

**Резюме.** Представлены результаты изучения rs1899663-полиморфизма гена *HOTAIR* у 101 пациента (42 женщины и 59 мужчин) со светлоклеточным почечно-клеточным раком (СКПКР) и 100 относительно здоровых лиц контрольной группы (34 женщины и 66 мужчин). Выяснено, что разница распределения генотипов GG, GT и TT между группой пациентов с СКПКР и контролем не была достоверной как в общей группе ( $P = 0,207$ ), так и отдельно среди лиц женского ( $P = 0,067$ ) и мужского ( $P = 0,248$ ) пола. Методом логистической регрессии было установлено, что у женщин, которые являются гетерозиготами GT, риск возникновения рака почки в 2,7 раза (95% CI = 1,058-6,868;  $P = 0,038$ ) выше, чем у женщин с GG- и TT-генотипом.

**Ключевые слова:** длинная некодирующая РНК, *HOTAIR*, генетический полиморфизм, рак почки.

### GENDER DIFFERENCES IN THE ASSOCIATION BETWEEN rs1899663 LONG NON-CODING RNA *HOTAIR* GENE POLYMORPHISM AND KIDNEY CANCER DEVELOPMENT

Volkogon A. D., Obukhova O. A., Harbuzova V. Yu., Ataman A. V.

**Abstract.** HOX antisense intergenic RNA (*HOTAIR*), the well-studied long noncoding RNA (lncRNA), realizes the regulation of cell cycle genes expression at the epigenetic and transcriptional levels. The results of experiments showed that *HOTAIR* promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) during the renal-cell carcinoma (RCC) development. Moreover, *HOTAIR* knockdown inhibits proliferation and invasion of RCC cells. At the same time the role of *HOTAIR* gene polymorphisms in kidney cancer development is unknown.

*The aim of the study* was to perform a case-control study on representatives of both genders in order to assess the possible link between *HOTAIR* rs1899663 gene polymorphism and kidney cancer development in Ukrainian population.

*Object and methods.* 141 unrelated Ukrainian patients (42 female, 59 male) with clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) and 100 healthy subjects (34 female, 56 male) were enrolled to case-control study. *HOTAIR* rs1899663 polymorphism genotyping was performed using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP). The mathematical processing of obtained results was done using Statistical Package for Social Science software (SPSS, version 17.0, Chicago, IL, USA). All statistical tests were two-sided,  $P < 0.05$  was considered significant.

*Results.* It was shown that ratio of *HOTAIR* rs1899663 GG-, GT- and TT-genotypes between CCRCC patients and control subjects did not differ ( $P = 0.207$ ). Comparison of rs1899663 genotype frequencies in groups of different sex demonstrated no significant difference between CCRCC patients and control group in women ( $P = 0.067$ ) and men ( $P = 0.248$ ). The results of logistic regression analysis showed the association between *HOTAIR* rs1899663 polymorphic locus and CCRCC occurrence in female subjects under superdominant model of inheritance. Women with GT-genotype had 2.7 times increased risk of kidney cancer development compared to women with GG- and TT-genotypes (95% CI = 1.058-6.868;  $P = 0.038$ ). The link between *HOTAIR* rs1899663 gene polymorphism and CCRCC development in male subjects was not found in any inheritance model ( $P > 0.05$ ).

*Conclusion.* Obtained results revealed that long non-coding RNA *HOTAIR* rs1899663 polymorphic site was associated with kidney cancer development only in female Ukrainian patients. The risk of CCRCC occurrence in women with GT-genotype was higher than in women with GG- and TT-genotypes.

**Key words:** long non-coding RNA, *HOTAIR*, gene polymorphism, kidney cancer.

Рецензент – проф. Старченко І. І.  
Стаття надійшла 27.03.2019 року

DOI 10.29254/2077-4214-2019-1-2-149-224-229

УДК 575.224.2:616.36.361-07

<sup>1</sup>Гайбонюк І. Є., <sup>1</sup>Макух Г. В., <sup>1</sup>Туркус М. Я., <sup>1</sup>Третяк Б. І., <sup>2</sup>Яджин Л. М.

### МУТАЦІЇ Н1069Q ГЕНА АТР7В ТА С282У ТА Н63D ГЕНА НFE В ОСІБ З ГЕПАТОБІЛІАРНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ НЕЗ'ЯСОВАНОГО ГЕНЕЗУ

<sup>1</sup>ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» (м. Львів)

<sup>2</sup>Львівська обласна клінічна лікарня (м. Львів)

makukh.h@ihp.lviv.ua

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** У статті подаються результати досліджень, отримані в ході виконання науково-дослідної роботи, яка запланована на базі ДУ «ІСП НАМН України». Тема НДР: «Дослідження генетичних чинників обтяженого клінічного перебігу моногенних і мультифакторних захворювань», № державної реєстрації 0117U000685.

**Вступ.** Гепатобіліарна система – надзвичайно важлива складова травної системи, яка включає в себе печінку, підшлункову залозу, жовчні протоки та жовчний міхур, що дозволяє здійснювати такі важливі процеси, як травлення та виведення з організму продуктів метаболізму [1]. Результатом її ураження

стає порушення обмінних процесів, процесів детоксикації, а також імунної відповіді і антимікробного захисту. Причини гепатобіліарних порушень можуть бути різні, серед них спосіб життя, місце праці та проживання, віруси, стреси та інші середовищні чинники, а також спадково зумовлені порушення обміну речовин, зокрема заліза при спадковому гемохроматозі та міді при хворобі Вільсона-Коновалова [2,3,4].

Спадковий гемохроматоз (СГХ) зумовлений мутациями в гені *HFE*, успадковується за аутосомно-рецесивним типом та має частоту поширення 1:500. Найпоширенішими мутациями гена *HFE* є С282У та Н63D. Мутантний білок спричиняє накопичення іонів  $Fe^{2+}$  в печінці, що провокує розвиток цирозу, гепатиту та

має летальні наслідки при відсутності лікування [5]. Симптоми захворювання проявляються переважно у чоловіків (співвідношення чоловіків і жінок 20:1) [6].

Хвороба Вільсона-Коновалова (або хвороба Вільсона, Wilson disease) має аутосомно-рецесивний тип успадкування і зумовлена мутаціями в гені *ATP7B*, які спричиняють порушення екскреції іонів  $Cu^{2+}$  з клітини та викликають порушення з боку різних систем органів, в основному гепатобіліарної. Частота хвороби Вільсона-Коновалова 1:10 000, що в 20 раз рідше ніж СГХ [7]. Хворобою Вільсона однаково часто хворіють чоловіки і жінки. Найпоширенішою мутацією гена *ATP7B* в Європейській популяції є с.3207 (*H1069Q*) [8], яка спричиняє порушення транскрипції АТФ-зв'язуючого домену білка *ATP7B* і втрату його основної функції – екскреції іонів міді з клітин. На відміну від гена *HFE* для гена *ATP7B* характерне велике число (понад 500) інших мутацій, які спричиняють хворобу Вільсона.

На сьогодні розроблені ефективні терапевтичні протоколи для виведення токсичних надлишкових металів з організму [9], проте значною проблемою є вчасна діагностика цих захворювань. Причому, для СГХ дуже ефективною є періодична флеботомія. Дуже важливо правильно та своєчасно встановити вірний діагноз таким пацієнтам, оскільки без специфічного лікування виникають важкі порушення серед яких найбільш частими є цироз печінки, гостра печінкова недостатність, гепатоцелюлярна карцинома. Вчасно встановивши діагноз та застосувавши правильне специфічне лікування можна запобігти таким важким наслідкам і уникнути необхідності трансплантації печінки.

**Метою роботи** є визначення поширеності мутацій *H1069Q* гена *ATP7B*, *C282Y* та *H63D* гена *HFE* та встановлення внеску спадкового гемохроматозу та хвороби Вільсона-Коновалова в етіології гепатобіліарних порушень нез'ясованого генезу.

**Об'єкт і методи досліджень.** Об'єктом дослідження є алельні варіанти генів. Матеріалом для дослідження слугувала ДНК 120 осіб, які обстежувались в лабораторії генетичних досліджень ДУ «ІСП НАМН України» у період з 2011 до 2018 рр. Вік пацієнтів коливався від 20 до 60 років і середньому становив  $41,2 \pm 3,2$  роки. Пацієнти зверталися до лікаря з приводу гепатобіліарних порушень. Критерієм виключення була наявність анатомічних порушень, вірусних гепатитів, онкологічних захворювань, верифікованого аутоімунного процесу. Таким чином, групу дослідження склали випадки гепатобіліарних порушень нез'ясованого генезу в осіб молодого та середнього віку. Серед обстежуваних було 47 осіб жіночої статі та 73 чоловічої, усі були мешканцями Західного регіону України.

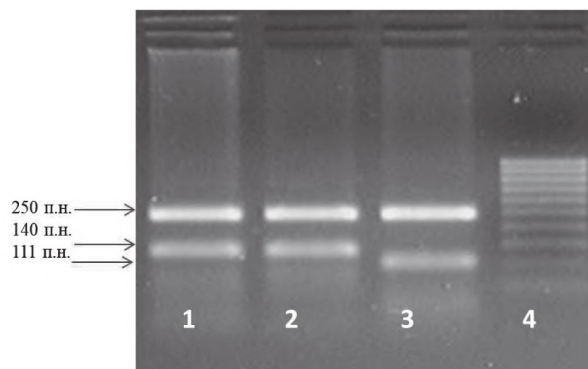
Виділення та очищення геномної ДНК з лейкоцитів периферійної крові було виконано методом високолювання [10]. Проводили двох направлену ампліфікацію методом ПЛР (PCR BI-PASA) із використанням двох пар олігонуклеотидних праймерів як описано [11]. Використовували суміш dDNTP, термостійку DreamTaq Green ДНК полімерази та ендонуклеази рестрикцій (ThermoFisher scientific, USA). Аналіз ампліфікованих продуктів та фрагментів рестрикції проводили у 3% агарозному гелі, який містив бромистий етидій. Отримані сигнали порівнювали з маркерами

довжин, і на основі цього детектували розміри отриманих фрагментів. Результати сканування агарозних гелів знімали цифровою камерою «Gel Imager» (HELICON, Росія) та опрацьовували за допомогою програми Gel Explorer 2.0.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Оскільки, одними із чинників гепатобіліарних порушень є спадково зумовлені порушення обміну речовин, зокрема заліза при спадковому гемохроматозі та міді при хворобі Вільсона-Коновалова, проведено дослідження мажорних мутацій відповідних генів.

Проведено молекулярно-генетичний аналіз мутацій *C282Y* (р.Cys282Tyr, с.845G>A) та *H63D* (р.His63Asp, с.187C>G, SNP: rs1799945) гена *HFE* проведено у 120 осіб з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу. Мутацію *C282Y* гена *HFE* досліджували методом ампліфікації *in vitro* послідовності ДНК гена з подальшим рестрикційним аналізом ПЛР продукту ендонуклеази рестрикції *Rsa I*. Електрофореграму рестрикційного аналізу мутації *C282Y* гена *HFE* наведено на **рисунку 1**.

Мутацію *H63D* гена *HFE* досліджували методом ампліфікації *in vitro* послідовності ДНК гена з подаль-



**Рис. 1.** Електрофореграма рестрикційних *Rsa I* фрагментів продукту ампліфікації послідовності гена *HFE* (2% агарозний гел): 1, 2 – відсутність мутації *C282Y*; 3 – наявність мутації *C282Y* в гомозиготному стані; 4 – маркер молекулярної ваги (50 bp Ladder).

шим рестрикційним аналізом ПЛР продукту ендонуклеази рестрикції *Bcl I*. Електрофореграму рестрикційного аналізу мутації *H63D* гена *HFE* наведено на **рисунку 2**.

Частоти та спектр встановлених генотипів щодо мутацій *C282Y* і *H63D* гена *HFE* у дослідній групі пацієнтів наведено в **таблиці 1**.

Мутацію *C282Y* гена *HFE*, яка є найчастішою причиною СГХ, і виявлено у 16 осіб в гетерозиготному стані, причому в одному випадку в поєднанні із мутацією *H63D* (**табл. 1**). В одному випадку мутацію *C282Y* виявлено в гомозиготному стані. У цьому випадку у чоловіка підтверджено діагноз спадкового гемохроматозу на основі проведених додаткових досліджень рівня насичення трансферину 75% (при нормі 20-55%) і феритину 845,7 нг/мл (при нормі 22 – 322 нг/мл). Таким чином, серед пацієнтів з гепатобіліарною патологією частота мутації *C282Y* (с.845G/A) становить 13,44%. Цей показник є значно вищий, ніж її популяційна частота, що вказує на внесок мутації *C282Y* як фактора ризику гепатобіліарних порушень. Ще одне пояснення високої частоти може бути наступним: у частини пацієнтів гетерозигот *C282Y / N* в

другому алелі є наявна інша відмінна від досліджуваного мутація гена *HFE*. В такому випадку патологічні гепатобіліарні зміни є зумовлені порушенням роботи транспортера заліза. Для підтвердження цього припущення усіх пацієнтам – гетерозиготам за мажорною мутацією слід проводити періодичний моніторинг насичення трансферину для вчасного виявлення накопичення заліза та призначення профілактичної флеботомії.

Таблиця 1.

**Частоти та спектр встановлених генотипів щодо мутацій C282Y і H63D гена *HFE* серед пацієнтів з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу**

| Генотип гена <i>HFE</i> | Поширеність |       |
|-------------------------|-------------|-------|
|                         | n           | %     |
| C282Y / C282Y           | 1           | 0,83  |
| C282Y / N               | 15          | 12,61 |
| C282Y / H63D            | 1           | 0,84  |
| H63D / H63D             | 3           | 2,52  |
| H63D/N                  | 30          | 25,21 |
| N/N                     | 70          | 57,99 |
| Усього                  | 120         | 100   |

Примітка. N – відсутність мутацій C282Y та H63D.

Мутацію H63D гена *HFE* виявлено у 34 осіб і частота цієї мутації у дослідженій вибірці становить 28,57%. Мутація H63D гена *HFE* є широко розповсюдженою в слов'янських популяціях, і кожен четвертий є гетерозиготним носієм цієї мутації, що дозволяє окремим авторам трактувати її як нейтральний поліморфізм [12,13]. Тому, виявлення такої частоти мутації свідчить про її широку розповсюдженість та відсутність її внеску в етіології гепатобіліарних порушень. Щодо гомозигот H63D/H63D та компаунд гетерозигот C282Y/H63D (табл. 1), то у невеликого числа пацієнтів такий генотип може вести до розвитку клінічних проявів СГХ, оскільки мутація H63D викликає незначне зниження інгібуючого впливу на трансферинний рецептор, тому гомозиготи за H63D та компаунд-гетерозиготи C282Y/H63D мають низький рівень фенотипової експресії. При таких генотипах теж рекомендовано проводити періодичний моніторинг насичення трансферину для вчасного виявлення накопичення заліза та призначення профілактичної флеботомії. Наявність мутації C282Y має більш серйозні клінічні наслідки ніж H63D. Незважаючи на опубліковані дані про високу частоту спадкового гемохроматозу [14,15], проведено опитування серед фахівців терапевтичного профілю м. Львова та генетиків Обласних медико-генетичних консультацій Західної України виявило, що діагноз спадковий гемохроматоз практично не виставляється, а саме накопичення заліза в органах, зазвичай, діагностують після автоспій. Це можна пояснити гетерогенністю клінічних ознак захворювання (болі в животі, астенія, анемія, гепатопатії, панкреопатії, ураження щитоподібної залози та/чи наднирників, артралгія, імпотенція та інші [16]) і, як наслідок, утрудненою верифікацією діагнозу СГХ.

Ще одним моногенним захворюванням, яке порушує обмінні процеси в гепатобіліарній системі та спричиняє її важкі ураження є Хвороба Вільсона. Її викликають мутації в гені *ATP7B*, які

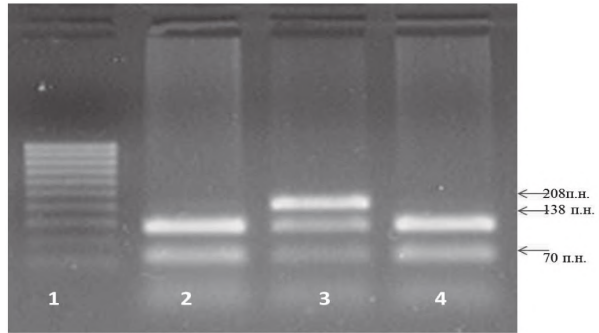


Рис. 2. Електрофореграма рестрикційних *Vcl I* фрагментів продукту ампліфікації послідовності гена *HFE* (2% агарозний гель): 1 – маркер молекулярної ваги 50 bp Ladder. 3 – наявність мутації H63D у гетерозиготному стані, 2, 4 – відсутність мутації H63D.

спричиняють порушення екскреції іонів  $Cu^{2+}$ . Найпоширенішою мутацією у європейській популяції є H1069Q (с.3207 C>A). Молекулярно-генетичний аналіз мажорної мутації H1069Q проведено у 100 осіб з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу. Проводили двонаправлену ампліфікацію ділянки екзона 14 гена *ATP7B* з праймерами комплементарними для нормального та мутантного алелю. Електрофореграму аналізу ПЛР фрагментів наведено на **рисунок 3**.

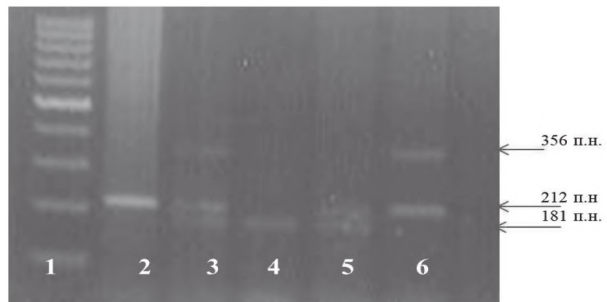


Рис. 3. Електрофореграма детекції мутації H1069Q (с.3207 C>A) гена *ATP7B*. 1-Маркер молекулярної ваги 100 bp, 2, 6 – відсутність мутації H1069Q (генотип с.3207 CC), генотип 3, 5 – наявність мутації H1069Q в гетерозиготному стані (генотип с.3207 CA), 4 – наявність мутації H1069Q в гомозиготному стані (генотип с.3207 AA).

У результаті проведеного генетичного тестування мажорну у європейській популяції мутацію H1069Q гена *ATP7B* виявлено у чотирьох осіб, що становить 4%. Причому дана мутація виявлена у трьох осіб в гетерозиготному стані та в одній особи в гомозиготному стані. Частоти виявлених генотипів гена *ATP7B* наведено в **таблиці 2**.

Мутацію H1069Q (с.3207 C>A) гена *ATP7B* виявили у чотирьох осіб чоловічої статі, вік яких знаходився в межах 25-35 років. Виявлення мутації H1069Q в гомозиготному стані є підтвердженням діагнозу хвороби Вільсона. Таким чином, у пацієнтки з генотипом H1069Q/H1069Q встановлено етіологічну причину гепатобіліарних змін. Один із пацієнтів з генотипом H1069Q/N страждає гепатитом, портальною гіпертензією, має когнітивні порушення, агресивний. Також він є гетерозиготним носієм поліморфного варіанту H63D гена *HFE*. У цьому випадку є наявна характерна клінічна картина хвороби Вільсона. Двом іншим гетерозиготним носіям мутації H1069Q, які мали змінені біохімічні показники, зокрема рівень

АЛТ і АСТ сироватки крові, що вказує на ураження печінки, проведено секвенування гена *ATP7B*. В обох випадках виявили інші рідкісніші мутації гена *ATP7B* у компаунд гетерозиготному стані, що дозволяє підтвердити діагноз хвороба Вільсона. Діагноз хвороби Вільсона може бути підтверджений і без виявлення двох мутацій, якщо відповідно до міжнародної бальної системи біохімічних та генетичних тестів (8th International Meeting on Wilson's disease, Leipzig, 2001) пацієнт набере принаймні 4 бали [17]. Тому для коректної діагностики та застосування правильного лікування рекомендується особам з ураженнями гепатобілярної системи нез'ясованого генезу виміряти рівень міді в добовій сечі, рівень церулоплазміну в сироватці крові та пройти огляд окуліста на присутність кільця Кайзера на десцеметовій мембрані рогівки. Також діагностичну чутливість та специфічність виявляє співвідношення показників лужної фосфатази (МО/л) до загального білірубину (мг/л) менше 4 (індекс лужна фосфатаза/загальний білірубін >4) та АСТ до АЛТ більше 2,2 (індекс АСТ/АЛТ < 2,2) [17]. Усім пацієнтам призначено відповідне лікування халатами, а їх родичам запропоновано проведення генетичного тестування виявленої мутації.

Таким чином, серед дослідженої групи пацієнтів з гепатобілярними порушеннями нез'ясованого генезу виявлені мутації Н1069Q гена *ATP7B* у подальшому супроводжувалося підтвердженням діагнозу хвороби Вільсона-Коновалова. Не виключаємо, що особи дослідженої групи можуть бути носіями інших мутацій гена *ATP7B*, так як немає інформації про спектр мутацій, характерних для нашої популяції. Описано більше 500 алейних варіантів гена *ATP7B*, і для 380 встановлено роль у розвитку захворювання [17]. Результати аналізу мутацій в пацієнтів з хворобою Вільсона-Коновалова з України показали, що у 70% випадків виявлено мутацію Н1069Q [18].

Таблиця 2.

**Частоти встановлених генотипів щодо мутації Н1069Q гена *ATP7B* серед пацієнтів з гепатобілярними порушеннями нез'ясованого генезу**

| Генотип гена <i>ATP7B</i> | Поширеність |      |
|---------------------------|-------------|------|
|                           | n           | %    |
| Н1069Q/Н1069Q             | 1           | 1,0  |
| Н1069Q/Н                  | 3           | 3,0  |
| Н/Н                       | 96          | 96,0 |
| <i>Усього</i>             | 100         | 100  |

**Примітка.** Н – відсутність мутації Н1069Q.

Незважаючи на значно нижчу частоту хвороби Вільсона (1 на 10000) у порівнянні із спадковим гемохроматозом (1 на 500), у групі пацієнтів з ідіопатичними гепатобілярними порушеннями чотирьом особам встановлено діагноз хвороби Вільсона і лише один випадок верифікації спадкового гемохроматозу. Проте, виявлення носійства мутацій гена *HFE* було більш частим ніж мутації гена *ATP7B*. Так, 28,57% осіб були носіями мутації Н63D гена *HFE*, 13,44% – С282Y гена *HFE*. Такі результати пояснюються значною вищою популяційною частотою мутацій гена *HFE* порівняно з *ATP7B*. Виявлення в чотири рази частіше випадків хвороби Вільсона у порівнянні із спадковим гемохроматозом свідчить про вагомий внесок хвороби Вільсона в етіологію ідіопатичних гепатобілярних порушень, у порівнянні із СГХ. Припускаємо, що більшість випадків СГХ, зважаючи на його високу очікувану частоту мало б виявлятися в інших когортах пацієнтів.

Молекулярно-генетичне дослідження є високоінформативним та точним методом, а використані у роботі методи дослідження мажорних мутацій є економічно ефективними, оскільки дослідження проводиться один раз і дозволяє виявляти генетично детерміновані порушення навіть на до клінічної стадії.

**Висновки**

1) Встановлено високі показники носійства мутації гена *HFE* серед пацієнтів з гепатобілярними порушеннями: частота виявлення мутації С282Y (с.845G/A) становить 13,44%, Н63D (с.187C>G) – 28,57%.

2) У результаті проведеного генетичного дослідження мажорну у європейській популяції мутацію Н1069Q гена *ATP7B* виявлено у чотирьох осіб (4%), яким у подальшому підтверджено діагноз хвороби Вільсона-Коновалова.

3) Виявлення в чотири рази частіше випадків хвороби Вільсона у порівнянні із спадковим гемохроматозом свідчить про вагомий внесок хвороби Вільсона в етіологію гепатобілярних порушень нез'ясованого генезу, у порівнянні із гемохроматозом.

**Перспективи подальших досліджень.** Визначення внеску мутацій гена *HFE* та гена *ATP7B* в етіології гепатобілярних порушень дозволить покращити діагностику та вчасно призначити специфічну терапію, щоб запобігти серйозних уражень органів гепатобілярної системи. Цього можна досягти після визначення спектру мутацій в цих генах, специфічних для нашої популяції, та формування алгоритму медико-генетичного консультування таких пацієнтів.

**Література**

1. Kilambi R, Singh AN, Madhusudhan KS, Das P, Pal S. Choledochal cyst of the proximal cystic duct: a taxonomical and therapeutic conundrum. *Ann R Coll Surg Engl.* 2018;100(2):34-7. DOI: 10.1308/rcsann.2017.0201
2. El-Serag HB, Inadomi JM, Kowdley KV. Screening for hereditary hemochromatosis in siblings and children of affected patients. A cost-effectiveness analysis. *Ann. Intern. Med.* 2009;152:261-9. DOI: 10.7326/0003-4819-132-4-200002150-00003
3. Cater MA, La Fontaine S, Shield K, Deal Y, Mercer JF. ATP7B mediates vesicular sequestration of copper: insight into biliary copper excretion. *Gastroenterology.* 2006;130:493-506. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.10.054
4. European Association For The Study Of The Liver EASL clinical practice guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol.* 2012;56(3):671-85. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.11.007
5. Hanson E, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 2009;158:293-6. DOI: org/10.1093/aje/154.3.193
6. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845GA (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet.* 2008;359:211-8. DOI: 10.1182/blood-2005-05-1857
7. Forbes JR, Cox DW. Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins. *Hum Mol Genet.* 2000;9:1927-35. DOI: 10.1093/hmg/9.13.1927

8. Shah AB, Chernov I, Zhang HT, Ross BM, Das K, Lutsenko S, et al. Identification and Analysis of Mutations in the Wilson's Disease Gene (ATP7B): Population Frequencies, Genotype–Phenotype Correlation, and Functional Analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 1997;61:317-28. DOI: 10.1086/514864
9. Lydia K Nyasae, Michael J Schell, Ann L Hubbard. Copper Directs ATP7B to the Apical Domain of Hepatic Cells via Basolateral Endosomes. *Traffic.* 2014;15(12):1344-65. DOI: 10.1111/tra.12229
10. Makukh HV, Zastavna DV, Tyrkus MYa. Pat. 32044 UA, MPK G01N33/49 (2006.01) Sposib vydilannia DNK z lejkocytiv peryferijnoi krovi, zaiavnyk DU «Instytut spadkovoї patologii NAMNU». № u200801896; zaiavl. 14.02.2008; opubl. 25.04.2008, Biul. № 8. [in Ukrainian].
11. Krumina A, Keiss J, Sondore V, Chernushenko A, Cernevska G, Zarina A, et al. From Clinical and Biochemical to Molecular Genetic Diagnosis of Wilson Disease in Latvia. *Rus J of Genet.* 2008;44:1195-200. DOI: 10.1134/S1022795408100086
12. Ferenci P. Regional Distribution of Mutations of the ATP7B Gene in Patients with Wilson Disease: Impact on Genetic Testing. *Hum. Genet.* 2006;120:159. DOI: 10.1007/s00439-006-0202-5
13. Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nature Genet.* 1995;9:210-7. DOI: 10.1038/ng0295-210
14. Kucinskas L, Juzenas S, Sventoraityte J. Prevalence of C282Y, H63D, and S65C mutations in hereditary HFE-hemochromatosis gene in Lithuanian population. *Ann Hematol.* 2012;91(4):491-5. DOI: 10.1007/s00277-011-1338-5
15. Adler G, Clark JS, Łoniewska B, Ciechanowicz A. Prevalence of 845G>A HFE mutation in Slavic populations: an east-west linear gradient in South Slavs. *Croat Med J.* 2011;52(3):351-7.
16. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology.* 2010;139(2):393-408.
17. Ferenci P. Wilson's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3(8):726-33.
18. Myshchenko MS, Voloshyn-Gaponov IK. Sovremennye aspekty bolezni Vilsona. *Mizhnarodnyj nevrologichnyj zhurnal.* 2015;2(72):20-1. [in Russian].

### МУТАЦІЇ Н1069Q ГЕНА АТР7В ТА С282У ТА Н63Д ГЕНА HFE В ОСІБ З ГЕПАТОБІЛІАРНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ НЕЗ'ЯСОВАНОГО ГЕНЕЗУ

Гайбонюк І. Є., Макух Г. В., Тиркус М. Я., Третяк Б. І., Яджин Л. М.

**Резюме.** *Мета.* Визначити поширеність мутацій Н1069Q гена АТР7В, С282У та Н63Д гена HFE та встановити внесок спадкового гемохроматозу та хвороби Вільсона-Коновалова в етіології гепатобіліарних порушень нез'ясованого генезу. *Методи.* Виділення ДНК виконано методом висолювання. Ампліфікацію специфічних послідовностей проведено методом ПЛР. Аналіз ампліфікованих фрагментів проводили у 3% агарозному гелі. *Результати.* Мутацію с.3207 гена АТР7В виявлено у 4,0% пацієнтів, 28,57% осіб були носіями мутації Н63Д гена HFE, 13,44% – С282У гена HFE. Підтверджено один випадок спадкового гемохроматозу та чотири випадки хвороби Вільсона. Цим особам призначено специфічну терапію. Отримані результати показали, що такі дослідження можуть бути складовою алгоритму медико-генетичного консультування таких пацієнтів. *Висновки.* Виявлення в чотири рази частіше випадків хвороби Вільсона у порівнянні із спадковим гемохроматозом свідчить про вагомий внесок хвороби Вільсона в етіологію гепатобіліарних порушень нез'ясованого генезу, у порівнянні із гемохроматозом.

**Ключові слова:** ген АТР7В, ген HFE, хвороба Вільсона-Коновалова, спадковий гемохроматоз, гепатобіліарна система.

### МУТАЦИИ Н1069Q ГЕНА АТР7В И С282У И Н63Д ГЕНА HFE У ЛИЦ С ГЕПАТОБИЛИАРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ НЕЯСНОГО ГЕНЕЗА

Гайбонюк И. Е., Макух Г. В., Тиркус М. Я., Третяк Б. И., Яджин Л. М.

**Резюме.** *Цель.* Определить распространенность мутаций Н1069Q гена АТР7В, С282У и Н63Д гена HFE и установить вклад наследственного гемохроматоза и болезни Вильсона-Коновалова в этиологии гепатобилиарных нарушений неясного генеза. *Методы.* Выделение ДНК выполнено методом высаливания. Амплификации специфических последовательностей проведено методом ПЦР. Анализ амплифицированных фрагментов проводили в 3% агарозном геле. *Результаты.* Мутацию с.3207 гена АТР7В обнаружено у 4,0% пациентов, 28,57% человек были носителями мутации Н63Д гена HFE, 13,44% – С282У гена HFE. Подтвержден один случай наследственного гемохроматоза и четыре случая болезни Вильсона. Этим лицам назначена специфическая терапия. Полученные результаты показали, что такие исследования могут быть составной алгоритма медико-генетического консультирования таких пациентов. *Выводы.* Обнаружение в четыре раза чаще случаев болезни Вильсона по сравнению с наследственным гемохроматозом свидетельствует о весомом вкладе болезни Вильсона в этиологии гепатобилиарных нарушений неясного генеза, по сравнению с гемохроматозом.

**Ключевые слова:** ген АТР7В, ген HFE, болезнь Вильсона-Коновалова, наследственный гемохроматоз, гепатобилиарная система.

### MUTATIONS H1069Q OF ATP7B GENE AND C282Y AND H63D OF HFE GENE IN PERSONS WITH HEPATOBILIARY DISEASES OF UNDEFINED GENESIS

Haiboniuk I., Makukh H., Tyrkus M., Tretiak B., Jadzhy L.

**Abstract.** Wilson disease (WD) is an autosomal-recessive disorder of hepatocellular copper deposition caused by pathogenic variants ATP7B gene. Genetic testing of ATP7B gene is not usually used for Wilson's disease (WD) diagnostics in Ukraine and due to the marked heterogeneity in clinical presentation the diagnosis of WD remains challenging.

Hereditary hemochromatosis is an autosomal-recessive pathology caused by mutations in HFE gene. The most common mutations in this gene are H63D and C282Y. Effective therapy is developed for hemochromatosis and Wilson's Diseases, but these pathologies still appear to be in the late stages, which is associated with nonspecific manifestations.

**Aim.** To establish the prevalence of H1069Q mutations of the *ATP7B*, C282Y and H63D of the *HFE* gene and the contribution of hereditary hemochromatosis (HH) and Wilson's disease (WD) into the etiology of idiopathic hepatobiliary disorders.

**Methods.** DNA was isolated from blood samples using a modified salting out method. Detection of H63D and C282Y mutations of *HFE* gene was carried out using PCR and restriction fragment length polymorphism analysis, H1069Q by BI PASA analysis and detected by agarose electrophoresis.

**Results.** 28.57% of the subjects were carriers of H63D mutation of *HFE* gene, 13.44% – carriers of C282Y mutation of the *HFE* gene but only one case of HH was confirmed. H1069Q mutation of *ATP7B* gene was detected in 4.0% cases which were confirmed as WD diagnosis. Such results are due to a significant higher population frequency of mutations in the *HFE* gene compared to *ATP7B*.

**Conclusions.** The detection four times more cases of WD compared with the HH indicates a greater contribution of WD to the etiology of idiopathic hepatobiliary disorders, compared to HH.

**Key words:** *ATP7B* gene, *HFE* gene, Wilson's disease, hereditary hemochromatosis, idiopathic hepatitis.

Рецензент – проф. Старченко І. І.

Стаття надійшла 06.03.2019 року

DOI 10.29254/2077-4214-2019-1-2-149-229-234

УДК 575.116.4:616.155.392-002.2-037-085

Дмитренко І. В., Мінченко Ж. М., Федоренко В. Г., Дягіль І. С.

### ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ДОДАТКОВИХ ХРОМОСОМНИХ АБЕРАЦІЙ У ПАЦІЄНТІВ З ХРОНІЧНОЮ МІЕЛОЇДНОЮ ЛЕЙКЕМІЄЮ, ЯКІ ОТРИМУЮТЬ ТЕРАПІЮ ІНГІБИТОРАМИ ТИРОЗИНкіНАЗ

Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»  
(м. Київ)

iryna.v.dmytrenko@gmail.com

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Робота виконувалася в рамках науково-дослідних робіт відділу гематології та трансплантології Державної установи «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» за темами «Вивчення молекулярно-генетичних механізмів формування резистентності до терапії інгібіторами тирозинкіназ у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію для обґрунтування шляхів її подолання», № державної реєстрації 0113U002315, та «Роль мутацій гену *BCR/ABL*, хромосомних, молекулярно-генетичних порушень та імунгенетичних показників у формуванні підходів до оптимізації таргетної терапії хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію у віддалений період після аварії на ЧАЕС», № державної реєстрації 0116U003574.

**Вступ.** Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) – одне з небагатьох онкогематологічних захворювань, яке характеризується наявністю специфічного діагностично значущого генетичного порушення, а саме присутністю в лейкемічних клітинах транслокації t(9;22). Така хромосомна перебудова призводить до формування химерного гена *BCR/ABL1* [1,2].

На сьогоднішній день у 10-15% пацієнтів з хронічною фазою ХМЛ визначають наявність додаткових хромосомних аномалій (ДХА), відмінних від класичної транслокації t(9;22). Показано, що їх частота вище у пацієнтів у фазі акселерації і бластного кризу. Появу ДХА відносять до *BCR/ABL1*-незалежних шляхів розвитку резистентності до терапії інгібіторами тирозинкіназ (ІТК), яка спрямована на елімінацію *BCR/ABL1*-позитивних клітин [3].

Значення ДХА для прогнозу відповіді на терапію ІТК вивчено недостатньо. Діючі рекомендації ELNet 2013 вважають наявність додаткових хромосомних аберацій на етапі діагностики несприятливим прогностичним фактором [4]. Wang W. з співавторами [3] підкреслюють, що тільки деякі ДХА асоціюються

з поганим прогнозом перебігу ХМЛ. Проте Всесвітня організація охорони здоров'я розглядає ДХА як ознаку прогресії тільки у випадку, коли вони з'являються в процесі лікування, тоді вони визначаються як ознака клональної еволюції [5].

Багато в чому така невизначеність обумовлена низькою частотою додаткових хромосомних аберацій у пацієнтів з хронічною фазою ХМЛ, а також варіабельністю виявлених ДХА. Тому дослідження значення ДХА у формуванні відповіді на терапію ІТК у хворих на ХМЛ є актуальним.

**Мета дослідження.** Вивчити частоту хромосомних аберацій в Ph+ клітинах кісткового мозку та їх вплив на розвиток резистентності до інгібіторів тирозинкіназ у пацієнтів з хронічною мієлоїдною лейкемією.

**Об'єкт і методи дослідження.** Цитогенетичне дослідження проводили у 547 пацієнтів з хронічною фазою ХМЛ перед призначенням терапії ІТК. Всі пацієнти надали інформовану згоду на використання їх біоматеріалу для дослідження. Діагноз ХМЛ було встановлено або підтверджено співробітниками відділення радіаційної онкогематології і трансплантації стовбурових клітин Інституту клінічної радіології Національного наукового центру радіаційної медицини. Серед обстежених пацієнтів 514 отримували терапію иматинібом, а 33 – нилотинібом. Більшість пацієнтів отримували попереднє лікування різними препаратами (гідроксисечовина, бусульфан, інтерферон) до призначення інгібіторів тирозинкіназ. Тривалість передлікованості становила від 1 до 268 місяців (медіана 9,8 міс).

Стандартне цитогенетичне дослідження передбачало аналіз метафазних пластинок з 24-годинних нестимульованих культур клітин кісткового мозку. Культивування клітин протягом 24 годин здійснювали у поживному середовищі RPMI-1640 («Sigma», США) з додаванням 20 % телячої ембріональної