pp7-1/pp7	РА(Pspn4I)	13	3
Ala112Asp	1	pp7-1/pp7	РА(BsoMAI)	2	1
IVS7(+2+5)delTAAG	1	pp7-1/pp9-2	ГДА**	2	0
Glu139Term	1	pp8-9/9-2	секвенирование	3	0
IVS8-1G→A	1	pp8-9/9-2	секвенирование	1	1
Arg149Term	1	pp119m/pp9-2	РА(DraIII)***	2	0
Arg173Trp	8	pp10/pp10-2	РА(HpaII)	20	6
Arg173Gln	3	pp10/pp10-2	РА(Bst2UI)	4	2
Gly192Asp	1	pp10/pp10-2	секвенирование	1	1
200-201delC	1	pp10/pp10-2	РА(MspR9I)	5	1
Gln204Term	1	pp10/pp10-2	РА(Acc36I)	5	2
IVS10-1G→C	1	pp11-1/pp11	РА(BstF5I)	4	4
Met212Arg	1	-	-	0	0
Gly216Asp	2	pp11-1/pp11	РА(Bme18I)	4	2
646insA	1	pp11-1/pp11	РА(Pspn4I)	0	0
IVS11(-5-4)AT→TC	1	-	-	0	0
IVS11-1G→C	1	pp155m/pp12-2	РА(SmaI)***	4	2
Arg225Term	1	-	-	0	0
Cys247Arg	2	pp12/pp12-2	секвенирование	2	2
IVS12+1G→C	1	pp12/pp12-2	РА(Bst2UI)	5	0
IVS12+1G→T	1	pp12/pp12-2	РА(MspR9I)	2	1
IVS12-17A→G	1	pp28m/pp14r	РА(MspR9I)***	3	1
IVS13+1G→A	1	pp13-14/pp15r	секвенирование	3	2
IVS13+2T→G;insG(+6)	2	pp12/pp15r	секвенирование	5	3
IVS13+2T→A	1	pp13-14/pp14r	секвенирование -	3	0
IVS13(+3_6)delAAGT	2	pp13-14/pp14r	секвенирование	1	0
Trp283Term	1	pp14-1x/pp15r	РА(Hinfl)	1	1
IVS14+2T→C	1	-	-	0	0
Arg325Term	1	-	-	0	0
Leu338Arg	1	pp14-1/pp15rb	РА(HpaII)	4	2
Leu338Pro	1	pp14-1x/pp15rb	РА(HpaII)	3	1
1024-1091del 67	1	pp14-1x/pp15rb	секвенирование	1	1
1029-1033delGAGCA	1	-	-	0	0
Leu343Pro	1	-	-	0	0

*- РА – рестрикционный анализ (в скобках указано наименование эндонуклеазы рестрикции),

**- ГДА – гетеродуплексный анализ

*** - использованы специальные ПЦР-системы с искусственным формированием сайта рестрикции в мутантном аллеле.

3.5. Анализ гаплотипов.

В ходе работы было исследовано 12 полиморфизмов из базы данных NCBI/SNP, локализованных в различных участках гена ПБГД от промоторной области до ближней 3'-области, и на репрезентативной выборке ДНК (около 100 неродственных хромосом) оценены аллельные частоты для каждого из них. В таблице 8 приведены полученные данные с указанием позиции полиморфного сайта относительно первого нуклеотида иницирующего кодона всецканевой формы ПБГД и его регистрационного номера в базе данных NCBI/SNP:

Таблица 8. Изученные полиморфизмы и их аллельные частоты

№п/п	Позиция	Локализация	№ в NCBI/SNP	Аллельные частоты
1	– 234 Т/А	промоторная область,	rs686624	Т – 1.0 А – 0
2	- 64 С/Т	промоторная область,	rs589925	С – 0.56 Т – 0.44
3	2377 С/А	интрон 1,	rs7927752	С - 0.53 А – 0.47
4	2479 G/A	интрон 1,	rs1799993	G - 0.40 А – 0.60
5	3530 Т/С	интрон 3	rs1144041	Т - 1.0 С – 0
6	3581 G/A	интрон 3	rs17075	G – 0.40 А – 0.60
7	3982 С/Т	интрон 4	rs549893	С – 0.36 Т – 0.64
8	5237 А/Г	интрон 9	rs4272791	G – 1.0 А – 0
9	7064 С/А	интрон 10	rs1784304)	С – 0.78 А – 0.22
10	7539 С/Т	интрон 12	rs28990986	С – 0.99 Т - 0.01
11	8578 G/A	3'-область	rs640603	G – 0.58 А - 0.42
12	8693 С/Т	3'-область	rs12276235	С – 1.0 Т – 0

Из двенадцати изученных полиморфизмов четыре (-234 T/A, 3530 C/T, 5237 G/A и 8693 C/T) были полностью неинформативными, т.к. выявился только один из двух возможных аллелей, в одном случае (7539 C/T) один из аллелей оказался крайне редким, а полиморфизм 3581 G/A оказался жестко сцепленным с SNP 2479 G/A (встречаются только гаплотипы GG и AA).

С целью установления общности или независимости происхождения распространенных в России мутантных аллелей гена ПБГД мы провели их гаплотипирование по 6 SNP, локализованным в разных частях этого гена (рис. 17). В исследование были включены больные и их родственники из 19 семей (всего 63 человека), с мутациями: 53delT, Arg173Trp, Gly111Arg, Gly216Asp и IVS13(+2)T→G+6(+G). Результаты гаплотипирования представлены в таблице 9. Нам удалось точно установить гаплотипы 58-ми неродственных аллелей гена ПБГД. В отдельных случаях, в связи с недостаточной репрезентативностью некоторых семей, точно идентифицировать аллели и расставить гаплотипы не представилось возможным.

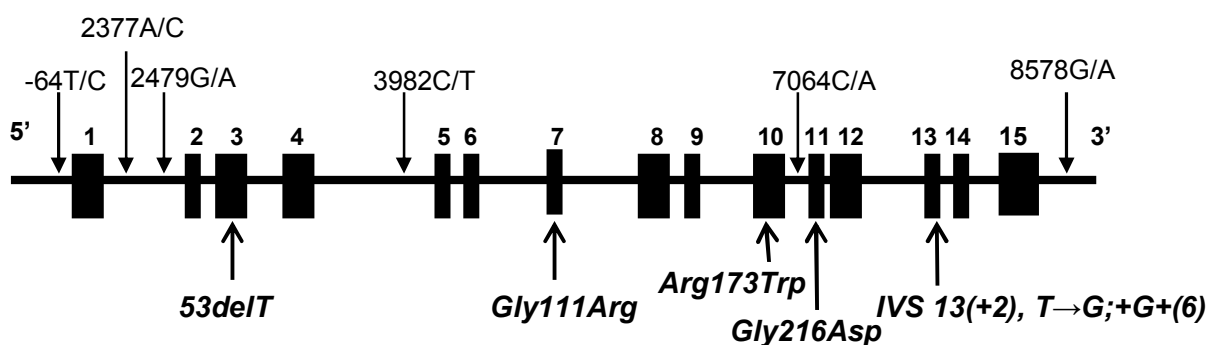


Рис. 17 Схематическое расположение мутаций и полиморфизмов, использованных для гаплотипирования, в гене ПБГД.

Таблица 9. Сочетание мутаций с гаплотипами гена ПБГД.

гаплотипы						Общее число аллелей	53delT	Arg173Trp	Gly111Arg	IVS13(+2) T→C+G(+6)	Gly216Asp	N(Б)**
-64 t/c	2377 a/c	2479 g/a	3982 c/t	7064 c/a	8578 g/a							
C	A	A	T	A	G	6	5					
C	A	A	T	C	G	10			пп219		пп72	3
C	A	A	T	C	A	8		1			пп72	3
C	A	A	T	A	A	4		1				1
C	C	A	T	C	G	5		1		2		
C	C	A	T	A	G	1						
C	C	A	T	C	A	1			1			
T	C	G	C	A	A	1						
T	C	G	C	C	G	10		пп88*	1 пп219			5
T	C	G	T	A	A	1						1
T	C	G	T	C	A	1		пп88				1
T	C	G	C	A	G	3						2
T	C	G	C	C	A	5		1				
T	A	A	T	A	G	1			1			
T	A	A	T	C	A	1					1	
Всего						58						
*- пациенты, для которых не удалось установить принадлежность мутантного аллеля к одному из двух выявленных альтернативных гаплотипов.												
**- N(Б) – нормальные аллели, сонаследующиеся с мутантными, у больных ОПП.												

Всего было идентифицировано 15 различных гаплотипов, из которых три оказались наиболее распространенными, 8 – редкими, а остальные встречались со средней частотой. По первым четырем позициям явно выделились три основных коровых гаплотипа – СААТ, ССАТ, TCGT и два минорных - ТААТ и TCGT. Две остальные позиции были наиболее переменными и их альтернативные вариации встречались в сочетании практически со всеми коровыми гаплотипами, как мажорными, так и минорными. Интересно отметить, что эти два полиморфизма с динуклеотидами CG никак не связаны, но оба локализованы в олигопуриновых (олигопиримидиновых) блоках, некоторые позиции в которых, судя по всему, также обладают повышенной способностью к мутированию.

Мутация 53delT у всех пяти исследованных больных оказалась сцепленной только с одним редким гаплотипом, который в 53 остальных

аллелях встретился всего один раз, что свидетельствует о ее монофилетическом происхождении. Гаплотипирование аллелей с мутацией IVS13+2T→G; +6(+G), которая встретилась у наших пациентов дважды и, как делеция 53delT, нигде кроме российской популяции не была обнаружена, также показало сцепление только с одним гаплотипом. Несмотря на то, что у нас было всего два больных с таким дефектом гена ПБГД, скорее всего он тоже имеет монофилетическое происхождение, поскольку независимое возникновение подобных сложных вариаций представляется крайне маловероятным.

Как и ожидалось, мутации Arg173Trp и Gly111Arg оказались сцепленными с несколькими гаплотипами, что характерно для замен, возникающих в динуклеотидах CpG, являющихся, как известно, горячими точками мутагенеза у эукариот. Полифилетическое происхождение этих мутаций отмечено и в других популяциях, для которых проводились подобные исследования [De Siervi et al, 1999; Schneider-Yin et al, 2004]. Мутация Gly216Asp также оказалась ассоциирована с разными гаплотипами.

3.6. Поиск функционально неполноценных аллелей гена ПБГД.

Как уже отмечалось выше, очевидной корреляции между клиническим проявлением болезни и характером мутационного нарушения в гене ПБГД не найдено. Пенетрантность мутантного гена при ОПП невысока и клинически болезнь развивается только у 10-15% носителей. Так как клиническое проявление ОПП связано не с дефицитом конечного продукта (гема), а с накоплением токсичных субстратов-предшественников, и 50%-ное снижение активности ПБГД за счет мутантного аллеля не является достаточным основанием для формирования клинического фенотипа - речь идет о дополнительных генетических факторах, усиливающих дисбаланс в системе фермент/субстрат. Одним из таких факторов могут быть функционально

неполноценные аллели гена ПБГД дикого типа, сочетание которых с мутантным аллелем гена ПБГД может определять его пенетрантность. Такой механизм продемонстрирован группой французских исследователей для эритропоэтической протопорфирии, где найдена прямая корреляция между клиническим фенотипом и сочетанием мутантного и слабо экспрессирующегося аллелей гена феррохелатазы. В рамках данного исследования мы проверили гипотезу о существовании аналогичного механизма для ОПП.

В ходе упоминавшегося выше гаплотипирования гена ПБГД в выборке больных, асимптомных носителей и здоровых индивидов из 19 семей, затронутых ОПП, для 16 больных были точно установлены гаплотипы нормальных аллелей (табл.9) Как видно из приведенных данных, у больных ОПП мутантный аллель гена ПБГД сочетается с нормальными аллелями дикого типа, имеющими самые разные гаплотипы, причем преимущественно наиболее распространенные. Аналогичная картина наблюдается и у асимптомных носителей мутантного гена. Из полученных результатов следовало, что если функциональный полиморфизм, определяющий в сочетании с мутантным аллелем клинический фенотип ОПП, все-таки существует, то во-первых, его нет среди изученных нами SNP, а во-вторых – он не имеет жесткого сцепления с выявленными коровыми гаплотипами. Такой полиморфизм, скорее всего, должен быть следствием неоднократно повторявшегося события, т.е. ассоциироваться с горячими точками мутаций, такими, например, как динуклеотиды CpG или, по аналогии с SNP в позициях 7064 и 8578, олигопиримидиновые (олигопуриновые) блоки, некоторые позиции в которых, судя по всему, также обладают повышенной способностью к мутированию (возможно, в процессе репарации пиримидиновых димеров). Сделанные выводы позволили более четко сформулировать критерии поиска функционального полиморфизма в гене ПБГД:

1) искомый полиморфизм с высокой вероятностью должен представлять собой нуклеотидную замену, затрагивающую горячие точки мутирования;

2) учитывая низкую пенетрантность ОПП (приводимая обычно стандартная оценка 10-15% характеризует скорее ее верхний предел), частота встречаемости функционально неполноценного аллеля не должна существенно превышать 10%-ного барьера;

3) если предположения о свойствах искомого полиморфизма верны, то он в силу низкой частоты встречаемости с большой вероятностью должен выявляться как гетерозиготная вариация.

Учитывая невысокую эффективность “точечного” поиска, основанного на анализе известных SNP, в чем мы вполне убедились на собственном опыте, а также то обстоятельство, что искомый полиморфизм может оказаться из разряда новых, до сих пор не выявленных, было решено использовать подход, основанный на секвенировании полноразмерного гена ПБГД у больных ОПП.

Мы амплифицировали и секвенировали полноразмерный ген ПБГД в виде 15-ти перекрывающихся фрагментов длиной от 580 до 1100 пн для двух пациенток с ОПП (пп41 - мутация 53delT и пп 295 - мутация Arg173Gln). В обоих случаях прочитанная нуклеотидная последовательность располагалась между позицией - 616 с 5'-стороны от сайта кэпирования и позицией 209 с 3'-стороны от сайта полиаденилирования (соответствуют позициям 1748 и 11107 в GenBank NCBI NT_033899) и имела общую протяженность 9360 пн. Анализ расшифрованных последовательностей показал, что в них нет каких-либо новых полиморфных вариаций гена ПБГД. Пациентка пп295 оказалась гомозиготной по всем известным полиморфизмам, кроме вариации C/A в интроне 10 (rs1784304 в базе данных SNP NCBI). Пациентка пп41 также была гетерозиготой по этому полиморфизму. Но данный SNP уже был охарактеризован нами ранее и было показано отсутствие его ассоциации с

пенетрантностью ОПП. Пациентка пп41 была гетерозиготой еще по двум SNP - вариации A/G в 3'-области (rs640603), также изученной нами ранее, и вариации C/T в интроне 12 (rs28990986), при анализе которой был обнаружен только аллель C. Низкая частота встречаемости аллеля T (0.04 - 0.08) в европейских популяциях и его гипотетическая функциональная характеристика (формирование аномального донорного сайта сплайсинга) позволяли предположить, что он может играть определенную роль в патогенезе ОПП, по крайней мере у части пациентов. При более подробном анализе SNP rs28990986 в выборке из 40 неродственных больных ОПП было найдено только 6 гетерозигот C/T (гомозигот T/T не было). Таким образом, частота аллеля T в нашей выборке составила 0.075, что вполне соответствует нормальной частоте его встречаемости в европейских популяциях, и кроме того было показано, что он ассоциируется как с нормальными, так и с мутантными вариантами гена ПБГД, из чего был сделан вывод о его непричастности к формированию клинического фенотипа ОПП. Обе расшифрованные геновые последовательности были проанализированы по всем остальным известным позициям SNP и во всех случаях они оказались гомозиготными по аллельным вариантам, имеющим высокую частоту встречаемости. Подводя итоги данной части исследования, можно сказать, что даже определение полной первичной структуры гена ПБГД у больных ОПП не выявляет никаких аллельных вариантов дикого типа, которые, наследуясь совместно с мутантным аллелем, могли бы определять клинический фенотип заболевания.

В данной части исследования также были проанализированы электрофореграммы, полученные при автоматическом секвенировании кДНК ПБГД 38 больных ОПП, для которых мутационный анализ оказался успешным, с целью полуколичественной оценки соотношения мутантной и нормальной мРНК ПБГД в исходных образцах РНК. При этом мы исходили из вполне оправданного на наш взгляд соображения, что в большинстве

своим генные мутации не оказывают существенного влияния на эффективность транскрипции и только немногие из них могут заметно изменять стабильность мРНК [Mustajoki et al, 1997]. Для мутаций, представляющих собой единичные нуклеотидные замены, при оценке соотношения мутантного и нормального пиков учитывался нуклеотидный контекст, в котором находилась мутантная позиция (так, например, в использованной нами системе секвенирования интенсивность сигнала G существенно зависит от предшествующей "буквы", значительно убывая в ряду TG - CG - AG). В подавляющем большинстве проанализированных случаев нормальный и мутантный сигналы были сопоставимы, различаясь в пределах 20-50%, причем нормальный сигнал, как правило, превышал мутантный. Из полученных данных следует, что у больных ОПП нормальный аллель гена ПБГД скорее всего не отличается сниженной экспрессией.

Мы пытались также ответить на вопрос - может ли влиять на пенетрантность ОПП аномальный сплайсинг мРНК ПБГД, о котором говорилось в начале главы. P.Ong и ее коллеги [Ong et al, 1998], изучив небольшие выборки доноров и больных ОПП, у которых отсутствовали в мРНК ПБГД экзон 3 или экзон 12, или оба экзона вместе, не обнаружили между ними никаких существенных отличий. Авторы пришли к выводу, что аномальный сплайсинг мРНК ПБГД не влияет на клинику данного заболевания. Поскольку основной стратегией поиска мутаций в гене ПБГД в данной работе является секвенирование кДНК, получаемой в реакции ОТ-ПЦР, аномальный сплайсинг на электрофореграммах с секвенатора мы наблюдаем достаточно часто (примерно в половине случаев). Доля аномальной мРНК, как правило, не превышает 5-10%. Однако, в среднем, у одного из десяти пациентов вклад аномально сплайсированных молекул в общий пул мРНК ПБГД оказывается существенно выше (25-40%). Именно такие пациенты и представляли для нас особый интерес. Если предположить, что аномальный сплайсинг затрагивает только аллель дикого типа, то тогда

он вполне может влиять на клиническую картину ОПП. В 2007 году мы выявили двух пациенток с повышенным содержанием (около 30%) аномальной мРНК ПБГД без экзона 12 - пп290 (мутация Arg173Trp) и пп295 (Arg173Gln). (рис.18)

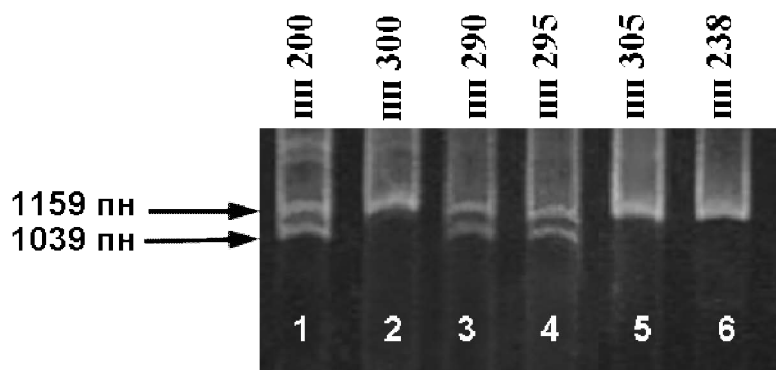


Рис. 18 ОТ-ПЦР-анализ образцов РНК больных ОПП.

1 – IVS12+1G→T (контроль); 2 – Arg173→Trp; 3 – Arg173→Trp; 4 – Arg173→Gln; 5 – 53delT; 6 – Trp283→Term. Фрагмент 1039 пн не содержит экзона 12.

При секвенировании фрагмента гена ПБГД, включающего экзоны с 11-го по 13-ый, а также полноразмерные интроны 11 и 12, никаких структурных аномалий у этих пациенток выявлено не было. В то же время, анализ полученных для кДНК структурных электрофореграмм, на которых мутантная позиция располагалась за точкой сбоя, вызываемого потерей экзона 12 (область "двоения", прочитываемая методом вычитания), показал, что в обоих случаях аномальный сплайсинг затрагивает обе формы мРНК, и нормальную и мутантную. Интересный сам по себе факт аллельной синхронности аномального сплайсинга безусловно требует более серьезного изучения, поскольку может способствовать прояснению механизмов этого достаточно распространенного, но мало изученного явления. Вместе с тем он служит дополнительным свидетельством отсутствия влияния aberrantных форм мРНК ПБГД на формирование клинического фенотипа ОПП. Суммируя результаты данной части исследования, можно с достаточной

уверенностью сказать, что гипотеза о модуляции пенетрантности ОПП функционально неполноценным аллелем гена ПБГД дикого типа никак себя не оправдала. Более того, не было обнаружено никаких свидетельств существования подобного аллеля. Клиническое проявление ОПП определяется какими-то другими механизмами.

3.7. Изучение генов системы детоксикации.

Клиническое проявление острой перемежающейся порфирии обусловлено генетическим дефектом гена порфобилиногендезаминазы. В то же время, как уже не раз отмечалось, ОПП характеризуется неполной пенетрантностью и многие индивидуумы, являющиеся носителями мутационных нарушений в гене ПБГД, в течение своей жизни могут не иметь клинического проявления заболевания.

В настоящее время многие ученые проявляют большой интерес к исследованию генетических факторов, влияющих на повышенную чувствительность человеческого организма к промышленным и сельскохозяйственным ядам, фармакологическим препаратам. Известно большое число генов, контролирующих синтез ферментов, отвечающих за детоксикацию любых чужеродных веществ, включая фармакологические препараты, поступающие в организм человека [Nebert, 1997; Кулинский, 1999; Кукес, 2004].

Поскольку провоцирующими факторами клинического проявления ОПП являются большой спектр лекарственных препаратов, химических веществ, алкоголь, в детоксикации которых принимают участие различные ферменты, мы предположили, что изучение полиморфизмов генов системы детоксикации поможет объяснить очевидные индивидуальные различия в отношении пенетрантности заболевания.

Кроме этого, исследование полиморфизмов генов детоксикации представляется целесообразным, если учитывать тот факт, что клинический фенотип заболевания проявляется вследствие накопления избытка порфиринов и их предшественников в организме человека, которые, возможно, могут являться эндогенными субстратами для ферментов, задействованных в системе детоксикации.

Нами были изучены функциональные полиморфизмы 2-х генов фазы 1 системы детоксикации (*CYP1A1*, *CYP2E1*) и 4-х генов фазы 2 (*NAT2*, *mEPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1*). Выбор такого спектра генов системы детоксикации определялся их широким диапазоном действия, активным вовлечением их продуктов в детоксикацию многих веществ экзогенной (промышленные загрязнения, фармакологические препараты, алкоголь) и эндогенной (гормоны, вирусные печеночные инфекции) природы.

3.7.1. Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей генов фазы 1 системы детоксикации ксенобиотиков.

Для выявления возможной ассоциации полиморфизма генов фазы 1 системы детоксикации ксенобиотиков (*CYP1A1* и *CYP2E1*) с клиническим проявлением ОПП был проведен сравнительный анализ частот генотипов и аллелей этих генов у больных ОПП и асимптомных носителей мутации в гене ПБГД. В общей сложности в анализ было включено 30 больных и 30 асимптомных носителей. Цитохромы P450 играют важную роль в метаболизме порфиринов и, следовательно, могут иметь влияние на патогенез печеночных порфирий. Возможная роль полиморфных вариантов генов, кодирующих арилууглеводородкарбоксилазу (*CYP1A1*) и микросомальную монооксигеназу (*CYP2E1*) заключается в том, что они могут влиять на манифестацию ОПП посредством изменяющейся ферментативной активности с наиболее высоким производством реактивных интермедиатов, ингибирующих порфобилиногендезаминазу.

3.7.1.1. Ген *CYP1A1*.

Для идентификации аллелей S (Val462) и N (Ile 462) полиморфизма Ile462Val гена *CYP1A1* применяли метод ПЦР с последующей рестрикцией ПЦР - продукта эндонуклеазой Hind II. (рис.19)

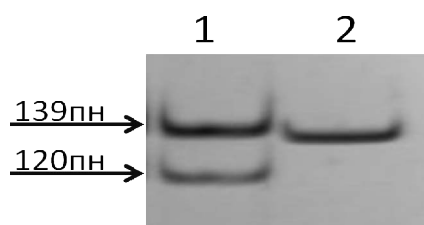


Рис. 19. Идентификация аллелей S (Val462) и N (Ile 462) гена *CYP1A1*.

Треки: 1)Ile/Val, 2)Ile/Ile

Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей полиморфизма A2455G(Ile462Val) гена *CYP1A1* между выборками больных ОПП и асимптомных носителей не выявил статистически значимых различий ($p > 0.05$) между изученными группами. Частоты аллелей S (Val462) и N (Ile 462) составили: 6,7% и 93,3% - у больных ОПП, и 3,3% и 96,7% - в группе бессимптомных носителей (табл.10). Частоты генотипов S/S, S/N и N/N составили: 0,0%, 13,4% и 86,6% - у больных ОПП, и 0,0%, 6,7% и 93,3% - в группе бессимптомных носителей.

Таблица 10. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма A2455G гена *CYP1A1* у больных ОПП и асимптомных носителей.

Генотипы	Больные ОПП		Асимптомные носители	
	n	%	n	%
S/S	0	0	0	0,0
S/N	4	13,4	2	6,7
N/N	26	86,6	28	93,3
Всего	30	100	30	100
Аллели				
S	4	6,7	2	3,3
N	26	86,6	28	93,3

Известно, что фермент арилуглеводородкарбоксилаза, кодируемый геном *CYP1A1*, участвует в метаболизме многих лекарственных средств, полициклических ароматических углеводородов и эстрогенов, осуществляя гидроксилирование эстрадиола, что приводит к его активации [Badawi et al, 2001]. Из литературных данных также известно, что частоты некоторых полиморфных вариантов гена *CYP1A1* в контрольных выборках из различных популяций могут существенно отличаться. В нашем случае полиморфизм гена *CYP1A1* оказался неинформативным. Почти все индивидуумы, как больные ОПП, так и асимптомные носители оказались гомозиготами, имеющими генотип N/N.

3.7.1.2. Ген *CYP2E1*.

Для идентификации аллелей C1 (-1259G) и C2 (-1259C) полиморфизма гена *CYP2E1* применяли метод ПЦР с последующей рестрикцией ПЦР-продукта эндонуклеазой рестрикции *RsaI*. (рис.19). Данный полиморфизм характеризуется гомозиготами C1/C1, что соответствует аллелю дикого типа, гетерозиготами C1/C2 и гомозиготами C2/C2, соответствующими мутантному аллелю.

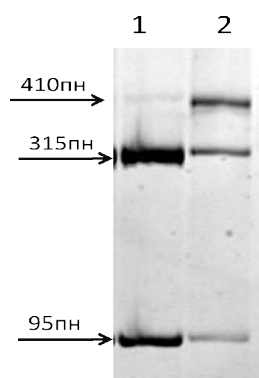


Рис.19. Идентификация аллелей C1 (-1259G) и C2 (-1259C) гена *CYP2E1*.

Треки: 1)C2/C2, 2)C1/C2

Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей (-1259)G/C полиморфизма гена *CYP2E1* между выборками больных ОПП и асимптомных

носителей не выявил статистически значимых различий ($p>0.05$). Частоты аллелей C1 (-1259G) и C2 (-1259C) составили: 3,3% и 96,7% - у больных ОПП, и 5% и 95,0% - в группе асимптомных носителей (табл.). Частоты генотипов C1/C1, C1/C2 и C2/C2 составили: 0,0%, 6,7% и 93,3% - у больных ОПП, и 0,0%, 10,0% и 90,0% - в группе асимптомных носителей (табл.11).

Таблица 11. Распределение частот генотипов и аллелей (-1259)G/C полиморфизма гена *CYP2E1* у больных ОПП и бессимптомных носителей.

Генотипы	Больные ОПП		Асимптомные носители	
	п	%	п	%
C1/C1	0	0	0	0,0
C1/C2	2	6,7	3	10,0
C2/C2	28	93,3	27	90,0
Всего	30	100	30	100
<i>Аллели</i>				
C1	2	3,3	3	5,0
C2	58	96,7	57	95,0

Изофермент цитохрома Р-450 (*CYP2E1*), является ключевым ферментом микросомальной этанолаксилирующей системы (МЭОС) и экспрессируется, главным образом, в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов [Кукес и др., 2001]. Показано, что МЭОС метаболизирует четверть этанола, поступающего в организм [Подымова С.Д., 1998]. Различные исследования, посвященные анализу полиморфных вариантов гена *CYP2E1*, показывают индивидуальные и популяционные различия в чувствительности (толерантности) к алкоголю. Исследование полиморфизмов данного гена в нашем случае представляло интерес, поскольку алкоголь, который является субстратом для *CYP2E1*, может провоцировать клиническую манифестацию острых печеночных порфирий. Наши предположения о возможной ассоциации данного гена с пенетрантностью ОПП также не оправдались, как и в предыдущем случае, полиморфизм гена *CYP2E1* не показал никаких различий между выборками больных ОПП и асимптомных носителей.

3.7.2. Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей генов фазы 2 системы детоксикации ксенобиотиков.

Для выявления возможной ассоциации полиморфизма генов фазы 2 системы детоксикации ксенобиотиков (*NAT2*, *mEPHX1*, *GST*) с клиническим проявлением ОПП был проведен сравнительный анализ частот генотипов и аллелей этих генов у больных ОПП и асимптомных носителей мутации в гене ПБГД, а также между подгруппами асимптомных носителей. В общей сложности в анализ было включено 60 больных и 40 асимптомных носителей

3.7.2.1. Ген *NAT2*.

В настоящее время на основе сопоставления генетических и биохимических данных различают 3 основных “медленных” аллеля гена *NAT2* (S1, S2, S3) и один ”дикий” тип (немутантный вариант) “быстрого” аллеля (N). По данным литературы “быстрые ацетиляторы” имеют, по крайней мере, один быстрый аллель, т.е. данный фенотип характерен как для гомозигот (N/N), так и для гетерозигот (N/S1,S2,S3 - генотип N/S). Соответственно, “медленными ацетиляторами” являются гомозиготы по различным комбинациям “медленных аллелей” (S1/S1, S1/S2, S1/S3, S2/S2, S2/S3, S3/S3 - генотип S/S). Активность ферментов ацетилирования у всех “медленных ацетиляторов” снижена по сравнению с нормой (“быстрыми ацетиляторами”) в среднем на 20%.

Мы провели анализ четырех полиморфных вариантов гена *NAT2*: одного “быстрого” (немутантного) N аллеля и трех аллелей, приводящих к снижению ферментативной активности белка (C481T (аллель S1), G590A (аллель S2) и G857A (аллель S3)). Для идентификации различных аллелей *NAT2* применялась полимеразная цепная реакция. Амплифицированный фрагмент размером 547 пн содержит три полиморфных сайта, выявляемых рестрикционными эндонуклеазами KpnI, TagI и BamHI. Потеря одного из рестрикционных сайтов говорит о наличии мутантного аллеля,

ассоциированного с S- формой N-ацетилтрансферазы. Мутантные аллели классифицируются как S1, S2, S3 и теряют сайты узнавания для эндонуклеаз KpnI, TagI и BamHI, соответственно. Результаты ПЦР-анализа на наличие аллелей медленной (S) и быстрой (N) форм N-ацетилтрансферазы приведены на рис. 20.

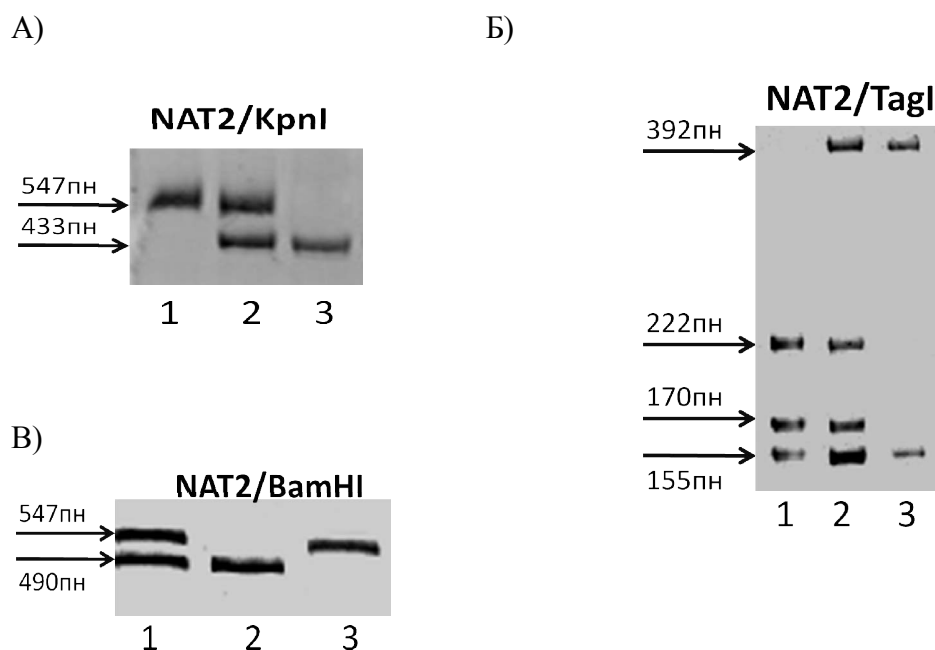


Рис.20. Идентификация NAT2 аллелей

А)Рестрикция KpnI:1-S1/S1,2-S1/N, 3-N/N

Б) Рестрикция TagI:1– N/N, 2– S2/N, 3 – S2/S2

В)Рестрикция BamHI: 1- S3/N, 2-N/N, 3-S3/S3

При сравнительном анализе частот генотипов и аллелей гена *NAT2* между выборками больных ОПП и асимптомными носителями, нам удалось получить статистически достоверные отличия только в случае распределения генотипа N/S ацетилтрансферазы.($p=0,0428$, $\chi^2=4,1033$) (табл.12) Следует

отметить, что в нашу группу асимптомных носителей также вошли молодые люди и дети, у которых возможно клиническое развитие заболевания в будущем и это могло отразиться на правильности интерпретации полученных нами результатов. Опираясь на тот факт, что клинически ОПП обычно проявляется после пубертатного возраста и у возрастных носителей (старше 45 лет) первично манифестирует крайне редко, мы разограничили группу асимптомных носителей по возрастному критерию, разбив нашу первоначальную выборку на две подгруппы. К первой подгруппе мы отнесли людей старше 45 лет, а ко второй - младше 45.(табл. 12) При сравнении этих подгрупп с группой больных ОПП нами были обнаружены статистически достоверные различия в распределении генотипа N/N между подгруппой асимптомных носителей возраст которых старше 45 лет и группой больных ОПП ($p=0,0290$, $\chi^2=4,7676$). Отсутствие статистически достоверных результатов в случае распределения генотипа N/S объясняется, по всей вероятности, резким сокращением обследуемой выборки (в два раза) при разбиении группы асимптомных носителей по возрастному критерию. Как видно из таблицы, четыре человека из пяти, имеющих генотип N/N, относятся ко второй («старшей») подгруппе, и только один человек оказался в первой («младшей») подгруппе – женщина, 36 лет. В родословной этой женщины больными являются ее мать и младшая сестра, имеющие генотип N\N ариламин-N-ацетилтрансферазы. Среди 60 больных ОПП генотип N/N встретился всего один раз у пожилой женщины, пережившей в молодости единичный приступ заболевания.

Таблица 12. Распределение частот генотипов и аллелей N-ацетилтрансферазы у больных ОПП и асимптомных носителей.

Генотипы	Больные ОПП		Асимптомные носители ОПП		Асимптомные носители ОПП (больше 45лет)		Асимптомные носители ОПП (меньше 45лет)	
	N	%	n	%	n	%	n	%
N/N	1	1,7	5	12,5	4	23,5	1	5,3
N/S	34	58,6	15	37,5	6	35,3	7	36,8
S/S	23	39,7	20	50,0	7	41,2	11	57,9
Всего	58	100	40	100	17	100	19	100
<i>Аллели</i>								
<i>N</i>	36	31,0	25	35,7	14	41,2	9	23,7
<i>S</i>	80	69,0	45	64,3	20	58,8	29	76,3

Таким образом, полученные данные дают нам определенное основание полагать, что генотип N/N N- ацетилтрансферазы может служить фактором благоприятного прогноза в предсказании пенетрантности ОПП.

3.7.2.2. Ген *mEPHX1*.

Известно, что действие эндогенных соединений и активность многих лекарственных препаратов в значительной степени зависят от баланса между 1-й и 2-й фазами биотрансформации. Основной функцией фазы 2 является увеличение гидрофильности и снижение токсичности ксенобиотиков путем присоединения к их функциональным группам других групп или молекул (конъюгация).

Эпоксидгидролазы осуществляют промежуточный этап детоксикации, присоединяя воду к образованным цитохромом Р-450 эпоксидам, превращающимся в трансгидродиолы и далее, под действием других ферментов, в конъюгаты с глюкуроновой кислотой и глутатионом [Артамонов и др., 2004; Кукес, 2004]. Различный уровень ферментативной активности обусловлен однонуклеотидными заменами в 3-м экзоне (мутация

T337C(Tyr113His), “медленная форма”, генотип S/S) и в 4-м экзоне (мутация A415G(His139Arg), “быстрая форма”, генотип N/N).

При сравнительном анализе этих полиморфных вариантов гена *mEPHX1* в группе больных ОПП и асимптомных носителей заболевания статистически достоверных различий выявлено не было.

Для идентификации аллелей S (113His) и N (113Tyr) полиморфизма Tyr113His экзона 3 гена *mEPHX1* применяли метод ПЦР с последующей рестрикцией ПЦР продукта эндонуклеазой EcoR V.(рис.21, А.).

Для идентификации аллелей F (139His) и N (139Arg) полиморфизма His139Arg экзона 4 гена *mEPHX1* применяли метод ПЦР с последующей рестрикцией ПЦР продукта эндонуклеазой Rsa I.(рис.21, Б.)

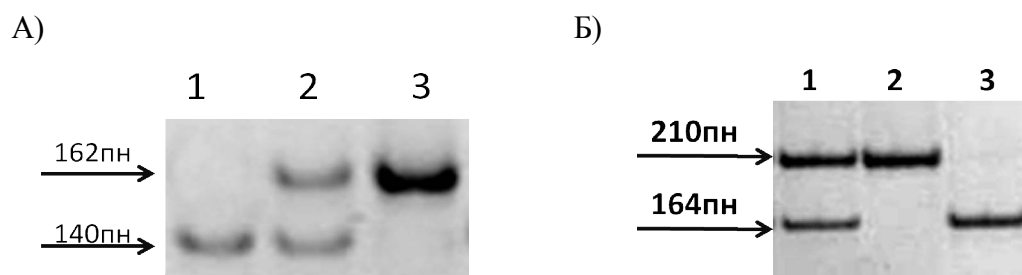


Рис. 21 А) Идентификация аллелей S (113His) и N (113Tyr) гена *mEPHX*:

1-N/N, 2-N/S, 3- S/S.

Б) Идентификация аллелей F (139His) и N (139Arg) гена *mEPHX1*:

1-N/F, 2-N/N, 3- F/F.

Частоты аллелей S (113His) и N (113Tyr) составили: 37,1% и 62,9% - в группе больных ОПП, 37,2% и 62,8% - в группе асимптомных носителей. Частоты генотипов S/S , S/N и N/N по гену *mEPHX1* составили: 15,5%,

43,2% и 41,3% - в группе больных ОПП, 8,8%, 38,3% и 52,9% - в группе асимптомных носителей, соответственно. (табл. 13).

Таблица 13. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма Tyr113His гена *mEPHX1* у больных ОПП и асимптомных носителей.

Генотипы	Больные ОПП		Асимптомные носители	
	n	%	n	%
S/S	9	15,5	3	8,8
S/N	25	43,2	13	38,3
N/N	24	41,3	18	52,9
Всего	58	100	34	100
<i>Аллели</i>				
S	43	37,1	29	37,2
N	73	62,9	49	62,8

При анализе частот аллелей и генотипов полиморфизма Tyr113His гена *mEPHX1* в подгруппах асимптомных носителей были получены следующие результаты: частоты аллелей S (113His) и N (113Tyr) составили 30,0% и 70,0% - для асимптомных носителей ОПП старше 45 лет, 26,3% и 73,6% - для асимптомных носителей ОПП младше 45 лет, 37,1% и 62,9% - для больных ОПП; частоты генотипов S/S, S/N и N/N в подгруппах составили: 6,6%, 46,7% и 46,7% - для асимптомных носителей ОПП старше 45 лет, 10,5%, 31,6% и 57,9% - для асимптомных носителей ОПП младше 45 лет, 15,5%, 43,2% и 41,3% - для больных ОПП (табл. 14)

При сравнении частот аллелей и генотипов в подгруппах асимптомных носителей отличающихся по возрастному критерию, достоверных различий выявлено не было ($p>0.05$).

Таблица 14. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма Tyr113His гена *mEPHX1* у асимптомных носителей ОПП «старшей» и «младшей» возрастных групп и больных ОПП.

Генотипы	Больные ОПП		Асимптомные носители ОПП (больше 45лет)		Асимптомные носители ОПП (меньше 45лет)	
	n	%	n	%	n	%
S/S	9	15,5	1	6,6	2	10,5
S/N	25	43,2	7	46,7	6	31,6
N/N	24	41,3	7	46,7	11	57,9
Всего	58	100	15	100	19	100
<i>Аллели</i>						
S	43	37,1	9	30,0	10	26,3
N	73	62,9	21	70,0	28	73,7

Также не было выявлено статистически значимых различий между подгруппами больных ОПП и асимптомных носителей при сравнении частот генотипов и аллелей His139Arg полиморфизма микросомальной эпоксидгидролазы. Частоты аллелей F(139His) и N(139Arg) составили: 19,7% и 80,3% - в группе больных ОПП, 25,0% и 75,0% - в группе асимптомных носителей. Частоты генотипов F/F, F/N и N/N по гену *mEPHX1* составили: 0,0%, 39,3% и 60,7% - в группе больных ОПП, 5,6%, 25,0% и 69,4% - в группе асимптомных носителей, соответственно (табл.15).

Таблица 15. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма His139Arg гена *mEPHX1* у больных ОПП и асимптомных носителей.

Генотипы	Больные ОПП		Асимптомные носители	
	n	%	n	%
F/F	0	0,0	2	5,6
F/N	24	39,3	9	25,0
N/N	37	60,7	25	69,4
Всего	61	100	36	100
<i>Аллели</i>				
F	24	19,7	13	25,0
N	98	80,3	59	75,0

При анализе частот аллелей и генотипов полиморфизма His139Arg гена *mEPHX1* в подгруппах асимптомных носителей были получены следующие результаты: частоты аллелей F(139His) и N(139Arg) составили 17,6% и 82,4% - для асимптомных носителей ОПП старше 45 лет, 18,4% и 81,6% - для асимптомных носителей ОПП младше 45 лет, 19,7% и 80,3% - для больных ОПП; частоты генотипов F/F, F/N и N/N в подгруппах составили: 5,9%, 23,5% и 70,6% - для асимптомных носителей ОПП старше 45 лет, 5,3%, 26,3% и 68,4% - для асимптомных носителей ОПП младше 45 лет, 0,0%, 39,3% и 60,7% - для больных ОПП (табл.16).

При сравнении частот аллелей и генотипов в подгруппах асимптомных носителей, отличающихся по возрастному критерию, достоверных различий выявлено не было ($p>0.05$).

Таблица 16. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма His139Arg гена *mEPHX1* у асимптомных носителей ОПП «старшей» и «младшей» возрастных групп и больных ОПП.

Генотипы	Больные ОПП		Асимптомные носители ОПП (больше 45лет)		Асимптомные носители ОПП (меньше 45лет)	
	n	%	n	%	n	%
F/F	0	0,0	1	5,9	1	5,3
F/N	24	39,3	4	23,5	5	26,3
N/N	37	60,7	12	70,6	13	68,4
Всего	61	100	17	100	19	100
<i>Аллели</i>						
<i>F</i>	24	19,7	6	17,6	7	18,4
<i>N</i>	98	80,3	28	82,4	31	81,6

Поскольку полиморфизмы гена *mEPHX1* (экзон 3 Tyr113His, экзон 4 His139Arg) четко коррелируют с уровнем ферментативной активности белка [Zusterzeel et al, 2001], мы проанализировали их фенотипическое проявление в наших группах больных ОПП и асимптомных носителей, опираясь на то

что фермент может находиться в двух функционально различных состояниях -«медленном» и «быстром», обусловленных мутациями в 3-м экзоне и в 4-м экзоне, соответственно.

Таким образом, можно выделить четыре фенотипа:

- 1) «оч. медленный» - две мутации в экзоне 3 и отсутствие мутаций в экзоне 4 (**His 113His, His 139His**)
- 2) «медленный» - наличие одной мутации в 3 экзоне и отсутствие мутаций в экзоне 4 (**Tyr 113His, His 139His**)
- 3) «нормальный» - нет мутаций в гене mEPHX или гетерозиготы по мутациям 3 и 4 экзонов.(**Tyr 113 Tyr, His 139His** или **Tyr 113His, His 139 Arg**).
- 4) «быстрый» - имеется одна или две мутации в экзоне 4 и нет мутаций в экзоне 3 (**Tyr 113 Tyr, Arg 139 Arg** или **His 139 Arg**).

При сравнении группы больных ОПП с различными подгруппами асимптомных носителей, были получены следующие результаты: частота фенотипа «медленный»/«оч.медленный» составила - 44,8% в группе больных ОПП, 33,3% в группе асимптомных носителей старше 45 лет и 26,3% в группе асимптомных носителей младше 45 лет . В объединенной группе асимптомных носителей частота данного фенотипа составила 26,5%; частота «нормального» фенотипа составила 39,7%, 46,7%, 63,2% и 58,8% для групп больных ОПП, асимптомных носителей старше 45 лет, бессимптомных носителей младше 45 лет и объединенной группе асимптомных носителей, соответственно. Для этих же групп частота «быстрого» фенотипа составила – 15,5%, 20,0%, 10,5% и 14,7%. (табл.17).

Таблица 17. Распределение частот фенотипа гена *mEPHX1* у больных ОПП и асимптомных носителей.

Фенотип	Больные ОПП		Асимптомные носители ОПП		Асимптомные носители ОПП (больше 45лет)		Асимптомные носители ОПП (меньше 45лет)	
	N	%	n	%	n	%	n	%
медленный/оч. медленный	26	44,8	10	29	5	33,3	5	26,3
нормальный	23	39,7	19	55,6	7	46,7	12	63,2
быстрый	9	15,5	5	14,7	3	20,0	2	10,5
Всего	58	100	34	100	15	100	19	100

Несмотря на то, что достоверных отличий в группах больных и бессимптомных носителей в распределении фенотипов эпоксидгидролазы выявлено не было, обращает на себя внимание то, что наличие медленного фенотипа эпоксидгидролазы в подгруппе больных в полтора раза превышает таковой в подгруппе асимптомных носителей. Можно предположить, что наличие «медленного варианта» гена микросомальной эпоксидгидролазы приводит к накоплению промежуточных электрофильных метаболитов, способствует возникновению оксидативного стресса и, как следствие, развитию заболевания.

3.7.2.3. Ген *GST*.

Глутатионтрансферазы относятся к семейству изоферментов, контролирующих конъюгацию электрофильных молекул самих ксенобиотиков (например, различных лекарственных средств) или их метаболитов, образовавшихся в процессе фазы 1, с восстановленным глутатионом. Также эти ферменты способны к прямому связыванию с гидрофобными соединениями, такими как гем, билирубин, стероидные гормоны, что позволяет им участвовать во внутриклеточном накоплении и обеспечивать транспорт биологических веществ с ограниченной

водорастворимостью. Благодаря каталитической активности и способности к связыванию, они участвуют в механизмах защиты клеток от повреждающего действия ксенобиотиков и эндогенных субстанций.

Методом ПЦР была изучена частота гомозигот по нулевому аллелю *GSTM1* и *GSTT1* у больных ОПП и асимптомных носителей мутаций. Наличие гомозигот по нормальному аллелю «+» определялось присутствием на электрофореграммах продукта амплификации размером 271пн для *GSTM1* и фрагмента 315пн для *GSTT1* (рис.22) Отсутствие соответствующих фрагментов указывало на гомозиготность индивидуума по делеции одного из генов. В качестве внутреннего контроля использовали амплификацию фрагмента гена *CYP1A1*. Гетерозиготные особи 0/+ в наших экспериментах не идентифицировались.

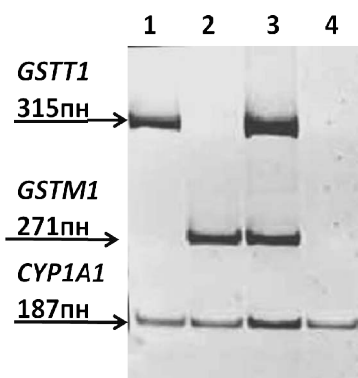


Рис. 22. Идентификация *GSTM1* 0/0 и *GSTT1* 0/0 аллелей методом ПЦР-анализа.

Треки: 1) *GSTM1* 0/0, *GSTT1* +; 2) *GSTM1* +, *GSTT1* 0/0; 3) *GSTM1* +, *GSTT1* +; 4) *GSTM1* 0/0, *GSTT1* 0/0

Сравнительный анализ частоты делеций (0/0) генов *GSTT1* и *GSTM1* между группой больных ОПП и разными группами асимптомных носителей не выявил статистически значимых различий ($p > 0.05$). Результаты анализа

частот встречаемости гомозигот *GSTT1* 0/0 и гомозигот *GSTM1*0/0 у больных ОПП и асимптомных носителей представлены в таблице 18.

Таблица 18. Распределение частот генотипов *GSTT1* 0/0 и *GSTM1*0/0 у больных ОПП и асимптомных носителей

Генотип	Больные ОПП		Асимптомные носители ОПП		Асимптомные носители ОПП (больше 45лет)		Асимптомные носители ОПП (меньше 45лет)	
	п	%	п	%	п	%	п	%
<i>GSTT1</i> 0/0	12	19,35	3	8,3	1	5,9	2	10,5
<i>GSTT1</i> +	50	80,65	33	91,7	16	94,1	17	89,5
<i>GSTM1</i> 0/0	31	50,0	17	47,2	8	47,1	9	47,4
<i>GSTM1</i> +	31	50,0	19	52,8	9	52,9	10	52,6
Всего	62	100	36	100	17	100	19	100

Из таблицы видно, что при распределении частот генотипов гена *GSTT1*, частота «функционально неблагоприятного» генотипа (*GSTT1*0/0) в группе больных ОПП в два раза превышает таковую в объединенной группе асимптомных носителей. А при сравнении со «старшей» группой асимптомных носителей разница увеличивается уже в три раза. По всей вероятности, несмотря на отсутствие статистически достоверных отличий, «функционально неполноценные» варианты генов ферментов детоксикации, особенно «нулевые» варианты глутатион-S-трансфераз, приводящие к отсутствию синтеза соответствующих белковых продуктов, также можно рассматривать как один из факторов риска клинического проявления ОПП.

Также мы провели анализ по сочетанному распределению нормальных и мутантных аллелей генов *GSTT1* и *GSTM1* у больных ОПП и асимптомных носителей. Все индивидуумы были разделены на 4 группы: 1) генотипы *GSTT1*+, *GSTM1*++; 2) генотипы *GSTT1*+, *GSTM1*0/0; 3) генотипы *GSTT1*0/0, *GSTM1*++; 4) генотипы *GSTT1*0/0, *GSTM1*0/0.(табл.19)

Таблица 19. Распределение частот сочетаний генотипов *GSTT1* и *GSTM1* у больных ОПП и асимптомных носителей.

Генотип	Больные ОПП		Асимптомные носители ОПП		Асимптомные носители ОПП (больше 45лет)		Асимптомные носители ОПП (меньше 45лет)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>GSTT1+</i> , <i>GSTM1+</i>	25	40,3	16	44,4	8	47,1	8	42,1
<i>GSTT1+</i> , <i>GSTM10/0</i>	25	40,3	17	47,2	8	47,1	9	47,4
<i>GSTT10/0,GSTM1+</i>	6	9,7	3	8,4	1	5,8	2	10,5
<i>GSTT10/0,GSTM10/0</i>	6	9,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Всего	62	100	36	100	17	100	19	100

Полученные результаты подтвердили наше предположение о возможном участии «функционально неполноценных» («нулевых») вариантов двух исследованных глутатион-S-трансфераз в патогенезе ОПП. Сочетание нулевых аллелей этих генов встретилось только в группе больных ОПП. (табл.19) Несмотря на отсутствие достоверных различий, которые в данном случае могли быть не обнаружены в силу малой репрезентативности выборки асимптомных носителей, сочетание генотипов *GSTT10/0,GSTM10/0* можно рассматривать как неблагоприятный генетический фактор в пенетрантности ОПП. Кроме этого, для шести человек, у которых мы обнаружили сочетание генотипов *GSTT10/0,GSTM10/0*, был известен провоцирующий порфириногенные фактор. В трех случаях это были лекарства, один - инфекция, один-красители и только в одном случае болезнь была вызвана менструальной функцией. Следует отметить, что, несмотря на большое разнообразие порфириногенных факторов, изменение гормонального статуса является превалирующим, а лекарства и инфекции в качестве провоцирующего агента встречаются значительно реже. В силу того, что сочетание редких «нулевых» генотипов глутатионтрансфераз встретилось у индивидуумов, у которых в качестве порфириногенных факторов

фигурировали лекарства и инфекции, можно предположить, что данный фермент задействован в детоксикации именно этих провоцирующих заболевание агентов.

Интересно отметить, что единственная больная, у которой был обнаружен редкий N/N аллель ацетилтрансферазы, ассоциированный с бессимптомным носительством ОПП, получила такой же редкий аллель но уже по сочетанию нулевых генотипов глутатионтрансферазы, предположительно ассоциирующихся с клиническим фенотипом заболевания. Возможно, что именно такое сочетание «хорошего» и «плохого» генов обусловило единичный клинический приступ заболевания, перенесенный ею в молодости.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о вполне заслуженном внимании к исследованию генов детоксикации у больных и асимптомных носителей ОПП.

Заключение.

В результате проведенных исследований осуществлен мутационный анализ гена ПБГД для 75 неродственных больных ОПП. Выявлено 50 различных генных дефектов, 29 из которых ранее в мировой популяции не встречались. Наиболее распространенными оказались мутации 53delT и Arg173Trp (встретились по 8 раз, суммарно около 23%). Микроделеция 53delT и мутация сплайсинга IVS13+2T→G;+6insG имеют монофилетическое происхождение и обнаружены только у пациентов РФ. Проведено молекулярно-генетическое обследование 161 родственника больных ОПП из 50 семей, среди которых выявлено 62 латентных носителя заболевания. Для пяти больных, выявление мутации в гене ПБГД на этапе асимптомного носительства помогло избежать тяжелого клинического проявления заболевания.

Низкая пенетрантность ОПП (около 10%) свидетельствует о том, что мутация в гене ПБГД является необходимым, но не достаточным условием клинического проявления болезни. Гипотеза о модуляции пенетрантности через сонаследование мутантного аллеля и функционально неполноценного аллеля гена дикого типа, как это было показано для эритропоэтической протопорфирии[Gouya et al, 1999], в случае ОПП оказалась неверна. Секвенирование полноразмерных генов ПБГД у неродственных больных ОПП, SNP- анализ и анализ аномально сплайсированной мРНК ПБГД показали, что в случае ОПП клиническое проявление заболевания не зависит от сонаследования мутантного аллеля и функционально неполноценного аллеля дикого типа гена порфобилиногендезаминазы и определяется какими-то другими факторами.

При проведении исследования генов фазы 1 и 2 детоксикации ксенобиотиков нами была показана неслучайная ассоциация между асимптомным носительством ОПП и генотипом N/N по полиморфизмам гена

NAT2. Также, несмотря на отсутствие статистически достоверных отличий, мы можем говорить об определенном влиянии исследованных нами полиморфизмов генов *mEPHX1*, *GSTT* и *GSTM* на клиническое проявление заболевания. Ассоциаций между клиническим проявлением ОПП и функциональными полиморфизмами генов фазы 1 системы детоксикации (*CYP1A1*, *CYP2E1*) выявлено не было.

Из всего сказанного можно сделать предварительный вывод, что в молекулярных механизмах доминантной фенотипической экспрессии мутантного гена ПБГД, определяющего патогенез ОПП, скорее всего задействованы не единичные гены, а целые группы генов. Путем сбора информации и анализа генетических детерминант, определяющих в ряде случаев пенетрантность ОПП, возможно, в будущем можно будет предсказывать вероятность проявления заболевания у асимптомных носителей мутации.

Выводы.

1. Мутационный анализ для 75 неродственных больных с диагнозом острая перемежающаяся порфирия позволил выявить 50 различных дефектов в гене порфобилиногендезаминазы, 29 из которых ранее не были описаны в мировой литературе.
2. Наиболее распространенными мутациями у больных ОПП, проходивших обследование в ГНЦ РАМН, оказались 53 delT и C517T (Arg173Trp).
3. Показано, что мутации 53 delT и IVS13+2T→G;+6insG имеют монофилетическое происхождение.
4. Молекулярно-генетическое обследование родственников из 50-ти семей больных ОПП показало, что из 161 обследованных человек 62 оказались латентными носителями заболевания.
5. Клиническое проявление ОПП не связано с сонаследованием мутантного и функционально неполноценного аллелей гена порфобилиногендезаминазы.
6. Гомозиготное носительство по «быстрому» аллелю гена ацетилтрансферазы (генотип N/N) ассоциировано с латентным течением заболевания ОПП.
7. Сочетание «функционально ослабленных» генотипов глутатионтрансфераз класса T и M (*GSTT10/0, GSTM10/0*) можно рассматривать как неблагоприятный генетический фактор в пенетрантности ОПП.

Приложение.

Позиция	Нуклеотидная замена	Тип мутации	Последствие мутации	Первоисточник
Promoter				
-154	delG	делеция	нарушение транскрипции	Whatley et al, 2000
Exon 1				
3	G-A	миссенс	Met1Ile	Chen et al, 1994
IVS1(33-2)	A-T	сплайсинг	нарушение сплайсинга	Kauppinen, 2002
IVS1(33-1)	G-T	сплайсинг	нарушение сплайсинга	Grandchamp et al, 1989b
IVS1(33+1)	G-A	сплайсинг	нарушение сплайсинга	Grandchamp et al, 1989
IVS1(33+1)	G-T	сплайсинг	нарушение сплайсинга	Poulos et al, 2000
IVS1(33+2)	T-A	сплайсинг	нарушение сплайсинга	Puy et al, 1998
IVS1(33+2)	T-C	сплайсинг	нарушение сплайсинга	Petrides et al, 2000
IVS1(33+3)	G-T	сплайсинг	нарушение сплайсинга	Mustajoki et al, 1998
IVS1(33+5)	G-C	сплайсинг	нарушение сплайсинга	Puy et al, 1998
IVS1(33+5)	G-A	сплайсинг	нарушение сплайсинга	данная работа
IVS3(34-156)	G-A	сплайсинг	делеция 3 экзона	83
IVS3(34-126)	G-C	сплайсинг	делеция 3 экзона	83
IVS3(34-115)	C-A	сплайсинг	делеция 3 экзона	83
IVS2(34-2)	A-G	сплайсинг	делеция 3 экзона	Ong et al, 1995
Exon 3				
41	delA	делеция	стоп-кодон через 3 триплета	Whatley et al, 2000
53	delT	делеция	стоп-кодон через 2 триплета	данная работа
54	G-A	миссенс	Met18Ile	Whatley et al, 2000
64	C-T	миссенс	Arg22Cys	Ong et al, 1995
66	C-G	миссенс	делеция 3 экзона	Llevellyn et al, 1996
70	G-A	миссенс	Gly24Ser	Puy et al, 1997
71	G-A	миссенс	Gly24Asp	данная работа
76	C-T	миссенс	Arg26Cys	Kauppinen et al, 1995
77	G-T	миссенс	Arg 26Leu	Mendez et al, 2009
77	G-A	миссенс	Arg26His	Llewellyn et al, 1996
83	G-A	миссенс	Ser28Asn	Puy et al, 1997
85	C-T	нонсенс	Gln29Term	данная работа
86	A-T	сплайсинг	делеция 3 экзона	Mustajoki et al, 1998
IVS3(87+1)	G-A	сплайсинг	делеция 3 экзона	Lundin et al, 1995
IVS3(87+2)	T-G	сплайсинг	делеция 3 экзона?	Schneider-Yin et al, 2006
IVS3(87+5)	G-T	сплайсинг	делеция 3 экзона	данная работа
IVS3(88-4_16)	del13bp insCA	сплайсинг	делеция 4 экзона?	Yang et al, 2008
IVS3(88-4_16)	del13bp	сплайсинг	делеция 4 экзона?	Yang et al, 2008
IVS3(88-2)	A-G	сплайсинг	делеция 4 экзона	Floderus et al, 2002
Exon 4				
88	C-A	сплайсинг	делеция 4 экзона	Gouya et al, 2004
91	G-C	миссенс	Ala31Pro	Whatley et al, 1999
91	G-A	миссенс	Ala31Thr	Gu et al, 1994
92	C-T	миссенс	Ala31Val	данная работа
95	G-C	миссенс	Arg32Pro	данная работа
97	delA	делеция	стоп-кодон через 10 триплетов	Kauppinen et al, 1995
100	C-T	нонсенс	Gln34Term	Kauppinen et al, 1995
100	C-A	миссенс	Gln34Lys	Mgone et al, 1992

101	A-C	миссенс	Gln34Pro	De Siervi et al,1999
101	A-G	миссенс	Gln34Arg	Gouya et al, 2004
104	C-T	миссенс	Thr35Met	De Siervi et al, 2000
108_109	insT	инсерция	стоп-кодон через 16 триплетов	Solis et al, 1999
113	delT	делеция	стоп-кодон через 4 триплета	Yang et al, 2008
125	T-C	миссенс	Leu42Ser	Whatley et al,1999
125	T-A	нонсенс	Leu42Term	Puy et al, 1996
134	C-A	нонсенс	Ser45Term	Martinez di Montemuros et al,2000
138	C-A	нонсенс	Tyr-Term	Gregor et al, 2002
148	C-T	нонсенс	Gln50Term	Floderus et al, 2002
158_159	insA	инсерция	стоп-кодон через 12 триплетов	Rosipal et al, 1997
160	delA	делеция	стоп-кодон через 43 триплета	Yang et al, 2008
IVS4(160+1)	G-A	сплайсинг	делеция 4 экзона	Whatley et al,1999
IVS4(160+1)	G-T	сплайсинг	делеция 4 экзона	Puy et al, 1997
IVS4(161-6)	C-G	сплайсинг	делеция 5 экзона	Whatley et al,1999
IVS4(161-3_5)	delCTC	сплайсинг	делеция 5 экзона?	Schneider-Yin et al,2006
IVS4(161-2)	A-C	сплайсинг	делеция 5 экзона	Whatley et al,1999
IVS4(161-1)	G-C	сплайсинг	делеция 5 экзона	Petersen et al, 1998
Exon 5				
163	G-T	миссенс	Ala55Ser	Gu et al, 1994
168_169	delGT	делеция	стоп-кодон через 8 триплетов	Schreiber et al,1995
173_174	delC	делеция	стоп-кодон через 40 триплетов	Gu et al, 1994
176	C-T	миссенс	Thr59Ile	Ulbrichova et al,2009
178	G-A	миссенс	Gly60Arg	данная работа
178_179	insG	инсерция	стоп-кодон через 5 триплетов	Gouya et al, 2004
180_181	ins Alu(333bp)	инсерция	стоп-кодон через 18 триплетов	Mustajoki et al, 1999
181	G-A	миссенс	Asp61Asn	Whatley et al,1999
181	G-T	миссенс	Asp61Tyr	Gregor et al, 2002
181	G-C	миссенс	Asp61His	Von Brashch et al,2004
181	delG	делеция	стоп-кодон через 37 триплетов	Martinez di Monviontemurbs et al,2001
182_183	insG	инсерция	стоп-кодон через 5 триплетов	Gu et al, 1994
182	delA	делеция	стоп-кодон через 36 триплетов	Martinez di Montemuros et al,2000
182_183	insGA	инсерция	стоп-кодон через 37 триплетов	Martinez di Monviontemurbs et al,2001
184-185	delAA	делеция	стоп-кодон через 5 триплетов	Whatley et al,1999
184_185	insT	инсерция	стоп-кодон через 3 триплета	Ulbrichova et al,2010
202-203	delCT	делеция	стоп-кодон через 2 триплета	данная работа
206-207	delCT	делеция	Ser69Term	Puy et al, 1997
207-208	insT	инсерция	стоп-кодон через 1 триплет	Gouya et al, 2004

207	delT	делеция	стоп-кодон через 28 триплетов	Floderus et al, 2002
210	G-A	сплайсинг	делеция 5 экзона?	Floderus et al, 2002
IVS5(210+1)	G-A	сплайсинг	делеция 5 экзона	Gu et al, 1994
IVS5(210+2-3)	insG	сплайсинг	делеция 5 экзона	Puy et al, 1997
IVS5(210+2)	T-C	сплайсинг	делеция 5 экзона	Whatley et al, 1999
IVS5(211-1)	G-A	сплайсинг	делеция 6 экзона	Martinez di Monviontemurbs et al, 2001
IVS5(211-1)	G-C	сплайсинг	делеция 6 экзона	данная работа
IVS5(211-2)	A-C	сплайсинг	делеция 6 экзона	данная работа
Exon 6				
215_216	delGA	делеция	стоп-кодон через 10 триплетов	Gross et al, 1999
218_219	delAG	делеция	стоп-кодон через 9 триплетов	Gu et al, 1994
232	A-C	миссенс	Thr78Pro	Ramdall et al, 2000
239	A-G	миссенс	Glu80Gly	Ramdall et al, 2000
242	T-C	миссенс	Leu81Pro	Hessels et al, 2004
254	T-G	миссенс	Leu85Arg	Whatley et al, 1999
257	A-T	миссенс	Glu86Val	Floderus et al, 2002
IVS6(266+1)	G-C	сплайсинг	делеция 6 экзона	Lundin et al, 1997
IVS6(267-54_61)	delGAAGGG GT	сплайсинг	делеция 7 экзона?	Von Brashch et al, 2004
Exon 7				
269	T-G	миссенс	Val90Gly	Whatley et al, 1999
275	T-C	миссенс	Leu92Pro	Floderus et al, 2002
277	G-T	миссенс	Val93Phe	Chen et al, 1994
278	T-A	миссенс	Val93Asp	данная работа
278_280	delTTG	делеция	delVal93	Gregor et al, 2002
287	C-T	миссенс	Ser96Phe	De Rooij et al, 1995
291	delG	делеция	стоп-кодон через 37 триплетов	Puy et al, 1997
293	A-G	миссенс	Lys98Arg	Kauppinen et al, 1995
295	G-C	миссенс	Asp99His	De Rooij et al, 1995
295	G-A	миссенс	Asp99Asn	Martinez di Monviontemurbs et al, 2001
296	A-G	миссенс	Asp99Gly	Floderus et al, 2002
308_309	delTG	делеция	стоп-кодон через 18 триплетов	Martinez di Montemuros et al, 2000
314_315	insC	инсерция	стоп-кодон через 15 триплетов	Schreiber et al, 1995
315	delT	делеция	стоп-кодон через 15 триплетов	Gregor et al, 2002
323_324	insT	инсерция	стоп-кодон через 13 триплетов	Whatley et al, 1999
331	G-A	миссенс	Gly111Arg	Gu et al, 1993b
335	C-A	миссенс	Ala112Asp	данная работа
338	T-C	миссенс	Ile113Thr	Floderus et al, 2002
339_340	insT	инсерция	стоп-кодон через 7 триплетов	Solis et al, 2004
340_341	insT	инсерция	стоп-кодон через 7 триплетов	Whatley et al, 1999
342	C-A	нонсенс	Cys114Term	Puy et al, 1997
IVS7(344+1)	G-C	сплайсинг	делеция 7 экзона	De Siervi et al, 2001
IVS7(344+1)	G-A	сплайсинг	делеция 7 экзона	Robreau-Fraolini et

				al,2000
IVS7(344+2)	T-C	сплайсинг	образование криптического сайта сплайсинга через 15п.н	Martinez di Montemuros et al,2000
IVS7(344+2_5)	delTAAG	сплайсинг	делеция 7 экзона	данная работа
IVS7(344+33)	G-T	сплайсинг	делеция 7 экзона	Whatley et al,1999
IVS7(345-2)	A-G	сплайсинг	делеция 8 экзона	Floderus et al, 2002
IVS7(345-1)	G-A	сплайсинг	делеция 8 экзона	Schreiber et al,1994
IVS7(345-1)	G-C	сплайсинг	делеция 8 экзона	Von Brashch et al,2004
Exon 8				
346	C-T	миссенс	Arg116Trp	Gu et al, 1993
347	G-A	миссенс	Arg116Gln	Mgone et al, 1994
356	C-T	миссенс	Pro119Leu	Lundin et al,1995
361	G-T	миссенс	Asp121Tyr	Schneider-Yin et al,2006
365	C-G	миссенс	Ala122Gly	Kauppinen et al, 2002
371	T-A	миссенс	Val124Asp	Puy et al, 1997
415	G-T	нонсенс	Glu139Term	данная работа
416_417	insCA	инсерция	стоп-кодон через 116 триплетов	Mustajoki et al, 19989
422	delG	сплайсинг	делеция 8 экзона	Whatley et al,1999
IVS8(422+1)	G-T	сплайсинг	делеция 8 экзона	Lundin et al,1995
IVS8(423-1)	G-T	сплайсинг	делеция 15 п.н. в 9 экзоне	De Siervi et al, 1999b
IVS8(423-1)	G-A	сплайсинг		данная работа
Exon 9				
445	C-T	нонсенс	Arg149Term	Kauppinen et al, 1995
446	G-A	миссенс	Arg149Gln	Delfau et al, 1991
446	G-T	миссенс	Arg149Leu	Gu et al, 1994
446	G-C	миссенс	Arg149Pro	Yang et al, 2008
453_455	delAGC	делеция	delAla152	De Siervi et al, 1999b
463	C-T	нонсенс	Gln155Term	Scobie et al, 1990
469_470	delAA	делеция	стоп-кодон через 52 триплета	Di Pierro et al,2004
470_471	insA	инсерция	стоп-кодон через 53 триплета	Schreiber et al,1994
489_490	insTCCT	инсерция	стоп-кодон через 1 триплет	Whatley et al,1999
IVS9(498+1)	G-A	сплайсинг	делеция 9 экзона	Nielsen et al, 1997
IVS9(498+15)	G-T	сплайсинг	делеция 9 экзона?	Von Brashch et al,2004
IVS9(498+22)	G-A	сплайсинг		Martinez di Monviontemurbs et al,2001
IVS9(499-13)	del14ins3	сплайсинг	делеция 10 экзона?	Von Brashch et al,2004
IVS9(499-1)	G-A	сплайсинг	делеция 10 экзона	Lundin et al, 1994
Exon 10				
499	C-T	миссенс	Arg167Trp	Gu et al, 1992
167	G-A	миссенс	Arg167Gln	Delfau et al, 1990
500	delG	делеция	стоп-кодон через 98 триплетов	Puy et al, 1997
503_504	insA	инсерция	стоп-кодон через 40 триплетов	Schuurmans et al,2001
508-510	delCTC	делеция	delLeu170	Schuurmans et al,2001
517	C-T	миссенс	Arg173Trp	Lee et al, 1991b
517	C-G	миссенс	Arg173Gly	Mendez et al, 2009
518	G-A	миссенс	Arg173Gln	Delfau et al, 1990
517_533	del17	делеция	стоп-кодон через 40 триплетов	Puy et al, 1997

530	T-G	миссенс	Leu177Arg	Mgone et al, 1992
532	G-A	миссенс	Asp178Asn	Puy et al, 1997
532	G-C	миссенс	Asp178His	Mendez et al, 2009
541	C-T		Gln181Term	Whatley et al, 1999
552	delT	делеция	стоп-кодон через 5 триплетов	Gregor et al, 2002
569	C-T	миссенс	Thr190Ile	Schuurmans et al,2001
575	G-A	миссенс	Gly192Asp	данная работа
576-595	del19	делеция	стоп-кодон через 58 триплетов	Puy et al, 1997
580	C-T	нонсенс	Gln194Term	Martinez di Monviontemurbs et al,2001
583	C-T	миссенс	Arg195Cys	Kauppinen et al, 1995
593	G-A		Trp198Term	Lee et al. 1991
600-601	delC	делеция	стоп-кодон через 55 триплетов	данная работа
601	C-T	миссенс	Arg201Trp	Lundin et al, 1994
604	delG	делеция	стоп-кодон через 53 триплета	Schreiber et al,1994
604	G-T	миссенс	Val202Leu	Gross et al, 1999
609_610	insG	инсерция	стоп-кодон через 5 триплета	
610	C-T	нонсенс	Gln204Term	Mgone et al, 1994
610	C-A	миссенс	Gln204Lys	Ulbrichova et al, 2009b
612	G-T	миссенс	Gln204His	Delfau et al, 1991
IVS10(612+2)	TAGGG-CCCTA	сплайсинг	делеция 10 экзона	Petersen et al, 1998
IVS10(612+2)	T-C	сплайсинг	делеция 10 экзона	Puy et al, 1997
IVS10(613-1)	G-T	сплайсинг	делеция 11 экзона	Robreau-Fraolini et al,2000
IVS10(613-1)	G-A	сплайсинг	делеция 11 экзона	Gouya et al,2001
IVS10(613-1)	G-C	сплайсинг	делеция 11 экзона	данная работа
Exon 11				
623	delC	делеция	стоп-кодон через 47 триплетов	Lam et al, 2001
625	G-A	миссенс	Glu209Lys	Puy et al, 1997
629	delA	делеция	стоп-кодон через 45 триплетов	Lee et al, 1995
634	A-G	миссенс	Met212Val	Solis et al, 1999
635	T-G (+11int)	миссенс	Met212 Arg	данная работа
639	T-G	нонсенс	Tyr213Term	Puy et al, 1997
643	G-A	миссенс	Val215Met	Ulbrichova et al,2009
647	G-A	миссенс	Gly216Asp	Lundin et al,1997
646_647	insA	инсерция	стоп-кодон через 51 триплет	данная работа
650	A-G	миссенс	Gln217Arg	Schneider-Yin et al,2006
650	A-T	миссенс	Gln217Leu	Schneider-Yin et al,2000
651	G-T	миссенс	Gln217His	Puy et al, 1997
652	G-A	миссенс	Gly218Arg	Yang et al, 2008
IVS11(651+1)	G-C	сплайсинг	делеция 11 экзона	Petersen et al, 1998
IVS11(651+2)	T-C	сплайсинг	делеция 11 экзона	Whatley et al, 1999
IVS11(651+3)	C-G	сплайсинг	делеция 11 экзона	Kauppinen et al, 2002
IVS11(652-5 4)	AT-TC	сплайсинг	делеция 12 экзона	данная работа
IVS11(625-3)	C-G	сплайсинг	делеция 12 экзона	Llewellyn et al,1996
IVS11(652-2)	A-G	сплайсинг	делеция 12 экзона	Petersen et al, 1998

IVS11(652-2)	A-C	сплайсинг	делеция 12 экзона	Bor et al, 2003
IVS11(652-2)	delA	сплайсинг	делеция 12 экзона	Martinez di Monviontemurbs et al,2001
IVS11(652-1)	delG	сплайсинг	делеция 12 экзона	Puy et al, 1997
IVS11(652-1)	G-C	сплайсинг	делеция 12 экзона	Puy et al, 1997
Exon 12				
654_655	insG	инсерция	стоп-кодон через 51 триплета	Di Pierro et al,2004b
656	C-A	миссенс	Ala219Asp	Whatley et al,1999
662	G-A	миссенс	Gly221Asp	Yang et al, 2008
664	G-A	миссенс	Val222Met	Mustajoki et al,1998
665_666	insA	инсерция	стоп-кодон через 28 триплетов	De Siervi et al,1999
666_667	delGG	делеция	стоп-кодон через 28 триплетов	De Siervi et al, 1997
667	G-A	миссенс	Glu223Lys	Gu et al, 1994
669_698	del30bp	делеция		Gullen-Navarro et al, 2004
673	C-G	миссенс	Arg225Gly	Kauppinen et al, 1995
673	C-T	нонсенс	Arg225Term	Kauppinen et al, 1995
674	G-A	миссенс	Arg225Gln	Floderus et al, 2002
675	delA	делеция	стоп-кодон через 29 триплетов	Ulbrichova et al, 2009b
680-681	insA	инсерция	стоп-кодон через 28 триплетов	Whatley et al,1999
691_721	del30bp	делеция		Puy et al, 1997
706	G-A	миссенс	Gly236Ser	Gouya et al, 2004
713	T-G	миссенс	Leu238Arg	Llevellyn et al,1996
715-716	delCA	делеция	стоп-кодон через 9 триплетов	Puy et al, 1996
716	insC	инсерция	стоп-кодон через10 триплетов	Puy et al, 1997
721	C-T	миссенс	Pro241Ser	Schuurmans et al,2001
723_744	dupl21	инсерция		Puy et al, 1997
723	delC	делеция	стоп-кодон через13 триплетов	Whatley et al,1999
728	delC	делеция	стоп-кодон через 12 триплетов	De Siervi et al, 1997
728_729	delCT	делеция	стоп-кодон через 6 триплетов	De Siervi et al,1999
731	T-C	миссенс	Leu244Pro	Gouya et al, 2004
731_732	insT	инсерция	стоп-кодон через 6 триплетов	Schneider-Yin et al,2006
734	T-G	миссенс	Leu245Arg	Delfau et al, 1991
739	T-C	миссенс	Cys247Arg	Mgone et al, 1993
740	G-T	миссенс	Cys247Phe	Chen et al, 1994
741_742	ins13bp	инсерция	стоп-кодон через 7 триплетов	Gouya et al, 2004
742_743	insTTCGCTG C	инсерция	стоп-кодон через 10 триплетов	Gu et al, 1994
744_751	delCGCTGAA A	делеция	стоп-кодон через 40 триплетов	Bor et al, 1993
748	G-C	миссенс	Glu250Gln	Lundin et al, 1995
748	G-A	миссенс	Glu250Lys	Gu et al, 1994
748_749	insCATCGCT	инсерция	стоп-кодон через 7	Whatley et al,1999

	G		триплетов	
749	A-T	миссенс	Glu250Val	Puy et al, 1997
749	A-C	миссенс	Glu250Ala	Puy et al, 1997
749	delA	делеция	стоп-кодон через 12 триплетов	Gouya et al, 2004
749_765	ins16bp	инсерция	стоп-кодон через 4 триплета	Mendez et al, 2009
750	A-T	миссенс	Glu250Asp	Ulbrichova et al, 2009b
754	G-A	миссенс	Ala252Thr	Mgone et al, 1993
754	G-C	миссенс	Ala252Pro	Nissen ,et al 1997
755	C-T	миссенс	Ala252Val	Mgone et al, 1993
761	T-C	миссенс	Leu254Pro	Kauppinen et al, 2002
766	C-A	миссенс	His256Asn	Mgone et al, 1992
766	C-T	миссенс	His256Tyr	Puy et al, 1997
770	T-C	миссенс	Leu257Pro делеция11/12экзона	Pischik et al, 2005
771	G-A	сплайсинг	делеция 12 экзона	Grandchamp et al, 1989c
771	G-C	сплайсинг	делеция 12 экзона	Daimon et al, 1993
771_772	insT	инсерция	стоп-кодон через 33 триплета	Ong et al, 1996
902_909	delTCCCTGC C	делеция	стоп-кодон через 2 триплета	Yang et al, 2008
IVS12(771+1)	G-A	сплайсинг	делеция 12 экзона	Puy et al, 1996
IVS12(771+1)	G-C	сплайсинг	делеция 12 экзона	De Siervi et al, 1999
IVS12(771+1)	G-T	сплайсинг	делеция 12 экзона	Rosipal et al, 1997
IVS12(771+2)	T-C	сплайсинг	делеция 12 экзона	Martinez di Monviontemurbs et al, 2001
IVS12(771+3_11)	del9bp	сплайсинг		Mendez et al, 2009
IVS12(772-17)	A-G	сплайсинг	делеция 13 экзона	данная работа
IVS12(772-2)	A-G	сплайсинг	делеция 13 экзона	Mustajoki et al, 1998
IVS12(772-1)	G-A	сплайсинг	делеция 13 экзона	Puy et al, 1997
Exon 13				
779	G-A	миссенс	Gly260Asp	Floderus et al, 2002
781	G-A	миссенс	Cys261Tyr	Kauppinen et al, 2002
798_799	insAGCC	инсерция	стоп-кодон через 24 триплета	Whatley et al, 1999
799	G-A	миссенс	Val267Met	Rosipal et al, 1997
806	C-T	миссенс	Thr269Ile	Mgone et al, 1994
809	C-A	миссенс	Ala270Asp	Puy et al, 1997
809	C-G	миссенс	Ala270Gly	Robreau-Fraolini et al, 2000
815_818	delAGGA	делеция	стоп-кодон через 6 триплетов	De Siervi et al, 1999
820	G-A	миссенс	Gly274Arg	Mgone et al, 1994
823	C-T	нонсенс	Gln275Term	Puy et al, 1997
IVS13(825+1)	G-A	сплайсинг	делеция 13 экзона	Llewellyn et al, 1996
IVS13(825+1)	G-C	сплайсинг	делеция 13 экзона	Von Brashch et al, 2004
IVS13(825+2)	T-G (+6insG)	сплайсинг	делеция 13 экзона	данная работа
IVS13(825+2)	T-A	сплайсинг	делеция 13 экзона	Gross et al, 1999
IVS13(825+2)	T-C	сплайсинг	делеция 13 экзона	Von Brashch et al, 2004
IVS13(825+5)	G-C	сплайсинг	делеция 13 экзона	Pischik et al, 2005
IVS13(825+3_6)	delAAGT	сплайсинг	делеция 13 экзона	Pischik et al, 2005
IVS13(826-2)	A-G	сплайсинг	вставка 13 интрона	Mustajoki et al, 1998
IVS13(826-1)	G-A	сплайсинг	вставка 13 интрона	Martinez di

				Monviontemurbs et al,2001
Exon 14				
833	T-C	миссенс	Leu278Pro	Mustajoki et al, 19989
835_837	delACT insG	делеция	стоп-кодон через 10 триплетов	Solis et al, 1999
838	G-A	миссенс	Gly289Arg	Kauppinen et al, 1995
841_843	delGGA	делеция	delG281	De Siervi et al,2000
847_848	delTG	делеция	стоп-кодон через 7 триплетов	Lundin et al,1997
848	G-A	нонсенс	Trp283Term	Mgone et al, 1994
849	G-A	нонсенс	Trp283Term	Schreiber et al,1995
854_855	delTA	делеция	стоп-кодон через 4 триплета	Puy et al, 1997
863	C-A	нонсенс	Ser288Term	Puy et al, 1997
863	C-G	нонсенс	Ser288Term	Petersen et al, 1998
863_864	insT	инсерция	стоп-кодон через 29 триплетов	Floderus et al, 2002
866_869	delATAG	делеция	стоп-кодон через 26 триплетов	Whatley et al,1999
874	C-T	нонсенс	Gln292Term	Schneider-Yin et al,2000
874_875	insC	инсерция	стоп-кодон через 15 триплетов	Mendez et al, 2009
886_887	insA	инсерция	стоп-кодон через 10 триплетов	Gross et al, 1999
886	C-T	нонсенс	Gln296Term	Kauppinen et al, 1995
900	delT	делеция	стоп-кодон через 15 триплетов	Delfau et al, 1991
900_901	insT	инсерция	стоп-кодон через 6 триплетов	Schreiber et al, 1995b
911	delA	делеция	стоп-кодон через 13 триплетов	Bor et al, 2003
IVS14(912+1)	G-T	сплайсинг	делеция 14 экзона	Whatley et al,1999
IVS14(912+1)	G-A	сплайсинг	делеция 14 экзона	Gu et al, 1993b
IVS14(912+2)	T-C	сплайсинг	делеция 14 экзона	данная работа
IVS14(913-2)	A-G	сплайсинг	делеция 15 экзона	Floderus et al, 2002
Exon 15				
913_914	insC	инсерция	стоп-кодон через 1 триплет	Puy et al, 1996
940	C-T	нонсенс	Gln314Term	Di Pierro et al,2004
948	delA	делеция	стоп-кодон через 27 триплетов	De Siervi et al,1999
950_951	insG	инсерция	стоп-кодон через 5 триплетов	Flachsova et al,2003
962	G-A	миссенс	Arg321His	Schuurmans et al,2001
965_966	insA	инсерция	стоп-кодон через 36 триплетов	Ulbrichova et al, 2006
973	C-T	нонсенс	Arg325Term	Lam et al, 2001
973_974	insG	инсерция	стоп-кодон через 19 триплетов	Flachsova et al, 2007
980_986	delCCCAGTT	делеция	стоп-кодон через 14 триплетов	De Siervi et al, 1997
982	delC	делеция	стоп-кодон через 16 триплетов	Whatley et al,1999
982_983	delCA	делеция	стоп-кодон через 30	Maeda et al, 2000

			триплетов	
985_996	del12bp	делеция	delLeuAlaAlaGln	De Siervi et al,1999
986_987	insT	инсерция	стоп-кодон через 30 триплетов	Petersen et al, 1998
992_1123	del131bp	делеция	делеция 31 ак	Gregor et al, 2002
1000-1018	del 19bp	делеция	стоп-кодон через 9 триплетов	Kauppinen et al, 2005
1002	delG	делеция	стоп-кодон через 8 триплетов	Ong et al, 1998b
1003	G-A	миссенс	Gly335Ser	De Siervi et al,1999
1004	G-A	миссенс	Gly335Asp	Puy et al, 1997
1002	delG	делеция	стоп-кодон через 9 триплетов	Robreau-Fraolini et al,2000
1009_1021	del12bp	делеция	делеция 4 аминокислот	Sakabe et al,2008
1013	T-G	миссенс	Leu338Arg	данная работа
1013	T-C	миссенс	Leu338Pro	данная работа
1024_1091	del67bp	делеция	стоп-кодон через 30 триплетов	данная работа
1028	T-C		Leu343Pro	Floderus et al, 2002
1029_1033	delGAGCA	делеция	стоп-кодон через 13 триплетов	данная работа
1062_1063	insC	инсерция	стоп-кодон через 4 триплета	Daimon et al, 1994
1067	delA	делеция		Von Brashch et al,2004
1067_1068	insCGGCA	инсерция	стоп-кодон через 90 триплетов	Von Brashch et al,2004
1073	delA	делеция		Kauppinen et al, 1995

Список использованной литературы:

1. Артамонов В.В., Любченко Л.Н., Немцова М.В., Залетаев Д.В. Неблагоприятная экология и молекулярные системы перспективной диагностики высокого риска развития онкозаболеваний (на примере рака молочной железы) // Вестник. НИИ Мол. мед. Молекулярная медицина и биобезопасность. М.: Изд. дом "Русский врач".- 2004. Выпуск 4.-С. 37-54
2. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены "предрасположенности" (Введение в предиктивную медицину) // СПб, "Интермедика".- (2000), 272 с
3. Баранов В.С., Асеев М.В., Баранова Е.В. «Гены предрасположенности» и генетический паспорт.// Природа, (1999), №3 С.17-27
4. Буторов А.В., Борисов Б.А., Мариос Ц. Анестезия и интенсивная терапия у больных с острой перемежающейся порфирией// Вестн. Интенсивной терапии.(1995), №2.,С.49-52;
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика // М.: Практика. (1999), 459с.
6. Животовский Л.А. Популяционная биометрия// М.: Наука. (1991), 272с.
7. Идельсон Л.И. Нарушения порфиринового обмена в клинике внутренних болезней. М.,(1969)
8. Карпова И.В., Сурин В.Л., Тагиев А.Ф., Пивник А.В., Лабораторная диагностика острой перемежающейся порфирии// Пробл. Гематол. (1998), №1. С.43-48
9. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия: Пер. с нем. // М.: Мир.- (2000), 469 с.
10. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинко-фармакологические аспекты // М.: И. "Реафарм".- (2004), 144 с.
11. Кулинский В.И. Обезвреживание ксенобиотиков // Соросовский Образовательный журнал.- 1999.- №1- С. 8-12

12. Подымова С.Д. Механизмы алкогольного повреждения печени// Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. (1998), №5, С.21-25.
13. Пустовойт Я.С., Сурин В.Л., Карпова И.В., Лукьяненко А.В., Лучинина Ю.А., Пивник А.В., Острая перемежающаяся порфирия в России: аспекты диагностики//Мед.Генетика (2004), №1 С.18-35
14. Пустовойт Я.С. Клиника и ДНК-диагностика острой перемежающейся порфирии// Кандидатская диссертация (2002), 92с.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA // М.: МедиаСфера.- (2003). – 312 с.
16. Саприн А.Н., Калинина Е.В. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов // Успехи биол. и химии. (1999), Т. 39.- С. 289-326
17. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Brasure JR, Michalek AM, Laughlin R, Nemoto T, Gillenwater KA, Shields PG. Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms, and breast cancer risk // JAMA.- (1996), V.13.- №276(18).-P.1494-501.
18. Andersson C., Floderus Y., Wikberg A. et al. The W198X and R173W mutations in the porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria have higher clinical penetrance than R 167 W. A population-based study. Scand.J.Clin.Lab.Invest. (2000), V.60 P.643-648.
19. Arvanitis DA, Koumantakis GE, Goumenou AG, Matalliotakis IM, Koumantakis EE, Spandidos DA. CYP1A1, CYP19, and GSTM1 polymorphisms increase the risk of endometriosis // Fertil Steril. (2003), V.79.-P.702-9.
20. Badawi AF, Cavalieri EL, Rogan EG. Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16alpha-hydroxylation of 17beta-estradiol // Metabolism. (2001), V.50(9)-P.1001-3.

21. Badminton M.N., Elder G.H. Molecular mechanisms of dominant expression in porphyria *J.Inherit.Metab. Dis.* (2005). V.28.P.277-286.
22. Bauer M, Herbarth O, Aust G, Graebisch C. Molecular cloning and expression of novel alternatively spliced cytochrome P450 2E1 mRNAs in humans // *Mol Cell Biochem.* (2005), V.280(1-2)-P.201-7
23. Bissell DM.// Laboratory evaluation in porphyria. *Semin Liver Dis.* (1982) May 2(2), P. 100-7.
24. Bor M., Balogh K, Berkes E., Szekely E., Pusztai A., Tasnadi G., Hunyady L. Genetic screening of acute intermittent porphyria in Hungary: an update. *Porphyria & Porphyrias International Conference, Prague, Physiol Res* (2003) V.52: 3S.
25. Brady J.L., Jackson H.A., Roberts A.G. et al. Co-inheritance of mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase and haemochromatosis genes accelerates the onset of porphyria cutanea tarda // *J. Invest. Dermatol.* (2000), V.115. P.868-874.
26. Chen C.H., Astrin K.H., Lee G., Anderson K.E., Desnick R. J Acute intermittent porphyria: identification and expression of exonic mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene. An initiation codon missense in the housekeeping transcript causes “variant acute intermittent porphyria” with normal expression of the erythroid-specific enzyme.//, *J Clin Invest* (1994), V.94 P. 1927-1937
27. Chretien S., Dubart A., Beaupain D. et al. Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1988), V.85. P.6-9.
28. Christiansen L., Bygum A., Jensen A. et al. Association between CYP1A2 polymorphism and susceptibility to porphyria cutanea tarda // *Hum. Genet.* (2000), V.107. P.612-614.

29. Daimon M., Yamatani K., Igarashi M., et al. Acute intermittent porphyria caused by a G to C mutation in exon 12 of the porphobilinogen deaminase gene that results in exon skipping. // Hum. Genet. (1993), V. 92 P.549-553.
30. Daimon M., Yamatani K., Igarashi M. et al. Acute intermittent porphyria caused by a single base insertion of C in exon 15 of the porphobilinogen deaminase gene that results in a frame shift and premature stopping of translation. //Hum. Genet. (1994), V.93 P.533.
31. Daly AK. Molecular basis of polymorphic drug metabolism // J Mol Med.- (1995), V.73(11)-P.539-53
32. Delfau M. H., Picat C., de Rooij F. W., et al. Two different point G to A mutations in exon 10 of the porphobilinogen deaminase gene are responsible for acute intermittent porphyria. //J. Clin. Invest. (1990), V.86 P.1511-1516.
33. Delfau M.H., Picat C., de Rooij R, et al. Molecular heterogeneity of acute intermittent porphyria: Identification of four additional mutations resulting in the CRIM-negative subtype of the disease. //Am. J. Hum. Genet. (1991), V. 49 P.421-428.
34. De Rooij F., Voortman G., De Baar E., et al. Frequency and distribution of mutations in the gene of porphobilinogen deaminase in Dutch acute intermittent porphyria patients. //Scand. J. Clin. Lab. Invest. (1995), V. 55 P. 223.
35. De Siervi A., Glass I.A., Rossetti M.V., Xu W., Astrin K.H., Battle A., Desnick R.J Identification of nine new mutation in the HMB Synthase gene in Argentinean patients with acute intermittent porphyria.// Acta Haematol (1997), V.98 (Suppl.) P.105.
36. De Siervi A., Rossetti M.V., Parera V.E., Astrin K.H., Aizencang G.I., Glass I.A., Batlle A.M., Desnick R.J.. Identification and characterization of hydroxymethylbilane synthase mutation causing acute intermittent pophyria: evidence for an ancestral founder of common G 111R mutation // Am J Med Genet (1999), Oct 8; 86(4): 366-75.

37. De Siervi A., Mendez M., Parera V. E., et al. Acute intermittent porphyria: Characterization of two novel mutations in the porphobilinogen deaminase gene, one amino acid deletion (453-455delAGC) and one splicing acceptor site mutation (IVS8-1G>T). //Hum. Mutat. (1999b), V.14 P. 355.
38. De Siervi A. Weiss Cadiz D. E., Parera V. E., et al. Identification and characterization of two novel mutations that produce acute intermittent porphyria: A 3-base deletion (841-843delGGA) and a missense mutation (T35M). //Hum. Mutat. (2000), V. 16 P. 373.
39. De Siervi A., Parera V., Atencia G., et al. (2001) Personal communication.
40. Deybach J.-Ch., Badminton M., Puy H. et al. European Porphyria Initiative (EPI): a platform to develop a common approach to the management of porphyrias and to promote research in the field // Physiol. Res. (2006). V.55 (Suppl. 2). P. S67-S73
41. Di Pierro E., Roselli EA., Cappellini MD Gene symbol: HMBS. Disease: Porphyria, Acute intermittent. //Hum Genet (2004), V. 114 P. 607.
42. Di Pierro E., Moriondo V., Patti E., Cappellini MD Gene Symbol: HMBS. Disease: Acute intermittent Porphyria.// Hum Genet (2004b), V.115 P.353.
43. Di Pierro E, Besana V., Moriondo V., Brancaloni V., Tavazzi D., Casalgrandi G., Ventura P., Rocchi E., Cappellini MD. A large deletion on chromosome 11 in acute intermittent porphyria. //Blood Cells Mol Dis (2006) ;37(1):50-54
44. Di Pierro E., Besana V., Brancaloni V., Tavazzi D., Cappellini MD.: Identification of three novel substitutions in the erythroid promoter of the HMBS gene: a new erythroid variant of human acute intermittent porphyria//Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) (2008), 112:Abstract 4574.
45. Fischer H., Orth H.: Die Chemie de Pyrrols. New York, Johnson Reprint Leipzig. Akademische Verlag Gueleschaft (1934); 1-3.

46. Flachsova E., Verma IC., Zeman J., Raman CS., Martasek P Novel mutation in porphobilinogen deaminase gene in a family with acute intermittent porphyria from Nepal. //Porphyrins & Porphyrins International Conference, Prague , (2003) *Physiol Res* V.52 (8S).
47. Flachsova E., Verma IC., Ulbrichova D., Saxena R., Zeman J., Saudek V., Raman CS., Martasek P A new mutation within the porphobilinogen deaminase gene leading to a Truncated Protein as a Cause of acute intermittent porphyria in an extended Indian family. // *Folia Biologica* (2007) V53 P.194-201.
48. Floderus Y, Shoolingin – Jordan PH. Et al. Acute intermittent porphyria in Sweden. Molecular, functional and clinical consequences of some new mutations found in the porphobilinogen deaminase gene. // *Clin Genet* (2002) V.62(4): 288-97.
49. Fryer A.A., Bianco A., Hepple M., Jones P.W., Strange R.C., Spiteri M.A. Polymorphism at the glutathione S-transferase. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2000), V.161.- P.1437-1442.
50. Gardlo K., Selimovic D., Bolsen K. et al. Cytochrome P4501A1 polymorphisms in a Caucasian population with porphyria cutanea tarda // *Exp. Dermatol.* (2003), V.12. P.843-848.
51. Garte S., Gaspari L., Alexandrie A. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2001), V.10.- P.1239 – 1248.
52. Gill R., Kolstoe S. E., Mohammed F., Al d-Bass A., Mosely J. E., Sarwar M., Cooper J. B., Wood S. P., Shoolingin-Jordan P. M. //Structure of human porphobilinogen deaminase at 2.8 Å°: the molecular basis of acute intermittent porphyria *Biochem. J.* (2009) 420, 17–25.
53. Gouya L., Puy H., Lamoril J. et al. Inheritance in erythropoietic protoporphyria: a common wild-type ferrochelatase allelic variant with low

expression accounts for clinical manifestation // Blood. (1999), V.93. P.2105-2110.

54. Gouya L., Puy H., Robreau A.M., Lyoumi S., Lamoril J., Da Silva V., Grandchamp B., Devbaeh J.C. Modulation of penetrance by the wild-type allele in dominantly inherited erythropoietic protoporphyria and acute hepatic porphyrias. // Hum Genet. (2004), V.114(3) P.256-62.
55. Grandchamp B., H. de Verneuil, C. Beaumont, S. Chretien, O. Walter, Y. Nordmann. Tissue-specific expression of uroporphobilinogen decarboxylase. Two isozymes from a single gene. // Eur. J. Biochem. (1987), 162:105-110.,
56. Grandchamp B., Picat C., Mignotte V. et al. Tissue-specific splicing mutation in acute intermittent porphyria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1989), V.86. P.661-664.
57. Grandchamp B., Picat C., Kauppinen R., Mignotte V., Peltonen L., Mustajoki P., Romeo Ph., Goossens M., Nordmann Y. Molecular analysis of acute intermittent porphyria in a Finnish family with normal erythrocyte uroporphobilinogen decarboxylase. // Eur J Clin Invest. (1989b), V.19 P. 415-418.
58. Grandchamp B., Picat C., de Rooij F., et al. A point mutation G->A in exon 12 of the uroporphobilinogen decarboxylase gene results in exon skipping and is responsible for acute intermittent porphyria. // Nucleic Acids Res. (1989c), V.17 P.6637-6649.
59. Grandchamp B., Puy H., Lamoril J., Deybach J.C., Nordmann Y. Molecular pathogenesis of hepatic acute porphyrias. // J of Gastroent and hepat (1996), 11: 1046-1052.
60. Grandchamp B. Acute intermittent porphyria. // Semin Liver Dis; (1998), V.18, P17-24.
61. Gregor A., Schneider-Yin X., Szlendak U, Wettstein A., Lipniacka A., Rufenacht UB., Minder EI. Molecular study of the hydroxymethylbilane synthase gene (HMBS) among Polish patients with acute intermittent porphyria. // Hum Mutat (2002), V.19 P. 310-314.

62. Gross U., Jacob K., Frank M., Doss M.O. Haem precursors and porphobilinogen deaminase in erythrocytes and lymphocytes of patients with acute intermittent porphyria // *Cell.Mol.Biol.* (1997), Vol.43. P.29-35.
63. Gross U., Puy H., Doss M., et al. (1999) New mutations of the hydroxymethylbilane synthase gene in German patients with acute intermittent porphyria *Mol. Cell. Probes* V. 13 P. 443-447.
64. Gu X. R, de Rooij R, Voortman G., et al. High frequency of mutations in exon 10 of the porphobilinogen deaminase gene in patients with a CRIM-positive subtype of acute intermittent porphyria. // *Am. J. Hum. Genet.* (1992) V.51 P.660-665.
65. Gu X. K. Rooji F. De., Lee J. S. High prevalence of a point mutation in the porphobilinogen deaminase gene in Dutch patients with acute intermittent porphyria//*Hum. Genet.*(1993), V. 191 P.128-130.
66. Gu X. F., de Rooij F., de Baar E., et al. Two novel mutations of the porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria.// *Hum. Mol. Genet* (1993b) V.2 P. 1735-1736.
67. Gu X. F., de Rooij F., Voortman G., et al. Detection of eleven mutations causing acute intermittent porphyria using denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum. Genet.* (1994), V. 93 P. 47-52.
68. Gullen-Navarro E., Carbonell P., Glover G. et al. Novel HMBS founder mutation and significant intronic polymorphism in Spanish patients with acute intermittent porphyria // *Ann. Hum. Genet.* (2004), V. 68. P.509-14.
69. Hatagima A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility // *Cad. Saude Publica.* (2002), V. 18. – P. 357-377.
70. Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class glutathione S-transferase genes // *Jpn J Cancer Res.* (1992), V.83(8)-P.866-70.

71. Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, Devanaboyina US, Nangju NA, Feng Y. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*-(2000), V.9(1)-P.29-42
72. Hessels J., Voortman G., Van Der Wagen A., Van Der Elzen C., Scheffer H., Zuijderhoudt F.M.J. Homozygous acute intermittent porphyria in a 7-year-old boy with massive excretions of porphyrins and porphyrin precursors.// *J. Inherit. Metab. Dis.* (2004), V. 27 P. 19-27.
73. Hindmarsh J.T. The porphyrias: recent advances// *Clin. Chem.* (1986), V. 32. P. 1255-1263.
74. Jeans J.B., Savik K., Gross C.R., et al. Mortality in patients with acute intermittent porphyria requiring hospitalization: a United States cases series//*Amer.J.Med.Genet.* (1996), Vol.65, P.269-273.
75. Juronen E., Tasa G., Uuskula M., Pooga M., Mikelsaar A.V. Purification, characterization and tissue distribution of human class theta glutathione S-transferase T1-1 // *Biochem. Mol. Biol. Int.* (1996), V. 39. – P. 21-29.
76. Kappas A., Sassa S., Galbraith R. A., Nordmann Y. The porphyrias. In: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds) // *The Metabolic Basis of inherited Disease* 6 th ed. New York: McGraw-Hill, (1989), 1305-13065.
77. Kappas A., Sassa S., Galbraith R.A., Nordmann Y. The porphyrias The Metabolic Basis of Inherited Disease.// Eds Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. eds. 7th edn. New York. USA: McGraw-Hill. (1995), P.2103-2159.
78. Kauppinen R., Mustajoki S., Pihlaja H., et al. Acute intermittent porphyria in Finland: 19 mutations in the porphobilinogen deaminase gene.// *Hum. Mol. Genet.* (1995), V.4 P. 215-222.

79. Kauppinen R., Fraunberg M. Molecular and biochemical studies of acute intermittent porphyria in 196 patients and their families.// Clin. Chem. (2002), V.48(11). P.1891-1900
80. Kauppinen R., Yrjonen A., Pischik E. Novel 19bp deletion of exon 15 in the PBGD gene and normal erythrocyte porphobilinogen activity in a patient with acute intermittent porphyria. //Proceedings of Porphyrins and Porphyrins Conference, Cape Town (2005), V.29.
81. Lam C.W., Poon P. M., Tong S. F., et. al. (2001) Novel mutation and polymorphisms of the HMDS gene detected by denaturing HPLC. //Clin. Chem. V.47 P.343-346.
82. Lee J.S., Anvert M. Identification of the most common mutation within the porphobilinogen deaminase gene in Swedish patients with acute intermittent porphyria.// Proc Natl Acad Sci (1991) 88, 10912-10915.
83. Lee J. S., Lundm, G., Lannfelt L., et al. Genetic heterogeneity of the porphobilinogen deaminase gene in Swedish families with acute intermittent porphyria. Hum. Genet. (1991b), V.87 P.484-488.
84. Lee G. Y., Astrin K. H., Desnick R. J. Acute intermittent porphyria: A single-base deletion and a nonsense mutation in the human hydroxymethylbilane synthase gene, predicting truncations of the enzyme polypeptide.// Am. J. Med. Genet. (1995), V.58 P.155-158.
85. Llewellyn D. H., Whatley S., and Elder G. H. Acute intermittent porphyria caused by an arginine to histidine substitution (R26H) in the cofactor-binding cleft of porphobilinogen deaminase. //Hum. Mol. Genet. (1993), V.2 P. 1315-1316.
86. Llewellyn DH., Scobie GA., Urquhart AJ., Whatley SD., Roberts AG., Harrison PR., Elder GH. Acute intermittent porphyria caused by defective splicing of porphobilinogen deaminase RNA: a synonymous codon mutation at -22 bp from the 5' splice site causes skipping of exon 3. //J Med Genet (1996), V.33 P. 437-438.

87. Loftus L. S, Arnold W. N. Vincent van Gogh's illness: acute intermittent porphyria?// *BMJ* (1991), V.303, P.1589-91.
88. Louie, G. V., Brownlie, P. D., Lambert, R., Cooper, J. B., Blundell, T. L., Wood, S. P., Warren, M. J., Woodcock, S. C. and Jordan, P. M. Structure of porphobilinogen deaminase reveals a flexible multidomain polymerase with a single catalytic site. // *Nature* (1992), 359, 33–39
89. Louie, G. V., Brownlie, P. D., Lambert, R., Cooper, J. B., Blundell, T. L., Wood, S. P., Malashkevich, V. N., Hadener, A., Warren, M. J. and Jordan, P. M. The three-dimensional structure of *Escherichia coli* porphobilinogen deaminase at 1.76 Å resolution. *Protein Struct. //Funct. Genet.* (1996) 25, 48–78.
90. Lundin G., Wedell A., Thunell S., et al. Two new mutations in the porphobilinogen deaminase gene and a screening method using PCR amplification of specific alleles.// *Hum. Genet.* (1994), V.93 P. 59-62.
91. Lundin G., Hashemi J., Floderus Y., et al. Four mutations in the porphobilinogen deaminase gene in patients with acute intermittent porphyria. // *J. Med. Genet.* (1995), V.32 P. 979-981.
92. Lundin G., Lee J. S., Thunell S., et al. Genetic investigation of the porphobilinogen deaminase gene in Swedish acute intermittent porphyria families. // *Hum. Genet.* (1997), V.100 P. 63-66.
93. Maeda N., Horie Y., Adachi K., et al. Two deletion mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene in two unrelated Japanese patients with acute intermittent porphyria.// *J. Hum. Genet.* (2000), V.45 P.263-268.
94. Martinez di Montemuros F., Di Pierro E., Fargion S., et al. Molecular analysis of the hydroxymethylbilane synthase (HMBS) gene in Italian patients with acute intermittent porphyria: Report of four novel mutations. // *Hum. Mutat.* (2000), V.15 P. 480.

95. Martinez di Monviontemurbs F., Di Pierro E., Biolcati G. Acute intermittent porphyria: Heterogeneity of mutations in the hydroxymethylbilane synthase (HMBS) gene in Italy. //Blood Cells Mol Dis (2001), V.27 P. 961-970.
96. Mendez M., Moan-Jimenez MJ., Gomez-Abecia S., Garcia-Bravo M. et al., Identification and characterization of HNBS gene mutations in Spanish patients with acute intermittent porphyria.//Cell Mol Biol (2009), 1;55(2),P.55-63.
97. Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, Gilmore KS, Fraser GM, Ketterer B. Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man// Biochem J.M (1991), V.1;274(2)-P.409-14.
98. Mgone C. S., Lanyon W. G., Moore M. R., et al. Detection of seven point mutations in the porphobilinogen deaminase gene in patients with acute intermittent porphyria, by direct sequencing of in vitro amplified cDNA.//Hum. Genet. (1992), V. 90 P.12-16.
99. Mgone C.S., Lanyon W. G., Moore M.R., et. al. Detection of a high mutation frequency in exon 12 of the porphobilinogen deaminase gene patients with acute intermittent porphyria.// Hum. Genet. (1993), V.92 P.619-622.
100. Mgone C.S., Lanyon W. G., Moore M.R., et al. Identification of five novel mutations in the porphobilinogen deaminase gene.// Hum. Mol. Genet. (1994), V.3 P. 809-811.
101. Miyagi, K., R. Cardinal, I. Bossenmaier, and C. J.Watson. The serum porphobilinogen and hepatic porphobilinogen deaminase in normal and porphyric individuals.//J. Lab. Clin. Med. (1971), 78, P. 683-695.
102. Mustajoki P. Normal erythrocyte uroporphyrinogen I synthase in a kindred with acute intermittent porphyria. //Ann Intern Med (1981), 95, P. 162-166.
103. Mustajoki P., Kauppinen R., Lannfelt L. et al. Frequency of low erythrocyte porphobilinogen deaminase activity in Finland // J. Int. Med. (1992), V.231. P.389-395.

104. Mustajoki S., Kauppinen R., Mustajoki P. et al. Steady-state transcript levels of the porphobilinogen deaminase gene in patients with acute intermittent porphyria // *Genome Res.*, (1997), P.1054-1060.
105. Mustajoki S., Pihlaja H., Ahola H., et al. Three splicing defects, an insertion, and two missense mutations responsible for acute intermittent porphyria. *Hum. Genet.* (1998), V.102 P. 541-548.
106. Mustajoki S., Ahola H., Mustajoki P., et al. Insertion of Alu element responsible for acute intermittent porphyria. // *Hum. Mutat.* (1999) V.13 P. 431-438.
107. Namba, H., K. Narahara, K. Tsuji, Y. Yokoyama, and Y. Seino. 1991. Assignment of human porphobilinogen deaminase to 1 1q24.1 - q24.2 by in situ hybridization and gene dosage studies. *Cytogenet. Cell Genet.* 57:105-108.
108. Nebert D.W. Polymorphisms in drug metabolising enzymes :what is their clinical relevance and why do they exist?// *A.J.Hum.Genet.* (1997), V.60.- P.265-271.
109. Nebert D.W., Carvan M.J. 3rd. Ecogenetics: from ecology to health // *Toxicol. Ind. Health.* (1997b), V. 13. - P.163-192
110. Nielsen K.R. (1997) A case of acute intermittent porphyria. *Ugeskr Laeger* V.159 P.960-961.
111. Nissen H., Petersen NE., Mustajoki S., Hansen TS., Mustajoki P., Kauppinen R., Horder M Diagnostic strategy, genetic diagnosis and identification of new mutation in intermittent porphyria by denaturing gradient gel electrophoresis. // *Hum Mutat* (1997), V.9 P.122-130.
112. Nordmann Y., Puy H., Da Silva V. et al. Acute intermittent porphyria: prevalence of mutations in the porphobilinogen deaminase gene in blood donors in France // *J. Int. Med.* (1997), V.242. P.213-217.

113. Ong P. M., Lanyon W. G., Hift R. J., et al. Detection of three mutations in four patients with acute intermittent porphyria. //Scand. J. Clin. Lab. Invest. (1995)V.55 P. 223.
114. Ong P. M., Lanyon W. G., Hift R. J., et al. Detection of four mutation in six unrelated South African patients with acute intermittent porphyria.// Mol Cell Probes (1996) V.10 P.57-61.
115. Ong P.M., Lanyon W.G., Moore M.R. et al. Acute intermittent porphyria: alternative splicing of hydroxymethylbilane synthase mRNA exludes exons 3 and 12// Mol.Cell.Probes. 1998. V.12. P.63-70.
116. Ong PM., Lanyon WG., Hift RJ., Halkett J., Moore MR., Connor JM Identification of two novel mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene in three patients from two unrelated families with acute intermittent porphyria. //Hum Hered (1998b), V.48 P.24-29.
117. Petersen N. E., Nissen H., Horder M., et al. Mutation screening by denaturing gradient gel elec-trophoresis in North American patients with acute intermittent porphyria. Clin. Chem. (1998), V.44 P.1766-1768.
118. Petrides P. E., Brach L. V., Zang C., et al. Non-erythroid form of AIP in a 46 year old female: Response to therapy with heme arginate and identification of a novel mutation. Millenium Meeting on Porphyrins and Porphyrins (2000), P. 43.
119. Pischik E., Mehtala S., Kauppinen R. Nine mutations including three novel mutations among Russian patients with acute intermittent porphyria // Hum. Mutat. (2005), V.26(5). P. 496.
120. Poulos Yu S., Stewart V. P.,. A novel mutation in a family with non-erythroid variant form of acute intermittent porphyria //J. Hum. Genet. (2000), V.45 P. 367-369.
121. Puy H., Deybach J.C., Lamoril J. et al. Detection of four novel mutations in the porphobilino-gendeaminase gene in French Caucasian patients with acute intermittent porphyria. //Hum. Hered. (1996), V.46 P. 177-180.

122. Puy H., Deybach J. C., Lamoril J., et al. Molecular epidemiology and diagnosis of PBG deaminase gene defects in acute intermittent porphyria. //Am. J. Hum. Genet. (1997), V.60 P.1373-1383.
123. Puy H., Gross U., Deybach J. C. et al. Exon I donor splice site mutation in the porphobilinogen deaminase gene in the non-erythroid variant form of acute intermittent porphyria //J. Hum. Genet. (1998), V.103 P. 570-575.
124. Raich N., Romeo PH., Dubart A. et al. Molecular cloning and complete primary sequence of human erythrocyte porphobilinogen deaminase // Nucleic Acids Res. (1986), V.14. P.5955-5968.
125. Ramdall R., Cunha L., Astrin K.H., et al. Acute intermittent porphyria: Novel missense mutations in the human hydroxymethylbilane synthase gene. //Genet. Med. (2000), V.2 P.290-295.
126. Röhl, John C.G., Warren Martin, & David Hunt, Purple Secret, Bantam Press, London, (1998).
127. Robreau-Fraolini A. M., Puy H., Aquaron C., et al. Porphobilinogen deaminase gene in African and Afro-Caribbean ethnic groups: Mutations causing acute intermittent porphyria and specific intragenic polymorphisms. //Hum. Genet (2000), V.107 P.150-159.
128. Rosipal R., Puy H., Lamoril J., Martasek P., Nordmann Y., Deybach JC. Molecular analysis of porphobilinogen (PBG) deaminase gene mutation in acute intermittent porphyria: first study in patients of Slavic origin. //Scand J Clin Lab Invest (1997), V.57 P. 217-224.
129. Sakabe J., Susa S., Daimon M., Lan MY., Kato T. A novel 12-base pair deletion mutation in exon 15 of the porphobilinogen deaminase gene in a Taiwanese patient with acute intermittent porphyria.// Blood Cells Mol Dis. (2008), 41(2), P.202.
130. Schneider-Yin X., Bogard C., Rufenacht, U. B., et. al. Identification of a prevalent nonsense mutation (W283X) and two novel mutations in the

porphobilinogen deaminase gene of Swiss patients with acute intermittent porphyria. // Hum. Hered. (2000), V.50 P.247-250.

131. Schneider-Yin X., Hergersberg M., Goldgar D.E., Rufenacht U.B., Shuurmans M. M., Puy H., Deybach J-C., Minder E.I., Ancestral founder of mutation W283X in the porphobilinogen deaminase gene among acute intermittent porphyria patients.// Hum. Hered., (2002), 54:P.69-81.
132. Schneider-Yin X., Hergersberg M., Schuurmans M. M. et al. Mutation hotspots in the human porphobilinogen deaminase gene: recurrent mutations G111R and R173Q occurring at CpG motifs //J. Inherit.Metab. Dis. (2004), V.27. P.625-631.
133. Schneider-Yin X., Szlendak U, Lipniacka A., Minder EI., Gregor A.:Nine novel mutation in the hydroxymethylbilane synthase gene of Polish patients with acute intermittent porphyria. //Clin Genet (2006), V.69 P. 283-284.
134. Schreiber W. E., Fong F., Jamani, A. Frameshift mutation in exons 9 and 10 of the porphobilinogen deaminase gene produce a crossreact-ing immunological material (CRIM)-negative form of acute intermittent porphyria. // Hum. Genet. (1994), V.93 P. 552-556.
135. Schreiber W. E., Fong F., Nassar B. A., et al. Heteroduplex analysis detects frameshift and point mutations in patients with acute intermittent porphyria. // Hum. Genet. (1995), V.96 P.161-166.
136. Schreiber W. E., Jamani A., Armstrong J. G. Acute intermittent porphyria in a native North American family. Biochemical and molecular analysis.// Am. J. Clin. Pathol. (1995b), V.103 P.730-734.
137. Schuurmans MM., Schneider-Yin X., Rufenacht UB., Schnyder C., Minder CE., Puy H., Deybach JC., Minder EI Influence of age and gender on the clinical expression of acute intermittent porphyria based on molecular study of porphobilinogen deaminase gene among Swiss patients. //Mol Med (2001), V.7 P.535-542.

138. Scobie G. A., Llewellyn D. H., Urquhart A. J., et al. Acute intermittent porphyria caused by a C→T mutation that produces a stop codon in the porphobilinogen deaminase gene. // Hum. Genet. (1990), V.85 P.631-634.
139. Solis C., Lopez-Echaniz I., Sefarty-Graneda D. Identification and expression of mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene causing acute intermittent porphyria//Mol. Med. (1999), V.5.P.664-671.
140. Solis C., Lopez-Echaniz I., Sefarty-Graneda D., Astrin KH., Desnick RJ Gene symbol: HMBS. Disease:, Acute intermittent porphyria. //Hum Genet (2004), V. 114 P.402.
141. Song G., Li Y., Cheng C., Zhao Y., Gao A., Zhang R., Joachimiak A., Shaw N., Liu Z-J. // Structural insight into acute intermittent porphyria // The FASEB J. (2009), V.23., P.396-404.
142. Tagiev A.F., Surin V. L., Gol'tsov A.A., et. al. The spectrum beta-thalassemia mutations in Azerbaijan republic// Hum. Mutat. (1993), V.2. P. 152-154.
143. Thunell S., Floderus A., Henrichson A., Harper P. Porphyrin in Sweden//Physiol. Res. (2006), 55, P.109-118.
144. Ulbrichova D., Flachova E., Hrdinka M., Saligova J., Bazar J., Raman C.S., Martasek P. De novo mutation found in the porphobilinogen deaminase gene in Slovak acute intermittent porphyria patient: molecular biochemical study.//Physiol. Res/ (2006),V.55 P.145-154.
145. Ulbrichova D., Schneider-Yin X., Mamet R., Saudek V., Martasek P., Schoenfeld N. Correlation between biochemical findings, structural and enzymatic abnormalities in mutated HMBS identified in six Israeli families with acute intermittent porphyria.//Blood Cells,Molecules,and Diseases (2009) 42.P.167-173.
146. Ulbrichova D., Hrdinka M.,Saudek V., MartasekP . Acute intermittent porphyria-impact of mutations found in the hydroxymethylbilane synthase gene on biochemical and enzymatic protein properties.// FEBS J.(2009b), 276(7), P.2106-15.

147. Ulbrichova D., Mamet R., Munter G., Martasek P., Schoenfeld N. Novel human pathological mutations. Gene symbol: HMBS. Disease: acute intermittent porphyria. //Hum Genet.(2010) V.127(1).P.114.
148. Von und zu FlaundbergM., Pischik E., Udd L., Kauppinen R. Clinical and biochemical characteristics and genotype-phenotype correlation in 143 Finnish and Russian patients with acute intermittent porphyria. //Medicine (2005), V.84 P.35-47
149. Von Brashch L., Zang C., Haverkamp T., Schlechte H., Heckers H., Petriders PE. Molecular analysis of acute intermittent porphyria: mutations screening in 20 patients in Germany reveals 11 novel mutations. //Blood Cells Mol Dis. (2004), V.32 P. 309-314.
150. Waldenstorm J.: Studien ber Porphyrrie .Dissertation. Acta Medica Scandinavica, Stockholm, (1937), supplement 82: 1-254
151. Watson C.J., Schwartz S.// Proceeding of the Sociery for Experimental Biology and Medicine (1941), 47, 393.
152. Whatley S.D., Roberts A.G., Elder G.H., De novo mutations and sporadic presentation of acute intermittent porphyria. //Lancet. (1995), V346 P.1007-1008
153. Whatley D., Woolf J. R., Elder G. H. Comparison of complementary and genomic DNA sequencing for the detection of mutations in the HMBS gene in British patients with acute intermittent porphyria: Identification of 25 novel mutations. //Hum. Genet. (1999), V.104 P. 505-510.
154. Whatley, S.D., Roberts, A.G. Llewellyn, D.H.0 et al. (2000) Non-erythroid form of acute intermittent por-phyria caused by promoter and frameshift mutations distant from the coding sequence of exon 1 of the HMBS gene. Hum. Genet. 107, 243-248
155. Whatley S.D., Ducamp S., Gouya L., Grandchamp B., Beaumont C., Badminton M.N., Elder G., at al. C-terminal deletions in the ALAS2 gene

lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload *Am J Hum Genet.* (2008), 83(3) P.408-14.

156. Yang CC., Kuo HC., You HL., Wang J., Huang CC, Liu CY., Lan MY., Stephenson DA., Lee MJ. HMBS mutations in Chinese patients with acute intermittent porphyria. // *Ann Hum Genet.* (2008) 72(Pt5), P.683-6.
157. Zusterzeel PL, Peters WH, Visser W, Hermesen KJ, Roelofs HM, Steegers EA. A polymorphism in the gene for microsomal epoxide hydrolase is associated with pre-eclampsia // *J Med Genet.* (2001), V.38 (4)-P.234-7.