

DOI: 10.19112/2413-6174-2024-25-3-34

РОЛЬ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В РАЗВИТИИ ФЕНОТИПА БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА У ГЕТЕРОЗИГОТНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ГЕНА *ATP7B*

Е.Ю. Ильичева, К. Аббас, М. Аль Фаррух, Д.Н. Магазенкова,
Н.В. Цымбаленко, Л.В. Пучкова

Университет ИТМО,
Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, Кронверский проспект, 49

РЕЗЮМЕ. Болезнь Вильсона (БВ) – редкое наследственное моногенное аутосомно-рецессивное заболевание. Оно вызвано мутациями в гене *ATP7B*, кодирующем Cu-транспортную АТФазу, которые приводят к нарушению выведения Cu из организма и ее токсическому накоплению в клетках печени, мозга и других органов. Исследования БВ, в основном, проводят с участием гомозиготных носителей мутаций в гене *ATP7B* или на *Atp7b*^{-/-} мышах. Однако число гетерозиготных носителей этого гена в некоторых регионах может достигать 3% от общего населения. Среди них часто выявляют индивидуумов, манифестирующих признаки БВ и/или болезни Паркинсона (БП), которые могут усиливаться в зависимости от различных экологических и генетических факторов. Изучено влияние высококалорийной диеты (ВКД) на развитие признаков, характерных для метаболического синдрома, ассоциированного с БВ, у *Atp7b*^{+/-} мышей, так как пациенты с БВ склонны к его развитию. Показано, что ВКД у *Atp7b*^{+/-} мышей не приводит к изменению показателей статуса Cu и липидного обмена. В печени *Atp7b*^{+/-} мышей обнаруживаются структурные нарушения, характерные для БВ, переходящие в жировую дистрофию и фиброз на фоне ВКД. Масса тела *Atp7b*^{+/-} мышей не отличается от контрольных показателей, однако, за счет гипертрофии жировых клеток, у них происходит значительное увеличение объема жировой ткани (ЖТ). Кроме того, у всех *Atp7b*^{+/-} мышей, получавших ВКД, наблюдается активация ЖТ, сходной с бурой ЖТ и снижение уровня глюкозы в крови. Уровень мРНК Cu-ассоциированных генов снижается в печени *Atp7b*^{+/-} мышей, получавших ВКД, и повышается в клетках подкожной ЖТ. Полученные данные свидетельствуют о необходимости врачебного контроля гетерозиготных носителей БВ для предотвращения патологий печени, метаболических нарушений, а также ранней диагностики БП, которая потенциально может развиваться у этих пациентов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метаболизм меди, АТФаза Вильсона, *ATP7B*, Болезнь Вильсона, жировая ткань.

Для цитирования: Ильичева Е.Ю., Аббас К., М. Аль Фаррух, Магазенкова Д.Н., Цымбаленко Н.В., Пучкова Л.В. Роль экологических факторов в развитии фенотипа болезни Вильсона у гетерозиготных носителей гена *ATP7B*. Микроэлементы в медицине. 2024;25(3):81–83. DOI: 10.19112/2413-6174-2024-25-3-34.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Вильсона (БВ, гепатолентикулярная дегенерация) – наследственное моногенное аутосомно-рецессивное заболевание метаболизма меди, вызванное мутациями в гене медь-транспортной АТФазы *ATP7B*. В организме млекопитающих белок *ATP7B* локализован преимущественно в гепатоцитах и выполняет две основные функции: 1) встраивание атомов меди в апо-церулоплазмин (апо-ЦП) для формирования функционального секреторного холо-церулоплазмينا (ЦП), основного медь-транспортного белка сыворотки крови позвоночных; 2) выведение избытка меди в желчь (Shribman et al., 2021).

Дефицит или дисфункция *ATP7B* формируют четыре биохимических признака БВ: перманентно низкие концентрации ЦП и связанной с ним меди в сыворотке крови, появление в крови «свободной меди», не ассоциированной с ЦП, накопление меди в клетках печени, мозга и других органов, а также увеличение ее содержания в суточной моче (Reed et al., 2018).

Частота встречаемости БВ в популяции составляет в среднем 1-3 случая на 100 тыс. населения. Однако число гетерозиготных носителей гена БВ в некоторых регионах может достигать 2,5–7% от общего числа населения (Członkowska et al., 2018). Среди них, стандартно считающихся здоровыми, часто выявляют индивидуумов, манифестирующих один из четырех биохимических признаков БВ. Исследования, посвященные изучению роли внешних факторов на здоровье гетерозиготных носителей гена БВ, практически не проводятся. Эпидемиологический мониторинг в популяциях осложнен

генетической гетерогенностью гетерозиготных когорт, поэтому не позволяет сделать однозначные заключения.

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – оценить влияние высококалорийной диеты на развитие признаков, характерных для метаболического синдрома, ассоциированного с БВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на гетерозиготных 4-месячных самцах, полученных от мышей линии C57Bl/6 с нокаутом гена *ATP7B* (*Atp7b*^{-/-}), являющихся гено- и фенотипом БВ (*Atp7b*^{+/-} мыши). Показатели уровня ЦП, концентрации меди, содержания АЛТ и АСТ в крови и меди в печени соответствовали показателям у *Atp7b*^{+/+} мышей из этих же пометов.

Мыши были разделены на четыре группы: контрольные животные, содержавшиеся на стандартной диете (СД, 1-я группа); мыши, получавшие ВКД (2-я группа); мыши *Atp7b*^{+/-}, которые содержались на СД (3-я группа), мыши *Atp7b*^{+/-}, получавшие ВКД. Энергетическая ценность высококалорийного корма составляла 420 ккал/100 г, стандартного – 295 ккал/100 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ

За 18 недель эксперимента масса тела животных всех четырех групп увеличилась на приблизительно на 50% и практически не отличалась между группами. При этом у животных 2-й и 4-й групп, получавших ВКД, увеличился объем жировой ткани в 2–3 раза в областях, характерных для подкожной и висцеральной жировой клетчатки.

Концентрация меди, содержание ЦП и уровень его оксидазной активности, концентрации липидов (холестерола и триацилглицеридов) и их белковых переносчиков в сыворотке крови мышей всех групп не отличались друг от друга. У животных 2-й группы концентрация инсулина повышалась в 4 раза. При этом у гетерозиготных животных 4-й группы восстанавливалась чувствительность к инсулину и снижалась концентрация глюкозы в крови.

Гистологический анализ препаратов печени показал, что у животных дикого типа, находящихся на СД, печень сохраняла все характерные для нее структурные элементы. В печени мышей 2-й группы в гепатоцитах появлялись липидные капли разных размеров. У гетерозиготных животных 3-й группы наблюдались признаки структурных нарушений, характерные для БВ: липидные включения небольшого диаметра в цитоплазме гепатоцитов, расширенные синусоидные капилляры, заполненные эритроцитами, эозинофилы, а также зоны некроза в паренхиме печени. На фоне ВКД состояние печени у гетерозиготных животных 4-й группы еще больше ухудшалось. У них развивалась жировая дистрофия разной степени выраженности.

Анализ состояния соединительной ткани показал, что в печени гетерозиготных мышей коллагеновые волокна были не только в рыхлой соединительной ткани крупных сосудов, но и вблизи расширенных синусоидных капилляров. У этих животных наблюдались признаки некроза и жирового перерождения, что характерно для БВ. У гетерозиготных мышей 4-й группы, получавших ВКД, накопление меди в печени, характерные для БВ, сочетались с проблемами жирового обмена, в результате чего гепатоциты группировались по несколько клеток, окруженных соединительной тканью, что свидетельствует о развитии фиброза.

Гистологический анализ препаратов подкожной жировой ткани (ЖТ) показал, что у мышей 2-й группы, получавших ВКД, средняя величина адипоцитов увеличивалась более чем в два раза. Число жировых клеток на единицу площади уменьшалось пропорционально. Это происходило за счет гипертрофии жировых клеток. Количественная оценка подкожной жировой ткани у гетерозиготных животных 3-й группы показала, что средний размер адипоцитов у мышей этой группы больше, чем у диких мышей в полтора раза. У гетерозиготных мышей, получавших ВКД, средняя площадь жировой клетки и количество клеток на 1 мм² достоверно не отличались от показателей в контрольной группе. Кроме того, у всех гетерозиготных животных, получавших ВКД, наблюдалась активация ЖТ, сходной по морфологическим критериям с бурой ЖТ, что дополнительно подтверждено с помощью ОТ-ПЦР анализа с помощью специфических праймеров к гену *ZIC1*, специфически экспрессирующемуся

в клетках бурой ЖТ. Известно, что клетки бурой ЖТ действуют в основном как источник энергии. Они не накапливают липиды, а активно их сжигают, превращая энергию в тепло. Кроме того, клетки бурой ЖТ способствуют всасыванию глюкозы из крови. Таким образом, с активацией бурой ЖТ сочетается тенденция к уменьшению средней площади адипоцитов в подкожной ЖТ у гетерозиготных мышей, получавших ВКД, и низкий уровень глюкозы в группе гетерозиготных животных, получавших ВКД, которые были описаны выше.

Анализ уровня экспрессии генов метаболической системы меди показал, что в печени мышей, содержащихся на ВКД, уровень мРНК медь-ассоциированных генов значительно снижался. У гетерозиготных мышей 4-й группы эти изменения более значительны. В клетках подкожной ЖТ у животных, получавших ВКД, уровень экспрессии генов, участвующих в металлизировании ЦП, наоборот, повышался. В клетках висцеральной ЖТ ВКД не стимулировала активность генов, взятых в рассмотрение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о необходимости контроля статуса меди, режима питания и неврологических симптомов у гетерозиготных носителей мутации в гене БВ *ATP7B* для предотвращения патологий печени, метаболических нарушений, а также ранней диагностики и более эффективного лечения БВ и БП, которые потенциально могут развиваться у этих пациентов.

Работа поддержана грантом РНФ 20-74-10087.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

Czlonkowska A., Litwin T., Dusek P., Ferenci P., Lutsenko S., Medici V., Rybakowski J.K., Weiss K.H., Schilsky M.L. Wilson disease. Nat Rev Dis Primers. 2018; 4(1): 21.

Reed E., Lutsenko S., Bandmann O. Animal models of Wilson disease. J Neurochem. 2018; 146(4): 356–373.

Shribman S., Poujois A., Bandmann O., Czlonkowska A., Warner T.T. Wilson's disease: update on pathogenesis, biomarkers and treatments. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2021; 92(10): 1053–1061.

THE ROLE OF ENVIRONMENTAL FACTORS IN THE DEVELOPMENT OF THE WILSON'S DISEASE PHENOTYPE IN HETEROZYGOUS CARRIERS OF THE *ATP7B* GENE

*E.Y. Ilyechova, K. Abbass, M. Al Farruh, D.N. Magazenkova,
N.V. Tsybalenko, L.V. Puchkova*

ITMO University,
Kronverksky Pr. 49, St. Petersburg, 197101, Russian Federation

ABSTRACT. Wilson's disease (WD) is a rare inherited monogenic autosomal recessive disease. It is caused by mutations in the *ATP7B* gene encoding Cu-transport ATPase, which lead to impaired excretion of Cu from the body and its toxic accumulation in the liver, brain and other tissues. WD studies are mainly carried out with the participation of homozygous carriers of mutations in the *ATP7B* gene or on *Atp7b*^{-/-} mice. However, the number of heterozygous carriers of this gene in some regions can reach 3% of the total population. Among them, individuals are often identified who manifest signs of WD and/or Parkinson's disease (PD), which can increase depending on various environmental and genetic factors. We studied the effect of a high-calorie diet (HCD) on the development of metabolic syndrome associated with WD in *Atp7b*^{+/-} mice. HCD in *Atp7b*^{+/-} mice does not lead to changes in Cu status indexes and lipid metabolism. In the liver of *Atp7b*^{+/-} mice, structural disorders characteristic of WD are found, turning into fatty degeneration and fibrosis on the background of HCD. All *Atp7b*^{+/-} mice treated with HCD showed activation of adipose tissue (AT) similar to brown AT and a decrease in blood glucose levels. The mRNA level of Cu-associated genes decreases in the liver of *Atp7b*^{+/-} mice treated with HCD and increases in subcutaneous fat cells. The data obtained indicate the need for medical control of heterozygous WD carriers to prevent liver pathologies, metabolic disorders, as well as early diagnosis of PD, which can potentially develop in these patients.

KEYWORDS: copper metabolism, Wilson's ATPase, *ATP7B*, Wilson's disease, adipose tissue.