

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального
образования
«СЕВЕРО-ВОСТОЧНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.К. АММОСОВА» (СВФУ)
Научно-исследовательский институт здоровья

УДК 616.831
№ госрегистрации 01201460279
Инв.№

УТВЕРЖДАЮ



Ректор СВФУ

д-р пед. наук, акад. РАО

Е.И. Михайлова
«26 января 2016 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

по теме:

РАСКРЫТИЕ (МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ) ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ
МЕХАНИЗМОВ ХРОНИЧЕСКОЙ ДЕГЕНЕРАТИВНОЙ ПАТОЛОГИИ В ЯКУТИИ:
ВИЛЮЙСКИЙ ЭНЦЕФАЛИТ, БОКОВОЙ АМИОТРОФИЧЕСКИЙ СКЛЕРОЗ,
ХРОНИЧЕСКИЙ ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ

(промежуточный)

Научный руководитель
канд. биол. наук

Он (26.01.2016) В.Л. Осаковский
подпись, дата

Нормоконтролер

Т.В. Сотникова Т.В. Сотникова
подпись, дата

Якутск 2016

РЕФЕРАТ

Отчет 34 с., введение, 2 раздела, 6 табл., 9 рис., 24 источников.

Ключевые слова: ВИЛЮЙСКИЙ ЭНЦЕФАЛИТ, БОКОВОЙ АМИОТРОФИЧЕСКИЙ СКЛЕРОЗ, ХРОНИЧЕСКИЙ ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ

Объекты исследования: Больные вилюйским энцефалитом, боковым амиотрофическим склерозом, хроническим вирусным гепатитом, биологический материал (кровь, ликвор, ДНК).

Цель работы – Раскрытие (молекулярно-генетических) патогенетических механизмов хронической дегенеративной патологии в Якутии: вилюйский энцефалит, боковой амиотрофический склероз, хронический вирусный гепатит.

Методы исследования – клинический, параклинический (сбор биологического материала), молекулярно-генетический, иммунологический, серологический, нейровизуализация, статистический.

Основные результаты

- Получены новые знания о механизмах модулирующих активность иммунитета у больных вилюйским энцефаломиелитом, одного из представителей нейродегенеративной патологии.

- Идентифицирована новая мутация: однонуклеотидная замена c2155 C/T в гене ГТФазы (молекула белка Динамин 2) у больных членов семьи пораженных доминантной формой спастической параплегии. Мутация привела к замене аминокислоты аргинина на триптофан (p.R7119W) в высоко консервативном эффекторном домене белка ГТФазы. Доказана сегрегация этой мутации с доминантной формой болезни спастическая параплегия с мягкой формой периферической аксонопатии.

- В якутской коллекции ДНК больных БДН (БАС) генотипированием по трем SNP генов разных хромосом: rs12608932 UNC13, rs2275294 ZNF, rs3849943, обнаружена ассоциация только по гену UNC13 19p21.2 rs12608932, при этом ассоциация выявлена только с представителями европейского этноса. Предполагается механизм участия мутантного гена в нарушении баланса рециркуляции мембранных структур эндосом синапса мотонейронов. Выявлено возможное различие патогенетического механизма у этноса, несмотря на сравнительную идентичность фенотипа болезни БАС.

- Показано, что защитные свойства гаплотипов гена IL28B больных при инфицировании вирусом гепатита С зависят строго от типа генома инфицированного вируса С. Полученные знания позволили совершенствовать диагностику и профилактические мероприятия при заболевании.

По результатам исследования опубликованы статьи в российских изданиях, статьи в зарубежных изданиях, тезисы докладов. Оформлена база данных: БД «Клинические проявления вилной энцефаломиелита в зависимости от интратекального синтеза олигоклональных иммуноглобулинов класса G» (Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2015621172).

Полученные результаты рекомендуются как научные и образовательные материалы для медико-биологических учебных заведений и повышение квалификации клинических врачей- неврологов.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Введение.....	8
1 Материалы и методы исследования	13
1.1 Материалы и методы исследования вилойского энцефаломиелита	13
1.1.1 Пациенты с ВЭ и контрольная группа.....	13
1.1.2 Методы исследования вилойского энцефаломиелита	13
1.1.2.1 Анализ уровня цитокинов.....	13
1.1.2.2 Выявление интратекального синтеза олигоклональных IgG.....	13
1.1.2.3 Статистика.....	14
1.2 Материалы и методы исследования бокового амитрофического склероза.....	14
1.2.1 Пациенты с БАС и контрольная группа.....	14
1.2.2 Анализ полиморфизма SNP rs12608932 UNC13, rs2275294 ZNF, rs3849943 у больных БДН	14
1.2.3. Статистика.....	18
1.3 Материалы и методы исследования спастической параплегии Штрюмпеля	19
1.3.1 Пациенты с семейной спастической параплегией Штрюмпеля.....	19
1.3.2 Секвенирование экзона генома.....	19
1.3.3 Анализ эндоцитоза.....	20
1.4.Материалы и методы исследования вирусных гепатитов.....	20
2 Результаты и обсуждение.....	20
2.1 Результаты исследования и обсуждение: вилойский энцефаломиелит.....	20
2.2 Результаты исследования и обсуждение: боковой амитрофический склероз.....	26
2.3 Результаты исследования и обсуждение: доминантная спастическая параплегия Штрюмпеля.....	27
2.4 Результаты исследования и обсуждение: хронический вирусный гепатит С.....	29
Заключение.....	32
Список использованных источников	33

ВВЕДЕНИЕ

Среди неврологических патологий, распространенных в Якутии, особое внимание привлекают нейродегенеративные заболевания: виллюйский энцефаломиелит (ВЭ) и родственный по клинике спастическая параплегия, боковой амиотрофический склероз (БАС), причина и патогенез которых остаются неясными. В отсутствие методов патогенетического лечения эти заболевания приводят к быстрой инвалидизации и смерти больных. Кроме того, Якутия считается неблагополучным регионом по распространению вирусного гепатита С, который имеет тенденцию к хронизации, механизмы которой также остаются малоизученными.

Виллюйский энцефалит

Виллюйский энцефалит является эндемическим заболеванием в Северо-Восточной Сибири и считается хроническим энцефалитом неизвестного происхождения, распространенным в Республике Саха (Якутии). Основная клиническая картина болезни связана с сенсорной атаксией, нарушением походки, спастичностью конечностей, когнитивными нарушениями и дисфункцией мочевого пузыря. Исследования компьютерной и магнито-резонансной томографии (МРТ) показали увеличение внутренних полостей желудочков мозга и сообщающуюся гидроцефалию, результат процесса атрофии мозга. В настоящее время виллюйский энцефалит рассматривается как одна из форм первично-хронической нейродегенеративной патологии центральной нервной системы. Природа метаболических нарушений нейродегенеративных заболеваний (БАС, Паркинсона, спастической параплегии и разных форм наследственной атаксии) остается неизученной.

Одной из патогенетических особенностей многих нейродегенеративных болезней является амилоидоз мозга: деструктивное разрушение нейронных цепей и самих нейронов, выпадение продуктов распада нейронов в форме токсических белковых отложений. Белковые агрегаты обладают антигенными свойствами и могут инициировать воспалительную реакцию. Однако, многие нейродегенеративные болезни не проявляют выраженных признаков воспаления паренхимы мозга. Объяснение этому дегенеративному процессу лежит в области изменений иммунного контроля паренхимы мозга - индукции иммунной толерантности патогенного мозга. Воспалительные процессы при дегенеративных заболеваниях могут протекать от субклинической формы до острых воспалительных реакций. Их выраженность зависит от степени подавления интратекального и периферического иммунитета и проявляется как нейrozзащитная реакция против острого разрушительного воспаления циркулирующими в крови иммунными клетками при инфильтрации в ткани мозга. Последние исследования показывают роль вегетативной нервной системы в дистанционном контролировании иммунного статуса паренхимы мозга с

помощью нейротрансмиттеров периферического иммунитета [1, 2, 3, 4, 5]. Защита ЦНС от острых воспалений осуществляется двумя уровнями регуляции иммунитета организма. Один из путей связан с периферической нервной системой. Исследования показали, что сенсорная афферентная сеть блуждающего нерва может обнаруживать локальные повышение цитокинов воспаления и информировать головной мозг о воспалении на периферии. Активация блуждающего нерва рефлекторно иннервирует иммунные клетки внутренних органов организма, при этом иммунная функция клеток модифицируется торможением развития острого воспаления. Исследования показали участие Т-клеток и выявили две особенности Т-клеток. Они имеют рецепторы норадреналина, которые активируются этим нейротрансмиттером, освобождаемый нервными окончаниями блуждающего нерва, и способностью секretировать ацетилхолин. Активация ими рецепторов ацетилхолина макрофагов тканей внутренних органов блокирует секрецию воспалительного цитокина TNFa, что снижает уровень циркулирующих в крови воспалительных цитокинов, способных при инфильтрации в паренхиму мозга индуцировать воспаление.

Другой путь связан с регуляцией интрапекального врожденного иммунитета. Локальный иммунный ответ паренхимы мозга индуцируется в ответ на разрушение тканей мозга и гематоэнцефалического барьера. Клетки глии и нейронов способны индуцировать активную защитную (иммунную) реакцию и активировать локальную систему комплемента [6]. Неконтролируемая активность врожденного иммунитета способна развивать острый воспалительный процесс с деструктивным действием и на здоровые ткани мозга. Клетки глии и нейронов мозга имеют защитные механизмы способные контролировать острые воспаления. Механизмы защитного действия поврежденных участков мозга связаны экспрессией глиальными клетками и нейронами лигандов для рецепторов воспалительных Т-клеток и дистрофических клеток, индуцирующих их апоптоз и лизис их из паренхимы мозга. Большую роль в защитной реакции и репарации ткани мозга играют также стволовые клетки мозга. Механизм контроля баланса между разрушительным и защитным действием этого врожденного иммунитета мозга остается неясным.

Вилойский энцефаломиелит является хорошей моделью для изучения механизма нейроиммунного воспалительного рефлекса в силу своей клинической особенности. Хроническая дегенеративная патология головного мозга ВЭ протекает невыраженным воспалительным изменением и медленным прогрессированием симптоматики. При патоморфологическом исследовании больных отмечается диффузная атрофия мозга, преимущественно коры головного мозга и верхних отделов спинного мозга. Такие больные при экстремально стрессовых условиях предрасположены острому воспалению. Острое воспаление характеризуется выраженными неврологическими проявлениями, связанными с

дисфункцией черепно-мозговых нервов, усилением пирамидных нарушений. Отмечается развитие процесса самоограничения и затухания воспаления с переходом в хроническую форму болезни. Самоограничивающийся воспалительный процесс допускает возможность действия иммунорегуляторного механизма. Действительно больные хронической формой ВЭ проявляют выраженное и стойкое угнетение иммунной системы с цитокиновым статусом, по клинической симптоматике этиологически сближающей ВЭ с группой спонгиозных дегенераций мозга. Раскрытие молекулярного иммунорегуляторного механизма иммунитета при дегенеративных заболеваниях мозга, в том числе периферического воспалительного рефлекса представляется актуальным научным направлением, открывающим перспективу терапевтического контроля острых воспалений и получения новых знаний по этиологии дегенеративных заболеваний мозга человека.

Боковой амиотрофический склероз

Самым распространенным нейродегенеративным заболеванием из группы болезней двигательного нейрона (БДН) является спонтанная форма бокового амиотрофического склероза (БАС), доля которой составляет 80%, остальная часть приходится на наследственные формы семейных случаев с аутосомно-домinantным и аутосомно-рецессивным типом наследования. В основную группу входят следующие клинические формы патологии: прогрессирующая мышечная атрофия (ПМА), прогрессирующий бульбарный паралич (ПБП) и первичный боковой склероз (ПБС), доля которых составляет соответственно 9%, 8% и 2% от общего количества больных БДН [7].

Причина гибели мотонейронов при спорадической форме БАС остается до конца невыясненной. Общепринятой точкой зрения развития болезни считается сочетание действия средовых факторов с генетической предрасположенностью организма пациента. В настоящее время обнаружены много генов – кандидатов ассоциирующих с болезнью, которые играют определенную роль в патогенезе заболевания. Гены локализованы на разных хромосомах. В целом, это – набор генов, определяющих функциональную способность мотонейрона: запуск сигнальных путей активации и регуляции каскада внутриклеточных биохимических процессов, направленных на формирование синаптической передачи, формирование мембранных эндосомальных структур и их участие при секреции нейротрансмиттера, поддержание защитных внутриклеточных механизмов жизнеспособности мотонейрона. Особенно, это относится к аксональной части мотонейрона, где новообразования эндосом, связанные с секрецией и окислительно-восстановительные процессы наиболее интенсивны. Спорадическая форма БАС несмотря на спонтанный

характер появления болезни ассоциируется со многими генами. Одними из этих генов являются: ген TARDBP (1 хромосома) продуцирует белок с функцией репрессора экспрессии ДНК, ген ITPR2 (12 хромосома) продуцирующий белок рецептор, связывающий молекулу инозитола, контролирующий функцию кальциевого канала участвующего в секреции нейротрансмиттера, ген UNC13A (19 хромосома) продуцирует белок, участвующий в освобождении нейротрансмиттера, возможно ацетилхолина. Достаточно широкий локус (9 хромосома) вмещает ряд генов, в том числе ген интерферона К (каппа) и C9orf72, участвующих в иммунитете и в процессах формирования внутриклеточных эндосом и аутофагии и ряд других. Наблюдается различие от этнической принадлежности ассоциации отдельных генов с болезнью больного БАС. Все это свидетельствует о высокой взаимосвязанности и единстве механо-биохимической динамики секреторной функции аксона, что нарушение отдельных звеньев приводит патогенному нарушению основной функции аксона - секреции нейротрансмиттера.

Хронический вирусный гепатит С

Поиски генов организма человека с защитными свойствами против инфекции гепатита С являются приоритетным направлением исследований. Гены с защитными свойствами значительно снижают затраты на лечение и риск развития вторичных осложнений. Одним из таких генов является ген IL28B, кодирующий интерферон лямбда 3 [8]. Полиморфные варианты этого гена положительно влияют на лечение гепатита С, однако эффективность защитного механизма организма больного в зависимости от типа генома инфицированного вируса С и от этнической принадлежности больного недостаточно изучена. Решение этих вопросов существенно повысит качество диагностики и эффективность терапевтических мероприятий этого заболевания.

Название этапа: выявление патогенных звеньев метаболического нарушения клеток

Цель этапа: выявить патогенные звенья метаболического нарушения клеток при развитии хронических нейродегенеративных заболеваний: вилойский энцефалит и клинически родственной патологии спастическая параплегия Штрюмпеля, боковой амиотрофический склероз, а также оценка эффективности защитного гаплотипа гена IL28B в зависимости от инфицировании пациента вариантами генома вируса С.

Задачи исследования:

1. Оценить интратекальный цитокиновый статус и роль астроцита в регуляции иммунного ответа на модели нейродегенеративной патологии вилойского энцефаломиелита.

2. Провести анализ SNPs (rs12608932) UNC13, (rs2275294) ZNF, (rs3849943) I.Fogh et.all.,2014 у больных БДН (БАС).
3. Секвенировать экзомы полного генома больных доминантной спастической параплегии, провести биоинформационный анализ последовательности и аннотировать полиморфизм экзомов ассоциирующихся с болезнью.
4. Генотипировать больные на полиморфизм гаплотипа гена IL28B, инфицированные 1b и За геном вируса гепатита C.