

<https://doi.org/10.21516/2072-0076-2019-12-3-21-29>

Ассоциация мутаций и полиморфных вариантов гена VHL с клиническими характеристиками капиллярной гемангиомы сетчатки

В.В. Нероев — член-корр. РАН, д-р мед. наук, профессор, директор¹

С.В. Саакян — д-р мед. наук, профессор, руководитель отдела офтальмоонкологии и радиологии¹

А.Ю. Новикова — аспирант отдела патологии сетчатки и зрительного нерва¹

М.В. Рябина — канд. мед. наук, старший научный сотрудник отдела патологии сетчатки и зрительного нерва¹

П.А. Илюхин — канд. мед. наук, научный сотрудник отдела патологии сетчатки и зрительного нерва¹

А.Ю. Цыганков — канд. мед. наук, младший научный сотрудник отдела офтальмоонкологии и радиологии¹

В.И. Логинов — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики²

А.М. Бурденный — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики²

¹ ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, Москва, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19

² Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Цель работы — изучение ассоциации мутаций и полиморфных вариантов гена VHL с клиническими характеристиками капиллярной гемангиомы сетчатки. **Материал и методы.** Материалом исследования служили 29 образцов ДНК, выделенных из лейкоцитов периферической крови больных с капиллярными гемангиомами сетчатки. Изучение мутаций и полиморфных маркеров гена VHL осуществляли методом анализа кривых плавления с высокой разрешающей способностью. **Результаты.** Выявлена значимая связь частоты мутации тирозина в 156-м положении гена VHL с локализацией капиллярной гемангиомы на средней периферии глазного дна, а также с наличием локальной экссудативной отслойки сетчатки и фиброглияльной пролиферации в области опухоли ($p = 0,02$; $RR = 1,86$). Установлена ассоциация частоты мутации аргинина в 200-м положении гена с наличием гемангиобластом мозжечка и спинного мозга. Установлена статистически значимая ассоциация генотипа GA полиморфного маркера rs 779805 гена VHL с локализацией капиллярной гемангиомы на средней периферии глазного дна ($p = 0,03$; $RR = 4,8$). Показано, что носительство аллеля T-полиморфного маркера rs 779808 может ассоциироваться с характерной локализацией опухоли на крайней периферии сетчатки в верхнем височном квадранте. Определена тенденция к увеличению частоты выявления генотипа AC полиморфного маркера rs 1678607 у пациентов с геморрагическими осложнениями капиллярной гемангиомы, а также к увеличению частоты генотипа TT полиморфного маркера rs 1642742 у больных с гемангиобластомами мозжечка. **Заключение.** Необходимо проведение дальнейших исследований на большем клиническом материале, поскольку полученные результаты могут иметь значение для ранней диагностики болезни Гиппеля — Линдау, прогнозирования появления и характера течения капиллярных гемангиом сетчатки, а также вероятности возникновения системных проявлений заболевания.

Ключевые слова: болезнь Гиппеля — Линдау, капиллярная гемангиома сетчатки, ген *VHL*, мутации

Для цитирования: Нероев В.В., Саакян С.В., Новикова А.Ю., Рябина М.В., Илюхин П.А., Цыганков А.Ю., Логинов В.И., Бурденный А.М. Ассоциация мутаций и полиморфных вариантов гена *VHL* с клиническими характеристиками капиллярной гемангиомы сетчатки. Российский офтальмологический журнал. 2019; 12 (3): 21-9. doi: 10.21516/2072-0076-2019-12-3-21-29

Конфликт интересов: отсутствует.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Association of mutations and polymorphic variants of the *VHL* gene with the clinical characteristics of retinal capillary hemangioma

V.V. Neroev — Corresponding member of RAS, Dr. Med. Sci., Professor, director¹

S.V. Saakyan — Dr. Med. Sci., Professor, head of ocular oncology and radiology department¹

A.Yu. Novikova — Ph. D. student, department of retinal and optic nerve pathology¹

M.V. Ryabina — Cand. Med. Sci., senior researcher, department of retinal and optic nerve pathology¹

P.A. Ilyukhin — Cand. Med. Sci., researcher, department of retinal and optic nerve pathology¹

A.Yu. Tsygankov — Cand. Med. Sci., junior researcher, ocular oncology and radiology department¹

V.I. Loginov — Cand. Biol. Sci., leading researcher, laboratory of pathogenomics and transcriptomics²

A.M. Burdenny — Cand. Biol. Sci., senior researcher, laboratory of pathogenomics and transcriptomics²

¹ Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, 14/19, Sadovaya-Chernogryazskaya St., Moscow, 105062, Russia

² Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya St., Moscow, 125315, Russia
ayukolesnikova@gmail.com

Purpose. To study the association of mutations and polymorphic variants of the *VHL* gene with the clinical characteristics of retinal capillary hemangioma. **Material and methods.** 29 DNA samples isolated from peripheral blood leukocytes of patients with retinal capillary hemangiomas were tested. The analysis of mutations and polymorphic markers of the *VHL* gene was carried out by high resolution melting curve analysis. **Results.** A significant correlation was found between the frequency of tyrosine mutation in the 156th position of the *VHL* gene and the localization of the capillary hemangioma in the middle periphery of the fundus, the presence of local exudative retinal detachment and fibroglial proliferation in the tumor region ($p = 0.02$; $RR = 1.86$). An association was established between arginine mutation frequency in the 200th position of the gene with the presence of cerebellar hemangioblastoma and spinal cord. A statistically significant association of the GA genotype of the polymorphic marker rs779805 of the *VHL* gene with the localization of capillary hemangioma in the middle periphery of the fundus was established ($p = 0.03$; $RR = 4.8$). It has been shown that the carriage of the T allele of the polymorphic marker rs779808 may be associated with the characteristic localization of the tumor at the extreme periphery of the retina in the upper temporal quadrant. A tendency to increasing frequency of occurrence of the AC genotype of the polymorphic marker rs1678607 in patients with hemorrhagic complications of capillary hemangioma, as well as to increasing frequency of the TT genotype of the polymorphic marker rs1642742 in patients with cerebellar hemangioblastomas was determined. **Conclusion.** Further research involving more clinical material is needed, as our results may be important for early diagnosis of Hippel — Lindau disease, prediction of the onset and clinical course of retinal capillary hemangiomas, as well as of the probability of systemic manifestations of the disease.

Keywords: Hippel — Lindau disease, retinal capillary hemangioma, *VHL* gene, mutations

For citation: Neroev V.V., Saakyan S.V., Novikova A.Yu., Ryabina M.V., Ilyukhin P.A., Tsygankov A.Yu., Loginov V.I., Burdenny A.M. Association of mutations and polymorphic variants of the *VHL* gene with the clinical characteristics of retinal capillary hemangioma. Russian ophthalmological journal. 2019; 12 (3): 21-9 (In Russian). doi: 10.21516/2072-0076-2019-12-3-21-29

Conflict of interests: there is no conflict of interests.

Financial disclosure: No author has a financial or property interest in any material or method mentioned.

Капиллярная гемангиома сетчатки (КГС) представляет собой доброкачественную опухоль, которая образована капилляроподобными сосудистыми каналами, окруженными вакуолизованными стромальными клетками, а также более мелкими опухолеподобными клетками, экспрессирующими маркеры стволовых клеток [1, 2]. Клиническая картина КГС зависит от локализации, размера и характера роста опухоли. Чаще всего на периферии глазного дна в верхнем или нижнем височных квадрантах выявляется округлое образование оранжево-красного цвета с резко расширенными и извитыми питающими сосудами (рис. 1) [3]. В 17 % случаев может также отмечаться юстапапиллярное расположение опухоли [4].

Из всех выявляемых КГС 75 % являются спорадическими, а 25 % ассоциированы с болезнью Гиппеля — Линдау (*Von Hippel — Lindau disease, VHL*) [5]. Заболевание представляет собой наследственный опухолевый синдром, для которого характерно развитие доброкачественных и злокачественных образований различной локализации: гемангиобластом центральной нервной системы и сетчатки, светлоклеточной карциномы и кист почек, феохромоцитомы, нейроэндокринной опухоли и кист поджелудочной железы, опухоли эндолимфатического мешка, папиллярной цистаденомы придатка яичка и широкой связки матки [6]. Частота болезни Гиппеля — Линдау в популяции составляет 1:36000–1:53000 новорожденных, а пенетрантность достигает свыше 90 % к возрасту 65 лет [6–8]. Поражение сетчатки является наиболее ранним проявлением синдрома Гиппеля — Линдау, так как частота выявления капиллярной гемангиомы варьирует от 49 до 85 %, а средний возраст пациентов на

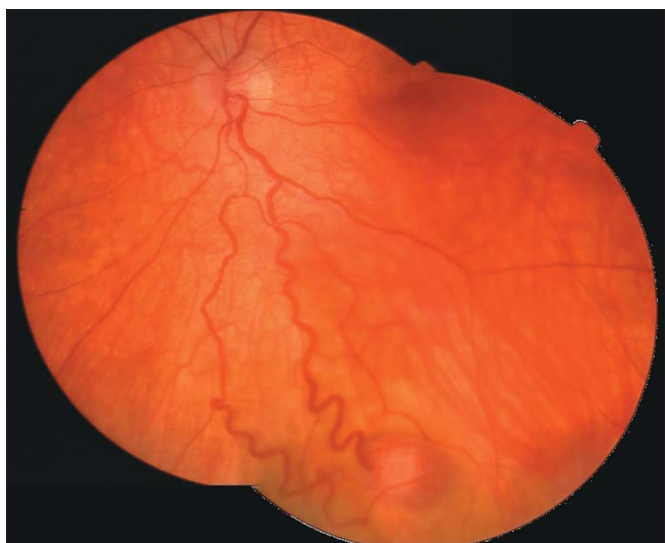


Рис. 1. Цветная фотография глазного дна: капиллярная гемангиома сетчатки с расширенными и извитыми питающими сосудами в нижневисочной периферии глазного дна

Fig. 1. Color fundus photograph: retinal capillary hemangioma with dilated and twisted feeding vessels in the lower temporal periphery of the fundus

момент выявления офтальмологических проявлений заболевания составляет около 25 лет [3, 9, 10]. Таким образом, офтальмологи зачастую являются первыми специалистами, к кому обращаются пациенты.

Клинические и генетические исследования болезни Гиппеля — Линдау подтвердили, что образование опухолей также соответствует принципам двухударной модели канцерогенеза [11], что в свою очередь объясняет монофокальный характер поражения и более позднюю манифестацию (медиана 36 лет) КГС в спорадических случаях [12, 13].

Известно, что ген *VHL* относится к классу генов — супрессоров опухолевого роста, расположен на коротком плече 3-й хромосомы (3p25-26), содержит 3 экзона и кодирует 213 аминокислот [10]. Белковый продукт (pVHL) этого гена связывается с гидроксиглированным индуцируемым гипоксией фактором 1 α (HIF-1 α) и служит компонентом распознавания комплекса E3-убиквитинлигазы, который включает Cul2 (Cullin2), Elongin B и C и Rbx1 (Ring-boxprotein1). В условиях нормоксии E3-убиквитинлигаза приводит к полиубиквитинированию HIF-1 α с последующей его протеасомной деградацией [9]. В случае мутаций гена *VHL* недеградированный HIF-1 α образует гетеродимер с HIF- β и приводит к усилению экспрессии генов, индуцируемых гипоксией, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), эритропоэтин (Epo), тромбоцитарный фактор роста (PDGF- β) и трансформирующий фактор роста (TGF- α) [6]. Кроме того, HIF может вызывать высвобождение фактора роста фибробластов (FGF) и эпидермального фактора роста (EGF) [14]. Таким образом, pVHL стимулирует ряд ангиогенных факторов, способных индуцировать и стимулировать образование различных VHL-ассоциированных поражений, таких как гемангиобластомы, кисты и другие опухоли.

В настоящее время выявлено более 1000 различных герминальных и соматических мутаций гена *VHL* [14]. В целом мутации являются чрезвычайно гетерогенными (микроделеции, микроинсерции, миссенс-мутации, нонсенс-мутации, сплайсинговые мутации и крупные делеции) и с различной частотой распределяются по всей кодирующей последовательности гена, за исключением первых 50 кодонов [7, 15]. Кроме того, в литературе описаны случаи мозаицизма в единичных семьях с синдромом Гиппеля — Линдау, а также продолжают выявляться ранее неописанные мутации [15, 16].

В силу значительной вариации экспрессии гена *VHL* при болезни Гиппеля — Линдау как внутри одной семьи, так и между семьями, на данный момент гено-фенотипическая корреляция изучена только у больных с феохромоцитомой, на основании чего различают VHL-синдром типа 1 (без феохромоцитомы) и VHL-синдром типа 2 (с высоким риском развития феохромоцитомы). Тип 2 подразделяется на три подтипа: тип 2A, который обнаруживается при гемангиобластомах или феохромоцитомах, но редко

наблюдается при почечно-клеточном раке; тип 2В, который выявляется при гемангиобластомах, почечно-клеточном раке и феохромоцитомах; тип 2С, который обнаруживается только при феохромоцитомах. Необходимо отметить, что мутации, связанные с VHL-синдромом типа 1, чаще представляют собой делеции и транквирующие мутации, а при 2-м типе чаще миссенс-мутации. КГС встречаются при типах 1, 2А и 2В [10, 17].

Несмотря на доброкачественный характер КГС и, как правило, медленно прогрессирующее течение, прогноз для зрительных функций всегда остается серьезным. Увеличение размера опухоли сопровождается усилением ее экссудативной активности и возникновением таких осложнений, как макулярный отек, отложение твердого экссудата в макуле, формирование эпиретинальных мембран, развитие экссудативной и/или тракционной отслойки сетчатки, гемофтальма, образованием суб- и эпиретинальных кровоизлияний, что может привести к необратимой потере зрения и инвалидизации [18, 19]. Поэтому своевременная диагностика и адекватное лечение КГС является сложной и важной проблемой [20–22].

При довольно частой встречаемости КГС у пациентов с синдромом Гиппеля — Линдау ее молекулярная генетика в настоящее время является наименее изученной по сравнению с другими системными проявлениями заболевания. Так, в литературе представлены результаты немногочисленных исследований, изучавших связь между типом или расположением мутаций в гене *VHL* и распространенностью КГС, а также возникающими осложнениями [3, 10, 23–25]. Нередко полученные результаты имели противоречивый характер. Поэтому накопление знаний об особенностях спектра мутаций в гене *VHL* и их ассоциации с клиническими фенотипами необходимо для прогнозирования характера течения КГС, своевременной диагностики заболевания и выбора тактики лечения, что позволит избежать необратимой потери зрения.

В связи с этим **ЦЕЛЬЮ** настоящей работы явился анализ взаимосвязи мутаций и полиморфных вариантов гена *VHL* с клиническими характеристиками КГС.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 29 пациентов (44 глаза) с КГС, из них 25 неродственных пациентов (13 женщин и 12 мужчин) и 4 близнеца (2 сестры и 2 брата) в возрасте от 10 до 53 лет (средний возраст — $25,4 \pm 10,2$ года). На момент исследования диагноз «болезнь Гиппеля — Линдау» был верифицирован в 14 (55,2 %) случаях. Системные проявления заболевания у пациентов включали гемангиобластомы мозжечка — 11 (37,9 %) случаев, гемангиобластомы спинного мозга — 5 (17,3 %), феохромоцитомы — 3 (10,3 %), карциномы почек — 5 (17,3 %), кист поджелудочной железы — 6 (20,7 %) и кист почек —

6 (20,7 %) случаев. Частота онкологических заболеваний в семейном анамнезе пациентов составила 41,4 % ($n = 12$).

Всем пациентам проведено стандартное офтальмологическое обследование, включающее визометрию (без коррекции, с максимальной коррекцией), тонометрию, периметрию, биомикроскопию глазного дна. Кроме того, использовались дополнительные специальные методы исследования: флюоресцентная ангиография глазного дна, оптическая когерентная томография, ультразвуковое В-сканирование.

Острота зрения с коррекцией составляла в среднем $0,6 \pm 0,4$ и варьировала от 0,01 до 1,0. Монокулярный характер поражения установлен у 13 (44,8 %) пациентов, бинокулярный — у 16 (55,2 %). Всего в 44 глазах выявлено 124 опухоли. По локализации выделяли опухоли, расположенные на средней периферии сетчатки ($n = 34$, 27,4 %), на крайней периферии сетчатки ($n = 79$, 63,7 %), а также капиллярные гемангиомы юкстапапиллярной локализации ($n = 11$, 8,9 %), куда были включены образования, расположенные на зрительном нерве или в прилегающей к нему сетчатке.

Осложнения КГС экссудативного характера в виде отслойки сетчатки выявлены в 29 (65,9 %) глазах. При этом по распространенности выделяли локальную отслойку сетчатки в области опухоли ($n = 15$, 34,1 %), распространенную отслойку сетчатки ($n = 8$, 18,8 %), субтотальную ($n = 2$, 4,5 %) и тотальную отслойку сетчатки ($n = 3$, 6,8 %). Из экссудативных осложнений в 25 (56,8 %) глазах определяли также отложение твердого экссудата и в 18 (41 %) глазах — макулярный отек. Кроме экссудативных проявлений капиллярной гемангиомы в 25 (56,8 %) глазах имелись признаки глиальной пролиферации в виде эпиретинального фиброза над опухолью с тракцией сетчатки, а также в 21 (47,7 %) глазу — макулярной эпиретинальной мембраны. Геморрагические осложнения в виде кровоизлияний в зоне капиллярной гемангиомы или частичного гемофтальма встречались в 11 (25 %) глазах.

Из исследования были исключены пациенты с терминальной стадией заболевания, характеризующейся развитием тотальной отслойки сетчатки, катаракты, вторичной глаукомы, что не позволяло адекватно оценить состояние глазного дна.

Материалом для исследования служила геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови с помощью протеинкиназы К с последующей фенольно-хлороформной экстракцией и осаждением этанолом. Для анализа мутаций и полиморфных маркеров гена *VHL* был использован метод анализа кривых плавления с высокой разрешающей способностью (HRM). В работе использовали набор qPCRmix-HS SYBR, предназначенный для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с интеркалирующим красителем *SYBR*

Green I, в соответствии с протоколом производителя («Евроген», Россия). ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1x qPCRmix-HS SYBR, по 0,4 мкМ каждого праймера (табл. 1), 50–100 нг ДНК матрицы; в 96-луночных планшетах Optical Reaction Plate на амплификаторе BioRad CFX96 qPCR System (Bio-Rad, США) по следующей программе:

- предварительная денатурация: 1 цикл, 95 °С, 5 мин;
- ПЦР: 40 циклов (95 °С — 30 с; 58 °С — 30 с; 72 °С — 30 с).

Плавление продуктов амплификации проводили в диапазоне 55–95 °С с увеличением температуры на 0,2 °С каждые 10 с. Обработку полученных данных проводили в программной среде Precision Melt Analysis Software (Bio-Rad). Примеры анализа кривых плавления приведены на рисунке 2.

Статистический анализ выполняли с использованием точного критерия Фишера и учетом его значимости. Вероятность появления определенного исхода в зависимости от генотипа оценивали с помощью показателя относительного риска (RR) с оценкой 95 % доверительного интервала (CI). Критический уровень статистической значимости (p)

принимался равным 0,05. Рассматривались также результаты статистически маргинально значимые ($0,05 < p \leq 0,1$), что соответствует доверительному интервалу 90 %, в отличие от стандартного доверительного интервала при $p = 0,05$. Расчеты выполнялись с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе молекулярно-генетического исследования у 24 (82,7 %) из 29 пациентов выявлены наследуемые миссенс-мутации гена *VHL* в гомо- и гетерозиготном состояниях. Как видно из результатов, представленных в таблице 2, мутации в гене *VHL* в 3-м экзоне (Tyr156) выявлялись у 13 (44,8 %) пациентов, в экзоне 1 (Ser111) — у 10 (34,5 %) пациентов, в экзоне 1 (Pro25) — у 9 (31 %) пациентов, в экзоне 3 (Arg167) — у 6 (20,7 %) пациентов, в экзоне 1 (Pro86) — у 4 (13,8 %) пациентов, экзоне 2 — у 4 (13,8 %) пациентов и в экзоне 3 (Arg200) — у 3 пациентов. Из всего количества выявленных мутаций гомозиготный генотип *Leu/Leu* выявлен только в одном случае в экзоне 3 (Arg167). В 6 (20,7 %) случаях искомым мутаций ни в одном из исследуемых локусов не было найдено.

Таблица 1. Характеристика праймеров, условий и продуктов ПЦР
Table 1. Characteristics of primers, conditions and PCR products

№	SNP	Положение в гене Position in gene	Структура праймеров The structure of the primers	Длина продукта, п. н. / аллель Product length, bp / allele
			полиморфные маркеры polymorphic markers	
1	rs.779808	Intron 2	808_F: GCTCATTGCAACATCTGCCACCT	290
			808_R: GGCGACAGATCCAGACTCCAACCTC	
2	rs.779805	5'UTP	805_F: AGTGGAATACAGTAACGAGTTGGCCTAG	282
			805_R: CTACCTCGGCCTCGTCCCAGTT	
3	rs.1678607	Intron 2	607_F: ATGTTGACGGACAGCCTATTTTTC	170
			607_R: GGATACAAAAGATTGGATAACGTGCC	
4	rs.1642742	3'UTP	742_F: GTTTAGGGGCAAACATCACAAAATGTAA	181
			742_R: TGCCAATGCCTTCTTAAAATTAACGA	
5	rs.17610448	3'UTP	448_F: CTGCCCATAGAGAAGTATTT	290
			448_R: AATCCCACTGAATTACGTATA	
Наследуемые мутации Hereditary mutations				
1	rs.28940298	Exon 3	F-13287: GCAAAGCCTCTTGTTTCGTTCCCTTG	208
			R-13287: CGCTCCAGGTCTTCTGACATTT	
2	rs.397516441	Exon 3	F-13156: GCCATCAGCATAACACACTGCCAC	170
			R-13156: GAGTATACACTGGAAGGGCAAAAACCAA	
3	rs.5030820	Exon 3	F-13188: CCATCAGCATAACACACTGCCACATAC	211
			R-13188: CTTGACTAGGCTCCGGACAACCTG	
4	rs.35460768	Exon 1	F-5287: CGCGAAGACTACGGAGGTCGAC	184
			R-5287: TTCAGGGCCGTACTCTTCGACG	
5	rs.398123481	Exon 1	F-5469: GAGGCAGGCGTCGAAGAGTACG	218
			R-5469: CCATACGGGCAGCACGACG	
6	rs.869025631	Exon 1	F-5545: AGGAGGCAGGCGTCGAAGAGTAC	299
			R-5545: CGTACCTCGGTAGCTGTGGATGC	
7	rs.104893830	Exon 2	F-9927: CCACCACCTGGCTAATTTTTTTGTA	242
			R-9927: TTAACCAGAAGCCCATCGTGTGTC	

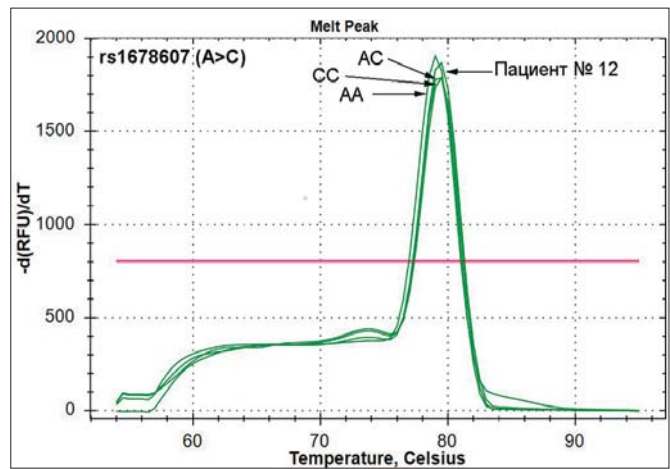
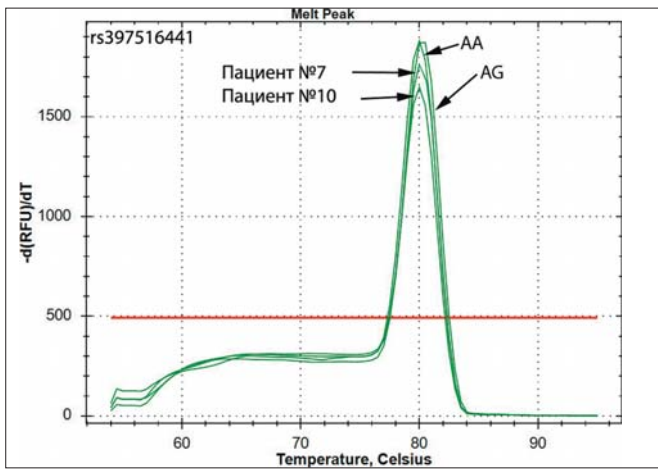


Рис. 2. Кривые плавления для разных вариантов генотипа, регистрируемые при определении мутации Y156C (rs197516441) (А) и полиморфного варианта rs1678607 (Б) гена *VHL*

Fig. 2. Melting curves for different genotype variants which were noted in determining the mutation Y156C (rs197516441) (A) and polymorphic variant rs1678607 (B) of *VHL* gene

Таблица 2. Результаты исследования наследуемых мутаций гена *VHL* у больных с капиллярной гемангиомой сетчатки

Table 2. Results of the study of inherited *VHL* gene mutations in patients with retinal capillary hemangioma

№ случая Number of cases	Наследуемые мутации гена <i>VHL</i> Hereditary mutations of the <i>VHL</i> gene						
	<i>Arg200Trp</i>	<i>Tyr156Cys</i>	<i>Arg167Gly</i>	<i>Ser111Ile</i>	<i>Pro25Leu</i>	<i>Pro86Ser</i>	<i>Val130Leu</i>
1	—	—	—	<i>Ser/Ile</i>	<i>Pro/Leu</i>	—	<i>Val/Leu</i>
2	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	<i>Val/Leu</i>
6	—	<i>Tyr/Cys</i>	—	—	—	—	<i>Val/Leu</i>
7	—	—	—	—	—	—	—
8	<i>Arg/Trp</i>	<i>Tyr/Cys</i>	<i>Arg/Gly</i>	—	—	—	—
9	—	<i>Tyr/Cys</i>	<i>Val/Leu</i>	—	—	—	—
10	—	—	<i>Val/Leu</i>	—	—	<i>Pro/Ser</i>	—
11	—	<i>Tyr/Cys</i>	—	—	<i>Pro/Leu</i>	—	—
12	—	—	—	—	—	—	—
13	—	<i>Tyr/Cys</i>	—	<i>Ser/Ile</i>	<i>Pro/Leu</i>	—	—
14	—	<i>Tyr/Cys</i>	—	<i>Ser/Ile</i>	<i>Pro/Leu</i>	—	—
15	—	<i>Tyr/Cys</i>	—	<i>Ser/Ile</i>	—	—	—
16	—	<i>Tyr/Cys</i>	—	—	<i>Pro/Leu</i>	—	—
17	—	—	—	<i>Ser/Ile</i>	—	—	—
18	—	—	—	<i>Ser/Ile</i>	<i>Pro/Leu</i>	—	—
19	—	<i>Tyr/Cys</i>	—	<i>Ser/Ile</i>	—	—	—
20	—	<i>Tyr/Cys</i>	—	<i>Ser/Ile</i>	—	—	—
21	—	<i>Tyr/Cys</i>	—	—	<i>Pro/Leu</i>	—	—
22	—	—	—	—	<i>Pro/Leu</i>	<i>Pro/Ser</i>	<i>Val/Leu</i>
23	<i>Arg/Trp</i>	—	—	—	—	—	—
24	—	—	<i>Val/Leu</i>	—	<i>Pro/Leu</i>	—	—
25	—	<i>Tyr/Cys</i>	<i>Val/Leu</i>	—	—	—	—
26	—	—	—	—	—	—	—
27	—	—	—	<i>Ser/Ile</i>	—	<i>Pro/Ser</i>	—
28	—	<i>Tyr/Cys</i>	—	<i>Ser/Ile</i>	—	<i>Pro/Ser</i>	—
29	<i>Arg/Trp</i>	—	<i>Leu/Leu</i>	—	—	—	—

Примечание. Прочерк — мутаций не обнаружено.

Note. Dash — mutations were not detected.

По данным литературы, большинство точечных мутаций гена *VHL* приводят к нарушению регуляции активности HIF либо путем невозможности формирования комплекса E3-убиквитинлигазы, либо за счет ухудшения способности связывания pVHL с HIF- α [26]. Согласно классификации, миссенс-мутации чаще выявляются при *VHL* — синдроме типа 2, для которого прежде всего характерно развитие феохромоцитомы, а также других проявлений заболевания, включая КГС [10, 17].

Практически все немногочисленные исследования, рассматривающие гено-фенотипические корреляции у больных с КГС и мутациями гена *VHL*, были основаны на попытках классифицировать клинические проявления опухоли на основании их связи с определенным типом мутации. Например, в исследовании N. Haddad и соавт. [6] показано, что полная делеция гена *VHL* коррелировала с более низкой частотой развития гемангиобластом сетчатки и более высокой остротой зрения по сравнению с пациентами, несущими миссенс- или транкирующие мутации. Кроме того, миссенс-мутации связаны с большей частотой юстапапиллярных поражений [6]. H. Dollfus и соавт. [10] подтвердили, что большее количество связанных с синдромом Гиппеля — Линдау КГС наблюдается у пациентов с миссенс-мутациями по сравнению с теми, у которых имелись транкирующие мутации. Однако они не обнаружили существенной связи определенного генотипа с количеством гемангиобластом и остротой зрения [10].

В другом исследовании было показано, что положение миссенс-мутаций в α -домене pVHL ассоциировалось с большей распространенностью гемангиобластом сетчатки и зрительного нерва, чем в β -домене. Напротив, мутации в β -домене ассоциированы с более высокой распространенностью КГС, расположенных на периферии глазного дна. Статистически значимой ассоциации между расположением миссенс-мутации и монокулярным или бинокулярным характером поражения не установлено [24].

При анализе системных проявлений синдрома Гиппеля — Линдау A. Webster и соавт. [3] подтвердили, что у пациентов с КГС чаще встречались гемангиобластомы центральной нервной системы и почечно-клеточный рак, что не было выявлено в другом исследовании [10].

В нашей работе оценивались ассоциации между наследуемыми мутациями гена *VHL* и такими клиническими параметрами опухоли, как локализация, вовлечение парного глаза, количество образований, наличие отслойки сетчатки, признаков фиброглиальной пролиферации, макулярного отека, геморрагических осложнений, отложения твердого экссудата и отягощенного семейного анамнеза. Кроме того, рассматривали ассоциации КГС с другими системными проявлениями синдрома Гиппеля — Линдау. При этом удалось выявить статистически значимую

ассоциацию частоты мутации тирозина в 156-м положении гена *VHL* с локализацией капиллярной гемангиомы на средней периферии глазного дна ($p = 0,02$; RR = 1,86, 95 % CI = 1,11–3,1), а также наличием локальной экссудативной отслойки сетчатки в зоне локализации опухоли ($p = 0,002$; RR = 2,95, 95 % CI = 1,4–6,21) и фиброглиальной пролиферации над образованием с тракцией сетчатки ($p = 0,02$; RR = 1,6, 95 % CI = 1,1–2,34). Установлена также ассоциация частоты мутации аргинина в 200-м положении гена с наличием у пациентов гемангиобластом мозжечка ($p = 0,08$; RR = 2,6, 95 % CI = 1,59–4,23) и спинного мозга ($p = 0,07$; RR = 5,78, 95 % CI = 1,53–21,88). Однако данную взаимосвязь следует интерпретировать с осторожностью, поскольку известно, что мутация *Arg200Trp* является уникальной в силу того, что она не связана с развитием опухолей, а в гомозиготном состоянии ассоциируется с возникновением чувашской полицитемии. Это наследственное заболевание характеризуется высоким уровнем гемоглобина, повышенным уровнем эритропоэтина в плазме, варикозным расширением вен, гемангиомами позвоночника и повышенной сывороточной концентрацией фактора роста эндотелия сосудов [27]. Несмотря на это, в литературе встречаются сведения о случаях полицитемии, связанной с гетерозиготной мутацией *Arg200Trp* [28, 29]. Таким образом, фенотипическое проявление гетерозиготной мутации до конца не изучено. Возможно, данная мутация в результате нарушения регулирования активности HIF- α и усиления экспрессии генов, индуцируемых гипоксией, также может ассоциироваться с развитием опухолей при синдроме Гиппеля — Линдау. Исследование с участием большой группы пациентов сможет достоверно подтвердить или опровергнуть связь между этим генотипом и фенотипом.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов гена *VHL* среди пациентов с КГС представлено в таблице 3. При исследовании ассоциаций представленных генотипов полиморфных маркеров с клиническими проявлениями КГС выявлена достоверно значимая ассоциация генотипа GA полиморфного маркера rs779805 гена *VHL* с локализацией опухоли на средней периферии глазного дна ($p = 0,03$; RR = 4,8, 95 % CI = 1,19–19,3).

Исследование С. Lv и соавт. [30], в котором изучали взаимосвязь почечно-клеточного рака с полиморфизмом rs779805 гена *VHL*, показало, что частота аллеля G в группе больных ($n = 80$) с почечно-клеточным раком составила 55,6 %, а в контрольной группе ($n = 81$) здоровых индивидов — 41,2 %, таким образом, встречаемость аллеля G в группе больных достоверно в 1,3 раза выше ($p = 0,01$ OR = 1,78 (CI 1,14–2,77)). Установлено также, что генотип GG, по-видимому, является фактором риска развития почечно-клеточного рака (OR = 2,90 CI = 1,22–6,87) [30]. В нашем исследовании частота аллеля G у больных с КГС составляла 72,4 %, что в 1,8 раза выше, чем

Таблица 3. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов гена *VHL* среди больных с капиллярной гемангиомой сетчатки

Table 3. Allele frequency and genotype distribution of polymorphic loci of *VHL* gene among patients with retinal capillary hemangioma

Полиморфный вариант Polymorphic variant	Аллель/генотип Allele/genotype		Частота Frequency n = 29
rs779805(G/A)	Аллель Allele	G	0,724
		A	0,276
	Генотип Genotype	GG	0,551
		GA	0,345
		AA	0,103
rs779808(C/T)	Аллель Allele	C	0,586
		T	0,414
	Генотип Genotype	CC	0,310
		CT	0,552
		TT	0,138
rs1642742(C/T)	Аллель Allele	C	0,552
		T	0,448
	Генотип Genotype	CC	0,310
		CT	0,483
		TT	0,207
rs1678607(A/C)	Аллель Allele	A	0,483
		C	0,517
	Генотип Genotype	AA	0,241
		AC	0,483
		CC	0,276
rs17610448(T/G)	Аллель Allele	T	0,742
		G	0,276
	Генотип Genotype	TT	0,586
		TG	0,276
		GG	0,138

Примечание. n — число больных.

Note. n — number of patients.

в контрольной группе ($p = 0,01$). Частота генотипа GG более чем в 2,9 раза превосходила таковую в группе здоровых индивидов (55,1 % против 18,7 %, $p = 1,0 \times 10^{-6}$).

Таким образом, можно предположить, что наличие аллеля G является неблагоприятным фактором не только при развитии рака почки, но и при возникновении КГС.

В случае локализации КГС на крайней периферии глазного дна в верхнем височном квадранте обнаружена тенденция к повышению частоты выявления генотипа CT (80 %, 12 из 15 случаев) полиморфного маркера rs779808 по сравнению с частотой генотипа CC (20 %, 3 из 15 случаев) ($p = 0,09$; RR = 2,25, 95 % CI = 0,86–5,91). При генотипе TT в 100 % случаев опухоли также были обнаружены в верхнем височном квадранте. Таким образом, аллель T может ассоциироваться с наиболее типичной, по данным литературы, локализацией КГС [26].

При наличии геморрагических осложнений КГС в виде гемофтальма или кровоизлияний в зоне локализации опухоли частота гетерозиготного генотипа AC полиморфного маркера rs1678607 составляла 90 % (9 из 10 случаев) в сравнении с частотой генотипа AA ($p = 0,06$; RR = 4,5, 95 % CI = 0,7–28,9). Частота гомозиготного генотипа TT полиморфного маркера rs1642742 в группе пациентов с гемангиобластомами мозжечка в 4 раза превышала таковую для генотипа CC (80 %, 4 из 5 случаев) против 20 % (1 из 5 случаев) ($p = 0,09$; RR = 6,0, 95 % CI = 0,7–41,4).

Таким образом, выявленные тенденции могут указывать на возможную вовлеченность данных полиморфизмов гена *VHL* в различные варианты клинического течения КГС, а также в формирование системных проявлений болезни Гиппеля — Линдау. Для выявления достоверной ассоциации рассмотренных полиморфизмов необходимо увеличение когорты исследуемых больных и ее сравнение с сопоставимой группой здоровых индивидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе изучено распределение частот встречаемости мутаций и распределение частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров гена *VHL*, а также их связь с клиническими характеристиками КГС. Полученные результаты могут иметь значение для определения влияния мутаций и полиморфизмов гена *VHL* на формирование и клиническое течение гемангиобластом сетчатки. Необходимо проведение дальнейших генетических и клинических исследований на большей когорте пациентов. Это позволит подтвердить или опровергнуть наличие гено-фенотипических корреляций, что имеет большое значение для ранней диагностики болезни Гиппеля — Линдау, прогнозирования ее развития и течения глазных проявлений, а также вероятности возникновения системных поражений.

Литература/References

1. Wang H., Zhuang Z., Chan C.C. Hemangioblast: origin of hemangioblastoma in von Hippel — Lindau (VHL) syndrome. *Oncoscience*. 2018; 5 (7–8): 212–3. doi: 10.18632/oncoscience.447
2. Vortmeyer A.O., Chan C.-C., Chew E.Y., et al. Morphologic and genetic analysis of retinal angioma associated with massive gliosis in a patient with von Hippel — Lindau disease. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1999; 237: 513–7. <https://doi.org/10.1007/s004170050>
3. Webster A.R., Maher E.R., Moore A.T. Clinical characteristics of ocular angiomatosis in von Hippel-Lindau disease and correlation with germline mutation. *Arch. Ophthalmol.* 1999; 117 (3): 371–8. doi:10.1001/archophth.117.3.371
4. Singh A.D., Nouri M., Shields C.L., et al. Treatment of retinal capillary hemangioma. *Ophthalmology*. 2002; 109: 1799–806. [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420\(02\)01177-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420(02)01177-6)
5. Neumann H.P., Eggert H.R., Weigel K., et al. Hemangioblastomas of the central nervous system. A 10-year study with special reference to von Hippel — Lindau syndrome. *J. Neurosurg.* 1989; 70 (1): 24–30. doi: 10.3171/jns.1989.70.1.0024
6. Haddad N.M., Cavallerano J.D., Silva P.S. Von Hippel — Lindau disease: a genetic and clinical review. *Semin. Ophthalmol.* 2013; 28 (5–6): 377–86. doi:10.3109/08820538.2013.825281
7. Neumann H.P., Lips C.J., Hsia Y.E., Zbar B. Von Hippel — Lindau syndrome. *Brain Pathol.* 1995; 5: 181–93.
8. Maddock I.R., Moran A., Maher E.R., et al. A genetic register for von Hippel — Lindau disease. *J. Med. Genet.* 1996; 33: 120–7. doi:10.1136/jmg.33.2.120
9. Neumann H.P., Wiestler O.D. Clustering of features of von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus. *Lancet*. 1991; 337 (8749): 1052–54. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91705-Y](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91705-Y)
10. Dollfus H., Massin P., Taupin P., et al. Retinal hemangioblastoma in von Hippel — Lindau disease: a clinical and molecular study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002; 43: 3067–74. PMID:12202531
11. Knudson A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1971; 68 (4): 820–3.
12. Maher E.R., Yates J.R., Ferguson-Smith M.A. Statistical analysis of the two-stage mutation model in von Hippel — Lindau disease, and in sporadic cerebellar haemangioblastoma and renal cell carcinoma. *J. Med. Genet.* 1990; 27: 311–4. <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.27.5.311>
13. Chang J.H., Spraul C.W., Lynn M.L., Drack A., Grossniklaus H.E. The two-stage mutation model in retinal hemangioblastoma. *Ophthalmic Genet.* 1998; 19 (3): 123–30. <https://doi.org/10.1076/opge.19.3.123.2185>
14. Nordstrom-O'Brien M., van der Luijt R.B., van Rooijen E., et al. Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. *Hum. Mutat.* 2010; 31 (5): 521–37. doi: 10.1002/humu.21219
15. Gallou C., Chauveau D., Richard S., et al. Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau families with renal lesions. *Hum. Mutat.* 2004; 24 (3): 215–24. doi: 10.1002/humu.20082
16. Ruiz-Llorente S., Bravo J., Cebrián A., et al. Genetic characterization and structural analysis of VHL Spanish families to define genotype-phenotype correlations. *Hum. Mutat.* 2004; 23 (2): 160–9. doi: 10.1002/humu.10309
17. Chan C.C., Collins A.B., Chew E.Y. Molecular pathology of eyes with von Hippel-Lindau (VHL) Disease: a review. *Retina*. 2007; 27 (1): 1–7. <https://dx.doi.org/10.1097%2F01.iae.0000244659.62202.ee>
18. Lonser R.R., Glenn G.M., Walther M., et al. von Hippel — Lindau disease. *Lancet*. 2003; 361 (9374): 2059–67. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13643-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13643-4)
19. Suh C.S., Jin S.Y., Bae S.H., Kim C.G., Kim J.W. Retinal capillary hemangioma treated with verteporfin photodynamic therapy and intravitreal triamcinolone acetonide. *Korean J. Ophthalmol.* 2007; 21 (3): 178–84. <https://doi.org/10.3341/kjo.2007.21.3.178>
20. Нероев В.В., Саакян С.В., Илюхин П.А. и др. Роль брахитерапии в лечении капиллярных гемангиом сетчатки. *Российский офтальмологический журнал*. 2018; 11 (3): 5–10. <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2018-11-3-5-10>
Neroev V.V., Saakyan S.V., Ilyukhin P.A., et al. Role of brachytherapy in treatment of retinal capillary hemangiomas. *Russian ophthalmological journal*. 2018; 11(3): 5–10 (in Russian). <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2018-11-3-5-10>
21. Нероев В.В., Илюхин П.А., Рябина М.В., Новикова А.Ю. Клинический случай хирургического лечения болезни Гиппеля — Линдау, осложненной отслойкой сетчатки. *Российский офтальмологический журнал*. 2018; 11 (1): 85–92. <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2018-11-1-85-92>
Neroev V.V., Ilyukhin P.A., Ryabina M.V., Novikova A.Yu. Surgical treatment of von Hippel — Lindau disease complicated by retinal detachment: a clinical case. *Russian ophthalmological journal*. 2018; 11 (1): 85–92 (in Russian). <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2018-11-1-85-92>
22. Шадричев Ф.Е., Рахманов В.В., Шклярков Е.Б., Григорьева Н.Н. Болезнь Гиппеля — Линдау. *Офтальмологические ведомости*. 2008; 1 (2): 70–6.
Shadrachev F.E., Rahmanov V.V., Shklyarov E.B., Grigor'eva N.N. Von Hippel — Lindau disease. *Oftal'mologicheskie vedomosti*. 2008; 1 (2): 70–6 (in Russian).
23. Chew E.Y. Ocular manifestations of von Hippel — Lindau disease: clinical and genetic investigations. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 2005; 103: 495–511. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajo.2006.02.011>
24. Mettu P., Agron E., Samtani S., et al. Genotype-phenotype correlation in ocular von Hippel — Lindau (VHL) disease: the effect of missense mutation position on ocular VHL phenotype. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51: 4464–70. <https://doi.org/10.1167%2Fiovs.10-5223>
25. Wong W.T., Agron E., Coleman H.R., et al. Genotype-phenotype correlation in von Hippel — Lindau disease with retinal angiomatosis. *Arch. Ophthalmol.* 2007; 125: 239–45. doi: 10.1001/archophth.125.2.239
26. Hickey M.M., Lam J.C., Bezman N.A., Rathmell W.K., Simon M.C. von Hippel — Lindau mutation in mice recapitulates Chuvash polycythemia via hypoxia-inducible factor-2 alpha signaling and splenic erythropoiesis. *J. Clin. Invest.* 2007; 117 (12): 3879–89. doi:10.1172/JCI32614
27. Perrotta S., Nobili B., Ferraro M., et al. Von Hippel — Lindau-dependent polycythemia is endemic on the island of Ischia: identification of a novel cluster. *Blood*. 2006.15; 107 (2): 514–9. doi: 10.1182/blood-2005-06-2422
28. Cario H. Childhood polycythemia/erythrocytoses: classification, diagnosis, clinical presentation, and treatment. *Ann. Hematol.* 2005; 84 (3): 137–45. doi: 10.1007/s00277-004-0985-1
29. Percy M.J., McMullin M.F., Jowitt S.N., et al. Chuvash-type congenital polycythemia in 4 families of Asian and Western European ancestry. *Blood*. 2003; 102 (3): 1097–9. doi:10.1182/blood-2002-10-3246
30. Lv C., Bai Z., Liu Z., Luo P., Zhang J. Renal cell carcinoma risk is associated with the interactions of APOE, VHL and MTHFR gene polymorphisms. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015; 8 (5): 5781–6. PMID:26191297

Поступила: 06.03.2019
Принята к печати: 10.06.2019

Для контактов: Анна Юрьевна Новикова
E-mail: ayukolesnikova@gmail.com