

<https://doi.org/10.17724/jicna.2020.216>

Заболевание с чертами синдрома Альперса и МНГИЭ, нарушением переноса фолатов в СМЖ, и необычным механизмом передачи мутаций гена POLG: описание случая

Rudolf Korinthenberg, Janbernd Kirschner, Matthias Eckenweiler, Robert Steinfeld, Nana Nino Tatishvili, Rita Horvath, Stephanie Kleinle, Angela Abicht

Рудольф Коринтенберг ([orcid](#))

rudolf.korinthenberg@uniklinik-freiburg.de (основное контактное лицо)

Отделение нейрорепедиатрии и мышечных заболеваний, Университетский медицинский центр, Кафедра медицины, Университет города Фрайбург, Германия

Янбернд Киршнер ([orcid](#))

Отделение нейрорепедиатрии, Университетская клиника Бонна, Бонн/Германия

Матиас Экенвайлер ([orcid](#))

Отделение нейрорепедиатрии и мышечных заболеваний, Университетский медицинский центр, Кафедра медицины, Университет города Фрайбург

Роберт Стейнфельд ([orcid](#))

Университетская детская больница города Цюрих, Цюрих, Швейцария

Нана Нино Татишвили ([orcid](#))

Центральная детская больница им. Иашвили, Тбилиси

Рита Хорват ([orcid](#))

Отделение клинических нейронаук, Кембриджский университет, Кембридж

Стефани Кляйнл ([orcid](#))

Медико-генетический центр (MGZ), Мюнхен

Ангела Абихт ([orcid](#))

Медико-генетический центр (MGZ), Мюнхен

Рукопись сдана: 2.11.2020, **Принята в печать:** 9.09.2021, **Опубликована:** 11.12.2021

Перевод на русский язык: Тимеев Артём Геннадьевич, Екатеринбург, 4 марта 2022 года

Аннотация

Мы сообщаем о семье, в которой у трех из пятерых детей развилось ремиттирующе-рецидивирующее заболевание с различными проявлениями, дебютировавшее развитием эпилептических приступов, комы, абдоминальных кризов, и во всех случаях приведшее к летальному исходу. У младшего сына и у одного из его скончавшихся братьев мы выявили две патологические сложные гетерозиготные мутации гена POLG. Одна из этих мутаций была унаследована от матери, а вторая не обнаруживалась в образцах крови, слюны, буккальных мазках и в волосных луковицах отца, несмотря на то, что факт отцовства был генетически подтвержден. Мы полагаем, что наличие данной мутации у отца объясняется мозаицизмом клеток зародышевой линии. Анализы содержания спинномозговой жидкости младшего брата последовательно демонстрировали очень низкую концентрацию 5-метилтетрагидрофолата (5-MTHF) и отсутствие фолатного рецептора альфа, что указывало на наличие вторичной церебральной фолатной недостаточности. Супплементация фолиниевой кислотой на протяжении 18 месяцев несколько улучшила неврологическую картину, но не смогла остановить прогрессирование заболевания на системном уровне и предотвратить гибель пациента.

Ключевые слова: ген днк-полимеразы гамма, синдром Альперса-Гуттенлохера, МНГИЭ, нарушение моторики ЖКТ, 5-MTHF в СМЖ, фолиниевая кислота

Введение

Ген POLG кодирует каталитическую альфа-субъединицу фермента ДНК-полимераза гамма, участвующего в репликации митохондриальной ДНК (мтДНК). Патогенные варианты POLG могут приводить к истощению мтДНК либо к делециям мтДНК, ассоциированным с исключительно широким спектром различных клинических фенотипов. Биаллельные патогенные варианты гена POLG обычно приводят к истощению (деплеции) мтДНК и развитию аутосомно-рецессивных заболеваний с ранним началом, таких как мультисистемное заболевание спектра миоцереброгепатопатий с ранней либо младенческой летальностью или синдром Альперса-Гуттенлохера (CAH). Эти состояния дебютируют на первом году жизни, проявляясь эпилептической энцефалопатией, миоклоническими судорогами, атаксией, гепатопатией и тяжелой регрессией нервно-психического развития [1-3]. Более мягкий фенотип ассоциирован с менее выраженными изменениями мтДНК и с более поздним дебютом симптомов – таких, как атаксия, периферическая нейропатия и эпилептические приступы у подростков и лиц раннего взрослого возраста и прогрессирующая внешняя офтальмоплегия

Описание случая:

Семейный анамнез

Нулевой пациент – младший из пятерых детей в семье родителей грузинского происхождения, не состоявших в кровном родстве. У матери не отмечалось проблем со здоровьем; отец страдал тяжелыми мигренями. У старшего сына в семье, которому в настоящий момент 29 лет, не отмечалось проблем со здоровьем. Дочь (23 года) сообщала о хронических жалобах на работу желудочно-кишечного тракта, однако у нее не отмечалось проблем неврологического характера и был здоровый трехлетний сын. У всех троих младших сиблингов с раннего детства возникли неврологические симптомы прогрессирующего характера: у сына,

(ПВО) с поздним началом и атаксия у взрослых лиц старше 40 лет [4].

В данной работе мы сообщаем о трех сиблингах, у которых развилась прогрессирующая эпилептическая энцефалопатия, вызвавшая развитие комы, абдоминальные кризы, и завершившаяся летальным исходом. В геноме детей с заболеванием мы выявили поражение гена POLG сложного гетерозиготного типа, состоящее из двух редких вариантов, которые были сочтены патологическими. Один из вариантов был, вероятно, связан с мозаицизмом клеток зародышевой линии у отца. Очень низкая концентрация 5-метилтетрагидрофолата (5-MTHF) и отсутствие фолатного рецептора альфа в СМЖ у сиблинга, прошедшего обследование в нашем центре, говорили о наличии такой патологической особенности, вносящей вклад в ухудшение состояния пациента, как вторичная недостаточность церебрального транспорта фолата. Назначение фолиниевой кислоты несколько улучшило неврологическое состояние пациента на какое-то время; вместе с тем препарат не предотвратил общего ухудшения состояния и гибели пациента.

заболевшего первым, после периода нормального развития, который продлился до пятилетнего возраста, были отмечены миоклонические подергивания правой руки, затем остановка речи и слабость в правой руке. Эти симптомы исчезли через две недели, и у него восстановился навык езды на велосипеде. Однако три месяца спустя случился второй эпизод, при котором были отмечены сильные головные боли и боли в животе. Удостоверившись в отсутствии у пациента аппендицита, а также в нормальной концентрации печеночных ферментов, его выписали из больницы. На следующий день у него была отмечена бледность и остановка речи. Через несколько

часов состояние мальчика резко ухудшилось, возникла сонливость, развилась кома; 24 часа спустя он скончался в российской больнице без установленного диагноза. В отношении этого пациента не были доступны ни изображения, полученные с помощью методов медицинского сканирования, ни данные об уровнях лактата. Второй из заболевших сыновей также развивался нормально до пятилетнего возраста. Болезнь проявилась неожиданно – потерей сознания и правосторонним гемипарезом; МРТ головы не выявило отклонений. Второй эпизод случился в возрасте семи лет: на фоне неспецифической пневмонии мальчик временно потерял сознание и на время лишился зрения. Из-за подозрения на эпилептическую активность ему назначили карбамазепин, однако его электроэнцефалограмма, как сообщается, не содержала отклонений. На МРТ-снимках отмечались неспецифические билатеральные изменения белого вещества

в затылочной области. Третий эпизод случился в возрасте 10 лет. После неспецифического заболевания у пациента развился фокальный конвульсивный эпилептический статус (эпилепсия парциальная непрерывная) с отклонением головы и взгляда вправо и подергиванием мышц правой половины лица, сопровождавшийся левосторонней фокальной спайковой и медленноволновой активностью. Анализ образцов крови, в том числе на концентрацию печеночных ферментов, не выявил отклонений. На МРТ-снимках не было выявлено изменений. После длительной анестезии тиопенталом в грузинской больнице пациент был в сознании и контактен на протяжении трех суток. После этого произошло резкое драматическое ухудшение состояния, приведшее в течение 10 часов к смерти мальчика ввиду повторявшегося эпилептического статуса, ацидоза, анурии и остановки дыхания.

Нулевой пациент: анамнез и клинические данные

Анамнез. Третий пораженный болезнью сын родился после протекавшей нормально беременности. Он родился преждевременно, на 35-й неделе гестационного срока, однако более никаких отклонений отмечено не было. В младенческом возрасте он развивался нормально: впервые сел в возрасте 6 месяцев, пошел без поддержки в 14 месяцев, и произнес первые слова в 10 месяцев. Первый эпизод рвоты и болей в животе случился в возрасте 8 лет и 4 месяцев. Эти симптомы прекратились через две недели, но сохранялась некоторая слабость в мышцах. Второй эпизод случился год спустя. За дебютом в виде рвоты и боли в животе последовала остановка мочеиспускания, снижение уровня сознания, затем у пациента развилась кома, потребовавшая искусственной вентиляции на протяжении трёх недель. Результаты лабораторных анализов, осуществленных в грузинской больнице, говорили о нормальной концентрации лактата в СМЖ и трансаминаз в сыворотке крови, о чуть повышенной концентрации креатинкиназы, о наличии гипернатриемии, о сниженном уровне

свободного карнитина (1.1 мг/дл при нижней границе нормы 3.5 мг/л), и о значительном повышении ацетоацетата. После этого эпизода пациент постепенно восстановился с сохранением остаточной слабости мышц, однако не мог преодолевать пешком длинные дистанции. Будучи не в состоянии посещать школу, он получал обучение от частного преподавателя.

Клиническая картина. Будучи жителем Грузии, мальчик впервые попал на осмотр в Медицинский центр Фрайбургского университета (FUMC) в Германии в возрасте 10 лет 4 месяцев. На первом клиническом осмотре он выглядел бодро и демонстрировал адекватное взаимодействие с собеседниками. Вместе с тем формальной оценки когнитивных способностей не осуществлялось. Для своего возраста он имел недостаточные рост и вес (рост 118 см (0.1-й перцентиль), вес 16.2 кг (0.3-й перцентиль), индекс массы тела (ИМТ) 11.7 (-4.2 SDS)). Он выглядел бледным, однако в его сердечно-сосудистой системе, легких, органах брюшной полости и костной системе не отмечалось отклонений. Помимо птоза

очень слабой степени тяжести, в работе черепных нервов не наблюдалось отклонений, также не было отмечено ни офтальмоплегии, ни нистагма. Отмечалось умеренное снижение тонуса и силы мышц. Глубокие сухожильные рефлексы были в норме в верхних конечностях, но не удавалось вызвать их в нижних конечностях. Рефлекс Бабинского отсутствовал. Походка была умеренно атактической, со слегка положительным симптомом Ромберга. Стойка либо подпрыгивание на одной ноге давались лишь с поддержкой, а при тандемной походке наблюдались грубые нарушения. Мальчик демонстрировал позитивный симптом Говерса, затрачивая 25 секунд для вставания из положения лежа на спине. Пациент демонстрировал билатеральный дисдиадохокinez, но не демонстрировал отклонений в пальценосовой пробе.

Обследования специалистов. При офтальмологических исследованиях была отмечена бледность глазного дна, частично занятого аномальной пигментацией, при этом оценка движений глаз, электроретинография (ЭРГ) и периметрия не выявили отклонений. Исследование ЛОР-органов (уши, нос, горло) не выявило нарушений слуха.

Радиологические и ультразвуковые исследования. На МРТ-снимках головы, сделанных в возрасте 10 лет 4 месяцев, были видны диффузные T2-гиперинтенсивные очаги поражения глубокого белого вещества обоих полушарий, не распространяющиеся на короткие ассоциативные волокна. Также отмечалось небольшое повышение T2-взвешенного сигнала в передних областях

хвостатых ядер и в скорлупе (Рисунок 1). Диффузионно-взвешенные снимки не содержали отклонений и аномального усиления контраста. Исследование базальных ганглий методом магниторезонансной спектроскопии (MPC; PRESS-последовательность 30 мс) дало нормальную картину без повышенного пика лактата либо иных повышенных пиков. Отношения N-ацетиласпартат/креатин (NAA/Cr) и холин/креатин (Cho/Cr) были в пределах нормы. Белое вещество затылочной области не подвергали MPC-сканированию. Рентгеновское исследование левой руки выявило задержку созревания скелета (оценочно 7 лет +/- 11 месяцев при фактическом возрасте 10 лет 4 месяца) и остеопению. Ультразвуковые исследования сердца, щитовидной железы и органов брюшной полости не выявили отклонений.

Дополнительные инструментальные исследования. Спирометрия не выявила отклонений. Электроэнцефалограмма фоновой активности при бодрствовании соответствовала возрастной норме и не содержала эпилептических потенциалов или картины фокального замедления. Исследования нервной проводимости выявили диффузную сенсорно-моторную нейропатию с умеренным замедлением скорости проведения по моторным и сенсорным волокнам (mNCV, sNCV) и сниженными амплитудами (A): срединный нерв – mNCV 35 (норма [n] > 50) м/с, A 2.0 (n > 4) mV; большеберцовый нерв – mNCV 31 (n > 40) м/с, A 4.2 (n > 2) mV; срединный нерв – sNCV 39 (n > 50) м/с, A 2.5 (n > 15) mV; икроножный нерв – NCV 34 (n > 50) м/с, A 4.8 (n > 20) mV.

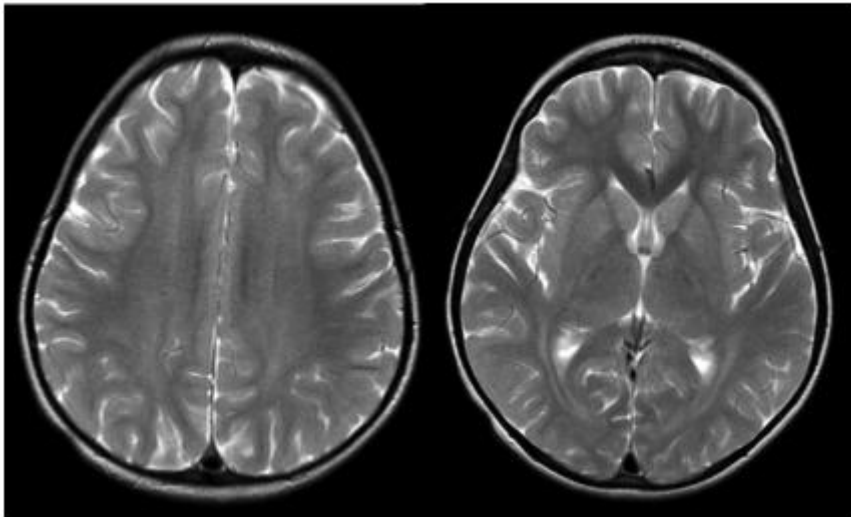


Рисунок 1. T2-взвешенные МРТ-снимки нашего нулевого пациента в возрасте 10.6 лет. На МРТ-снимках видно усиление интенсивности T2-взвешенного сигнала в белом веществе, носящее диффузный характер в полуовальном центре и в периатриумном белом веществе, при этом короткие ассоциативные волокна и зрительные лучистости не затронуты. Также наблюдается небольшое усиление T2-взвешенного сигнала в передних областях хвостатых ядер и в скорлупе.

Лабораторный анализ клинических и метаболических показателей. Следующие показатели оставались в границах нормы:

- В цельной крови (ЭДТА, гепарин, цитрат): количество эритроцитов и лейкоцитов, концентрация аммиака в плазме крови, аминокислот в плазме крови, протромбиновое время (по Квику) и частичное тромбопластиновое время (ЧТВ).

- Сыворотка: электролиты, креатинин, мочевая кислота, печеночные трансаминазы, гамма-ГТ, креатинкиназа, гормоны щитовидной железы и антитиреоидные антитела, витамины А, В1, В2, В6, Е и В12, фолиевая кислота; уровни сиалотрансферринов и панкреатической амилазы методом изоэлектрического фокусирования.

- Моча: аминокислоты и органические кислоты, D-аминолевулиновая кислота, порфобилиноген и общие порфирины.

- Кал: эластаза и антиген *Helicobacter pylori*.

- В результате анализа после 24-часового периода голодания были выявлены нормальные уровни ацилкарнитинов, нормальное повышение кетоновых тел в плазме крови, нормальные уровни лактата и аммиака, а также нормальные показатели кетоновых тел, органических кислот и аминокислот в моче.

Следующие показатели отклонялись от нормы:

- Уровень 25-ОН-витамина D2 был снижен (10.3 нг/мл, нормальный диапазон: 20-70 нг/мл), уровень костной щелочной фосфатазы повышен (62.4 мкг/л, нормальный диапазон: 6-30 мкг/л); уровень паратиреоидного гормона не измерялся.

- Исходный уровень лактата сыворотки не выходил за рамки нормы (1.1-1.6 ммоль/л); через два часа после орального приема глюкозы было отмечено аномальное повышение до 3.11 ммоль/л (здесь нижним пределом нормы служило значение после нагрузки, превышающее базальное на 20%). Повышение уровней лактата сыворотки (3.0 ммоль/л) также последовательно отмечалось при ночных приступах рвоты.

Исследования люмбальных проб СМЖ. Количество клеток, концентрация глюкозы и соотношение уровней глюкозы в крови/СМЖ, а также концентрация лактата не выходили за рамки нормы (норма < 2.5

ммоль/л). Содержание белка в СМЖ было сильно повышено и составляло 350 мг/дл (норма: < 50 мг/дл). Отмечалось нарушение гематоэнцефалического барьера, но при этом не было отмечено интратекального синтеза IgG либо олигоклональных полос. Наблюдалось незначительное повышение уровней гомованилиновой кислоты (HVA), 5-гидроксииндолуксусной кислоты, неоптерина в СМЖ, небольшое снижение уровня тетрагидробиоптерина в СМЖ, и нормальная концентрация дигидробиоптерина в СМЖ. Вместе с тем было отмечено сильное снижение уровня 5-MTHF (5 нмоль/л при норме от 64 до 182

нмоль/л), при этом повторная люмбальная пункция четыре недели спустя показала, что концентрация опустилась ниже предела определения (< 2 нмоль/л). Исследование методом Вестерн-блот выявило снижение концентрации белка фолатного рецептора альфа (FR α) (рисунок 2). Снижение концентрации 5-MTHF в СМЖ на фоне нормальной концентрации фолата в сыворотке крови и эритроцитах вкупе со сниженной экспрессией FR α - это типичные признаки первичных либо вторичных дефектов переноса фолата в СМЖ [5] (смотри раздел «обсуждение»).

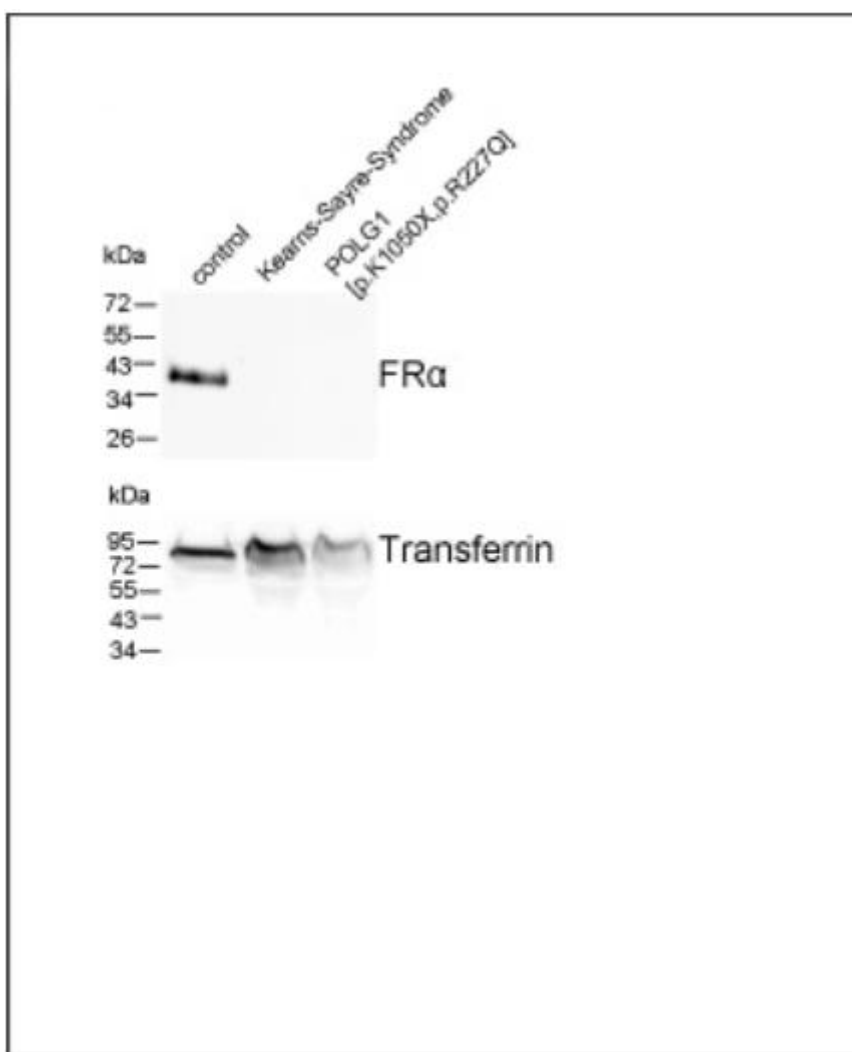


Рисунок 2. Вестерн-блот содержания фолатного рецептора альфа в СМЖ нашего пациента в сравнении с дорожками, отражающими содержание белка у здорового испытуемого и у пациента с синдромом Кернса-Сейра.

Терапия и последующее клиническое течение болезни у нулевого пациента

Мальчик проходил амбулаторное наблюдение в Медицинском центре Фрайбургского университета (FUMC) на протяжении четырех месяцев. В связи с подозрением на митохондриальное заболевание мы начали терапию с назначения 100 мг тиамина, 80 мг карнитина и 100 мг коэнзима Q10 по одному разу в день. (Позднее, ввиду настоятельной просьбы родителей, мы не стали отменять эти препараты). Мы также добавили в схему 1000 МЕ витамина D/сутки. Примерно через восемь недель, подтвердив факт нарушенного переноса фолата в СМЖ, мы добавили к схеме фолиат кальция (лейковорин) в высокой дозировке перорально (2.8 мг/кг/сутки трижды в день [tid]) и внутривенно (iv, 1 б.2 мг/кг/неделю) в согласии с рекомендациями по терапии дефектов транспорта фолата, как наследственных, так и приобретенных [5,6]. Повторная люмбальная пункция, осуществленная после четырех недель терапии лейковорином в высокой дозировке перорально (р.о.) и внутривенно, показала, что концентрация 5-МТНФ в СМЖ нормализовалась (128 нмоль/л). На протяжении нескольких недель родители отмечали повышение выносливости и силы у пациента. Мальчик приобрел способность подниматься по ступенькам без помощи рук и стал намного реже пользоваться инвалидной коляской. Он стал реже страдать болями в животе, у него улучшилось настроение. На последнем клиническом обследовании перед возвращением в Грузию (в возрасте 10 лет и 8 месяцев) было отмечено, что он вырос на 2 см и поправился на 0.8 кг. Походка отличалась широкой расстановкой ног, но уже не носила атактический характер. Ходьба на пятках и ходьба на носках давались с некоторым затруднением. Он был способен стоять на одной ноге (на левой 4-5 секунд, на правой 2-3 секунды). При тандемной ходьбе отмечалась неустойчивость, а прыжки на одной ноге не давались без поддержки.

Через несколько месяцев, уже в Грузии, боли в животе и приступы рвоты возобновились с нарастающей частотой, и

было отмечено стабильное ухудшение общего состояния мальчика. Тем не менее, в случае необходимости он все еще мог пройти несколько сот метров.

Мальчик прошел повторное обследование и получал терапию в Медицинском центре Фрайбургского университета (FUMC) через год (в возрасте 11 лет 7 месяцев). Были отмечены жалобы на боли в эпигастральной области длительностью от 10 минут до 1 часа, случающиеся ежедневно, в том числе ночью. Четыре-пять раз в неделю случались приступы рвоты с последующим улучшением самочувствия. При эзофагогастроуденоскопии была отмечена атония желудка с рефлюксом желчи из двенадцатиперстной кишки, и вторичный неспецифический гастрит; не выявлено язв либо обструкций. Была рекомендована симптоматическая терапия и дробный прием пищи малыми порциями. Контрольное МРТ-сканирование головы не выявило изменений по сравнению с предыдущим годом. Было произведено два контрольных анализа образцов люмбальной СМЖ. В первом образце, взятом после непрерывной терапии лейковорином в высокой дозировке на протяжении года (перорально и внутривенно, по вышеописанной схеме; масса тела пациента: 15.5 кг) концентрация 5-МТНФ в СМЖ оставалась в рамках нормы. По данным второго анализа, проведенного через три месяца после прекращения внутривенных инъекций на фоне продолжающегося приема лейковорина перорально в дозировке 45 мг/сутки в три приема, уровень 5-МТНФ в СМЖ оставался в пределах нормы (70.8 нмоль/л; нормальный диапазон: 64-182 нмоль/л). Исходя из этого, мы продолжили терапию лейковорином перорально в дозировке 45 мг/сутки в три приема/день; родители также настояли на продолжении терапии карнитином в дозе 80 мг и витаминами в высокой дозировке по схеме, описанной выше.

На момент последнего обследования в FUMC в возрасте 11 лет и 1 месяца создавалось впечатление о том, что

состояние здоровья мальчика несколько улучшилось. Боли в животе ослабли, но рвота с частотой один раз в сутки сохранялась. Вместе с тем наблюдалась тяжелая кахексия (рост 124 см, вес 15.5 кг) с выраженной атрофией мышц. Мышечная сила, по-видимому, сохранялась в достаточном объеме для такого состояния; не было выявлено парезов. Наблюдалась небольшая слабость лицевых мышц и птоз, однако отсутствовало поражение иных черепных нервов, не отмечалось нистагма. Отмечалась неустойчивость походки, положительный симптом Ромберга. Пациент уже не мог стоять и прыгать на одной ноге, даже с поддержкой. Тонус мышц казался слегка сниженным, однако глубокие сухожильные рефлексы удавалось вызвать без проблем. Рефлекс Бабинского был отрицательным.

По возвращении в Грузию было отмечено быстрое ухудшение состояния, несмотря на продолжавшуюся терапию. Начиная с 12 лет и 3 месяцев пациент неоднократно поступал в местную больницу с рвотой и нарушением двигательной функции кишечника. Осуществлять энтеральное питание было уже невозможно, и пациент был переведен на парентеральное питание. Состояние осложнилось рекуррентными инфекциями, дыхательной недостаточностью с множественными легочными абсцессами, септическим шоком, анурией и переводом пациента на диализ. Гепатопатии на тот момент времени не наблюдалось. Развитие болезни завершилось смертью мальчика в возрасте 12 лет 6 месяцев; с 10-летнего возраста и до момента смерти у него не отмечалось эпилептических приступов либо эпизодов с потерей реакции на раздражители.

Биопсия мышечной ткани и генетические исследования

Биопсия мышечной ткани. В образце ткани латеральной широкой мышцы бедра, взятом в ходе биопсии у нулевого пациента, при анализе под оптическим микроскопом (окраска гематоксилин-эозином [HE] и трихромная окраска) были выявлены очень слабые миопатические изменения. Гистохимическая окраска выявила повышенное число циклооксигеназа-негативных / сукцинатдегидрогеназа-позитивных волокон, а также выраженное внутриклеточное накопление мелких липидных капель (окраска Oil Red O). Не было обнаружено нейрогенных изменений, воспалительных инфильтратов либо повышенного накопления гликогена.

Исследование активности комплексов дыхательной цепи осуществляли на гомогенате скелетных мышц по описанной в литературе методике [7]. Была выявлена нормальная активность комплексов I-III, но активность комплекса IV была чуть ниже нормы (103.1 Ед/гНКБ; границы нормы: 112-351; 1.07 с нормализацией по цитратсинтазе; границы нормы: 1.1-5.0).

Материал для генетических исследований. Нам удалось изучить

мышечную ДНК нулевого пациента, равно как и ДНК, выделенную из образцов периферической крови нулевого пациента, его здорового брата, и их родителей. Сухая капля крови, взятая у одного из скончавшихся сиблингов пациента, послужила дополнительным источником ДНК при рассмотрении его случая. Дополнительно к этому мы изучили отцовскую ДНК, извлеченную из образцов крови, слюны, буккального мазка и волосных луковиц. Сестра отказалась от проведения генетического анализа в отношении себя и своего сына.

ДНК мышечной ткани. По данным полуколичественного анализа методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (qPCR)[8], в ДНК мышечной ткани нулевого пациента было отмечено снижение числа копий мтДНК, что указывает на истощение митохондриальной ДНК (уровень мтДНК, нормализованной по ядерной ДНК, составил 20-30% по сравнению с уровнем у членов контрольной группы). Стандартный диагностический анализ с использованием ПЦР длинных фрагментов и Саузерн-блоттинга не выявил каких-либо делеций мтДНК.

Анализ гена ДНК-полимеразы гамма (POLG). В результате секвенирования методом Сэнгера всех кодирующих участков гена POLG с охватом экзон-интронных границ с использованием ДНК из образцов крови нулевого пациента было выявлено два гетерозиготных варианта, в то время как анализ методом MLPA (мультиплексная амплификация лигированных зондов) не выявил отклонений. Один из вариантов, NM_002693.2: с.680G > A p.(Arg227Gln), представляет собой миссенс-вариант, описанный недавно у трех детей младенческого возраста, страдающих синдромом истощения митохондриальной ДНК и синдромом Альперса-Гуттенлохера [9-11]. Этот вариант также присутствовал в ДНК из образца крови скончавшегося брата, но отсутствовал в образцах, взятых у родителей и у здорового брата. Данная мутация также не обнаружилась в буккальном мазке, слюне и волосных луковицах отца.

Дополнительное исследование ДНК, выделенной из крови отца, с целью обнаружения указанного варианта гена POLG методом глубокого таргетного секвенирования нового поколения (с покрытием > 2500) дало отрицательный результат. Вместе с тем факт отцовства был подтвержден наличием генетических маркеров, обнаруживающихся у обоих родителей и у нулевого пациента. Второй вариант, с.3148A > T p.Lys1050*, который также еще не был описан в научной литературе, приводит к образованию стоп-кодона; он был обнаружен у нулевого пациента и у скончавшегося брата, а также в образце крови матери, но не в образцах отца и здорового старшего брата. Это позволяет предположить наличие соматического мозаицизма, или, скорее всего, мозаицизма клеток зародышевой линии по мутации с.680G > A p.(Arg227Gln) (смотри раздел «Обсуждение»).

Обсуждение

Значение вариантов гена POLG и механизм их передачи

Ген POLG, расположенный в хромосомной позиции 15q26.1, кодирует каталитическую альфа-субъединицу фермента ДНК-полимераза гамма. Полимераза гамма, совместно с другими белками, участвует в репликации одноцепочечной митохондриальной ДНК (мтДНК). В случае биаллельности патогенные варианты могут приводить к развитию тяжелых аутосомно-рецессивных заболеваний с ранним началом, связанных с истощением митохондриальной ДНК, в то время как при гетерозиготности могут развиваться аутосомно-доминантные заболевания, связанные с множественными делециями мтДНК [1-4].

У нашего нулевого пациента мы обнаружили два гетерозиготных варианта гена POLG – миссенс-вариант с.680G > A p.(Arg227Gln) и стоп-вариант с.3148A > T p.Lys1050*. Изменение последовательности нуклеотидов с.3148A > T образует преждевременный сигнал остановки трансляции (p.Lys1050*) в гене POLG.

Поскольку этот кодон преждевременной терминации трансляции не расположен в последнем либо предпоследнем экзоне гена POLG, можно заключить, что происходит нонсенс-опосредованный распад мРНК – процесс, который должен приводить к потере белкового продукта. Вариант с.3148A > T p.Lys1050* отсутствует в популяционных базах данных (база данных ExAC: «нет данных о частоте») и клинических базах данных (ClinVar). В соответствии с руководством ACMG он был определен как патогенный (класс 5: коды степени доказательности PVS1, PM2, PM3, PP3). Миссенс-вариант p.Arg227Gln является результатом замены G на A в нуклеотидной позиции 680. Эта нуклеотидная замена отсутствует в популяционных базах данных (ExAC: «нет данных о частоте»). Однако порождаемая ею смена аминокислоты, аргинина на глутамин, в кодоне 227 – в позиции, в которой наблюдается межвидовая консервативность – представлена в клинических базах данных (ClinVar), где она описана как патогенная

замена, выявленная в составе составных гетерозиготных мутаций у нескольких лиц с POLG-ассоциированными заболеваниями. Алгоритмы биоинформационного анализа предсказывают, что миссенс-замена может сказаться на структуре и функции белка (SIFT: «разрушительное воздействие»; PolyPhen-2: «предположительно повреждающее»). На основании этой информации вариант был классифицирован как патогенный (класс 5: коды степени доказательности: PS1, PM2, PM3, PP1, PP2, PP4) в соответствии с руководством ACMG [12]. В пользу патогенности обоих вариантов также говорит то, что мышечная биопсия нулевого пациента выявила истощение мтДНК.

Сегрегационный анализ семьи (рисунок 3) подтверждает патогенность мутации, демонстрируя, что и нулевой пациент, и один из заболевших сиблингов являются носителями гетерозиготных вариантов. Образцы ДНК третьего заболевшего брата отсутствовали. Здоровый брат не был носителем какого-либо из двух вариантов. Было обнаружено, что здоровая мать является гетерозиготным носителем одного из вариантов (с.3148A > T p.Lys1050*), что согласуется с аутосомно-рецессивным характером наследования. В то же время вариант с.680G > A p.(Arg227Gln) не обнаружился в образце крови отца. Сравнение генетических маркеров, обнаруживающихся у обоих родителей и у нулевого пациента, позволяло подтвердить факт отцовства.

В процессе исследования на факт возможного наличия соматического мозаицизма у отца по варианту с.680G > A p.(Arg227Gln) были проанализированы дополнительные типы тканей (буккальный мазок, слюна, волосьяные луковицы) с помощью таргетного секвенирования по Сэнгеру, однако поиск не дал результата. Поскольку для секвенирования по Сэнгеру характерен предел обнаружения от 10% до 20% [13], возможно, что для обнаружения слабовыраженного мозаицизма годятся лишь более чувствительные методы. Распространенность его может быть выше, чем предполагалось ранее, так как при глубоком секвенировании образцов ДНК родителей, дети которых имели

генетические de novo-варианты, которые приводят к эпилептической энцефалопатии, в 5-6% случаев обнаруживался слабовыраженный соматический мозаицизм, выраженность которого составляла от 1 до 10% [14, 15]. Однако, поскольку у отца нашего пациента результаты глубокого секвенирования оказались отрицательными, мы предполагаем скорее, что источником стала мутация в клетках зародышевой линии. При заболеваниях с аутосомно-доминантным и X-сцепленным типом наследования хорошо известны случаи, когда из-за мутаций клеток зародышевой линии болезнь развивается у детей в отсутствие очевидного носительства той же мутации родителями. Вместе с тем при аутосомно-рецессивных заболеваниях случаи соматического мозаицизма или мозаицизма клеток зародышевой линии описывались редко [16,17].

Обсуждение факта множественности фенотипов в рамках семьи. Известно, что патогенные варианты гена POLG могут порождать различные фенотипы. У детей раннего младенческого возраста, страдающих истощением мтДНК, раньше других проявляются заболевания спектра миocerebroгепатопатий, они же обладают самым тяжелым фенотипом. За ними следует синдром Альперса-Гуттенлохера, приводящий к смерти пациента к концу первой декады жизни [1-4, 18]. Напротив, заболевания, ассоциированные с делециями мтДНК, такие как синдром MEMSA («миоклоническая эпилепсия, миопатия и сенсорная атаксия»), заболевания спектра атаксии-нейропатии (ANS, SANDO), аутосомно-рецессивная и аутосомно-доминантная прогрессирующая внешняя офтальмоплегия (arCPEO, adCPEO), дебютируют в более старшем возрасте [4]. Важно отметить серьезную степень пересечения между этими фенотипами, большинство из которых было описано до того, как было установлено единство их генетического происхождения. У пациентов с синдромом Альперса-Гуттенлохера и пациентов-носителей патогенных вариантов гена POLG дополнительно отмечались следующие симптомы и признаки: плохое прибавление в весе, синдром Лея с дистонией и патологией базальных ганглиев

и ствола мозга, приступы мигрени; инсультоподобные эпизоды с изменениями на МРТ-снимках либо без них (подобные эпизодам при синдроме MELAS); панкреатит и нарушение моторики ЖКТ с псевдо-обструкцией (подобные состоянию при митохондриальной нейрогастроинтестинальной энцефалопатии, MNGIE) [1-4]. Tang et al. в ходе пересмотра клинических данных

выявили четырех пациентов с MNGIE-подобной картиной болезни в когорте из 92 пациентов-носителей вариаций гена POLG; возраст пациентов на момент постановки диагноза составлял 15, 25, 46 и 50 лет. POLG-ассоциированное состояние MNGIE можно отличить от типичного TYMP-ассоциированного состояния MNGIE по отсутствию лейкоэнцефалопатии в ЦНС [19].

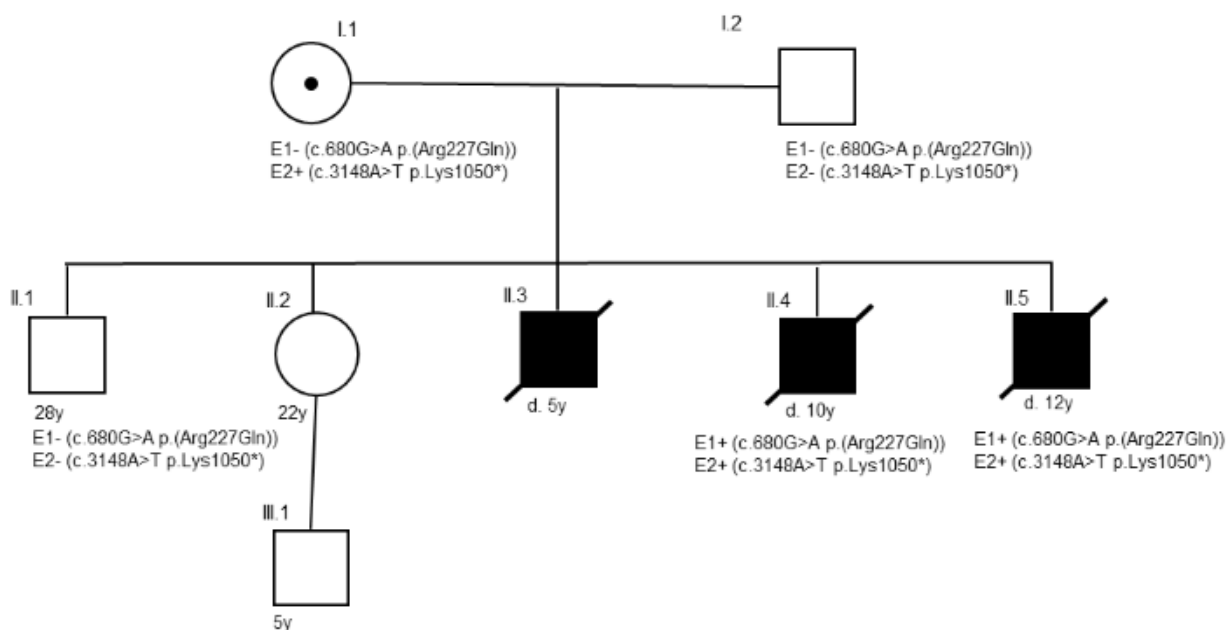


Рисунок 3. Генеалогическое древо рассматриваемой семьи с указанием выявленных мутаций гена POLG.

Несколько таких синдромов и симптомов были выявлены в описываемой нами семье, однако при этом были отмечены значительные различия между заболевшими братьями. Общей чертой был рецидивирующий, повторяющийся характер возникновения неврологических и системных симптомов. Набор симптомов у старших братьев, включающий рецидивирующую парциальную непрерывную эпилепсию и энцефалопатию, можно вполне классифицировать как болезнь Альперса; как и у нулевого пациента, у них не была поражена печень [1-4, 18]. Периодически возникающие эпизоды с развитием комы либо гемипареза представляются нам инсультоподобными эпизодами, несмотря на крайне неспецифические изменения на МРТ-снимках. У нашего нулевого пациента,

однако, плохой набор веса и жалобы на работу ЖКТ преобладали в клинической картине, наряду с небольшой умственной отсталостью, легкой атаксией и полинейропатией. На ранней стадии заболевания он перенес тяжелый инсультоподобный эпизод при нормальной картине на снимках МРТ, однако у него никогда не отмечалось эпилептических приступов либо эпилептических потенциалов при ЭЭГ-исследовании. Далее в картине заболевания преобладали усиливающиеся боли в животе, рвота и нарушение моторики желудочно-кишечного тракта с последующими осложнениями. Следовательно, наиболее подходящим клиническим диагнозом для нашего нулевого пациента будет диагноз POLG-ассоциированного синдрома MNGIE.

Значение и механизм истощения запасов фолата в СМЖ, обсуждение терапии

Активированный фолат является важным кофактором реакции биосинтеза нуклеиновых кислот, одноуглеродного метаболизма и аминокислотного метаболизма, и тем самым играет незаменимую роль в пролиферации клеток и регенерации клеток крови, а также в метаболизме и работе ЦНС. Снижение концентрации 5-MTHF в СМЖ может происходить из-за нехватки фолата в диете либо из-за наследственной мальабсорбции фолата (например, при наличии патогенных вариантов в гене SLC46A1); при обоих состояниях отмечается сниженная концентрация фолата в сыворотке крови, эритроцитах и СМЖ. Однако снижение уровней 5-MTHF в СМЖ может также быть последствием нарушенного переноса через гематоэнцефалический барьер, при сохранении нормальной концентрации фолата в сыворотке крови и эритроцитах. В литературе описан возникающий у детей раннего возраста прогрессирующий неврологический синдром, при котором наличие антител к фолатному рецептору приводит к снижению концентрации 5-MTHF в СМЖ [20]. Steinfeld et al. первыми описали генетический синдром, вызываемый патогенными вариациями в гене «фолатный рецептор 1» (FOLR1), при котором развивается недостаточность фолатного рецептора альфа (FRa). У пациентов отмечались прогрессирующее нарушение двигательных функций, психомоторная регрессия, атаксия и миоклоническая эпилепсия. На МРТ-снимках отмечалась тяжелая гипомиелинизация, а MRS-исследование указывало на истощение холина и инозитола в белом веществе мозга [6]. Та же группа продемонстрировала, что перенос фолата сквозь гематоэнцефалический барьер происходит в ходе транцитоза, в котором участвует фолатный рецептор альфа. FRa располагается как на базолатеральной поверхности, так и на апикальной щеточной каемке эпителиальных клеток сосудистого сплетения. Доставка 5-MTHF в паренхиму мозга осуществляется экзосомами, внутри которых содержатся молекулы 5-MTHF,

связанные с рецепторами FRa. Данные связки молекул пересекают цитозольное пространство эпителиальных клеток сосудистого сплетения в направлении от базолатеральной мембраны к апикальной, после чего высвобождаются в ликвор через апикальную щеточную каемку на поверхности клеток. Это позволяет предположить, что секреция с рецептором FRa является основным путем проникновения фолата в мозг [5,21,22].

Как в случаях «аутоиммунного», так и в случаях генетического развития патологии неврологические показатели и показатели развития улучшались при получении пациентом перорально и внутривенно больших доз фолиниевой кислоты – активированной формы фолата, не нуждающейся в транспортере. В случаях генетически-обусловленной недостаточности FOLR1 (фолатного рецептора альфа) при назначении фолиниевой кислоты в дозировке 0.5-7 мг/кг/сутки у пациентов, по данным литературы, отмечается снижение частоты эпилептических приступов, наблюдаются положительные изменения на снимках мозга и нормализация уровней 5-MTHF в СМЖ, хотя выраженность терапевтического ответа варьирует в зависимости от длительности симптоматического периода и своевременности назначения терапии [5].

Причиной вторичной недостаточности 5-MTHF в СМЖ при митохондриальных заболеваниях является недостаточная активность FRa, вызванная дисфункцией митохондрий в эпителии сосудистого сплетения – клетки эпителия являются местом локализации транспортных везикул, содержащих FRa (смотри выше). То, что при синдроме Кернса-Сейра наблюдается снижение концентрации фолата в СМЖ, было известно с 1980-х годов, еще до обнаружения делеций мтДНК, вызывающих заболевание [23]. Hasselmann et al. сообщали о девочке в возрасте трех с половиной лет, страдавшей синдромом Альперса в сочетании с выраженной недостаточностью

5-MTHF в СМЖ и повышенными воспалительными маркерами в СМЖ на фоне повышенных титров антител к фолатному рецептору [24]. Ребенок скончался через два года из-за развития заболевания, однако назначение фолиевой кислоты в высокой дозировке позволило купировать эпилептический статус и улучшило неврологические функции. Группа Grapp et al. [22] не только продемонстрировала отсутствие FRa в СМЖ у пациентов с биаллельными вариантами гена FOLR1; исследователи также показали наличие корреляции между снижением концентрации FRa и снижением концентрации 5-MTHF в СМЖ у пациентов с синдромом Кернса-Сейра (рисунок 2). Tanji et al. посмертно исследовали ткани мозга двух пациентов с синдромом Кернса-Сейра, и описали уникальную онкоцитарную трансформацию эпителия сосудистого сплетения. Они постулировали, что причиной этих отклонений является накопление аномальной мтДНК, поврежденной делециями. Такое накопление может нарушать целостность сосудистого сплетения, приводя тем самым к поражению гематоэнцефалического барьера, сопровождающемуся потерей FRa, предположительно из-за ослабления шаттлинга (обращения) экзосом, что приводит к сниженным уровням 5-MTHF и повышению уровней белка в

Заключение

Патогенные варианты в гене POLG могут приводить к развитию необычайно широкого спектра неврологических и иных симптомов, нередко с отсутствием гепатопатии и лактатацидоза. При такой картине мы рекомендуем осуществлять анализ гена POLG на ранней стадии болезни. В рассматриваемой семье мы подозреваем наличие генного варианта в клетках

Благодарности

В связи с письменным согласием родителей на публикацию клинической и генетической информации дополнительного одобрения комитета по этике не требуется.

Конфликт интересов

Автор(ы) сообщают об отсутствии конфликта интересов.

спинномозговой жидкости [23]. Повышение концентрации белка в СМЖ было выявлено у 70% пациентов с POLG-ассоциированными эпилепсиями, при этом уровень белка в СМЖ коррелировал с тяжестью клинического течения болезни [25].

Наш пациент с POLG-ассоциированным заболеванием, судя по всему, представляет собой еще один пример потери экспрессии FRa в спинномозговой жидкости из-за дисфункции митохондрий. Невозможно сказать, какие из его симптомов были вызваны митохондриопатией, а какие – вторичной фолатной недостаточностью. Вместе с тем симптоматика этих двух состояний пересекается. Следовательно, нарушенный перенос фолата мог усугубить потерю нервных функций пациента. Он получал фолиевую кислоту в высокой дозировке перорально и внутривенно на протяжении более 18 месяцев. Факт частичной реверсии неврологической симптоматики на фоне приема фолиевой кислоты говорит в пользу идеи о том, что неврологические симптомы пациента были частично обусловлены церебральной фолатной недостаточностью. Вместе с тем, несмотря на объективно отмечаемое улучшение нервных функций, заболевание завершилось смертью мальчика из-за тяжелых нарушений работы ЖКТ и связанных с ними осложнений.

зародышевой линии у родителя, что наблюдается очень редко при аутосомно-рецессивных заболеваниях. Значительная недостаточность 5-MTHF в СМЖ может вносить вклад в развитие неврологических симптомов, которые можно частично обратить вспять назначением фолиевой кислоты в высокой дозировке.

Вклад авторов

Все авторы внесли значительный вклад в разработку концепции и схемы исследования, в получение информации, анализ и интерпретацию данных; все были вовлечены в написание рукописи, критический пересмотр для получения важного научного содержания; все одобрили окончательное утверждение версии, предназначенной для публикации.

Настоящая статья является статьей с открытым доступом, распространяемой согласно с положениями и условиями лицензии Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), позволяющей неограниченно использовать, распространять и воспроизводить материал с использованием любого носителя при условии включения надлежащей ссылки на оригинальный материал. На данные, приведенные в настоящей статье, распространяется заявление об отказе от авторских прав (Creative Commons Public Domain Dedication, доступно по адресу <http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>), если не указано иное.

Формат цитирования статьи:

Korinthenberg R. et al. (2020). Alpers- and MNGIE-like disease with disturbed CSF folate transport and an unusual mode of genetic transmission of POLG mutations: a case report. Journal of the International Child Neurology Association, 20(216). <https://doi.org/10.17724/jicna.2020.216>

Литература

1. Hikmat O, Tzoulis C, Chong WK, Chentouf L, Klingenberg C, Fratter C, et al. The clinical spectrum and natural history of early-onset diseases due to DNA polymerase gamma mutations. *Genetics in Medicine*. 2017;19(11):1217–1225. [PubMed](#)
2. Rahman S, Copeland WC. POLG-related disorders and their neurological manifestations. *Nature Reviews Neurology*. 2018;15(1):40–52. [PubMed](#)
3. Chinnery PF, Zeviani M. 155th ENMC workshop: Polymerase gamma and disorders of mitochondrial DNA synthesis, 21–23 September 2007, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders*. 2008;18(3):259–267. [PubMed](#)
4. Hikmat O, Naess K, Engvall M, Klingenberg C, Rasmussen M, Tallaksen CM, et al. Simplifying the clinical classification of polymerase gamma (POLG) disease based on age of onset; studies using a cohort of 155 cases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2020;43(4):726–736. [PubMed](#)
5. Pope S, Artuch R, Heales S, Rahman S. Cerebral folate deficiency: Analytical tests and differential diagnosis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2019;42(4):655–672. [PubMed](#)
6. Steinfeld R, Grapp M, Kraetzner R, Dreha-Kulaczewski S, Helms G, Dechent P, et al. Folate Receptor Alpha Defect Causes Cerebral Folate Transport Deficiency: A Treatable Neurodegenerative Disorder Associated with Disturbed Myelin Metabolism. *The American Journal of Human Genetics*. 2009;85(3):354–363. [PubMed](#)
7. Gempel K, Topaloglu H, Talim B, Schneider P, Schoser BGH, Hans VH, et al. The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETF DH) gene. *Brain*. 2007;130(8):2037–2044. [PubMed](#)
8. Bulst S, Abicht A, Holinski-Feder E, Muller-Ziermann S, Koehler U, Thirion C, et al. In vitro supplementation with dAMP/dGMP leads to partial restoration of mtDNA levels in mitochondrial depletion syndromes. *Human Molecular Genetics*. 2009;18(9):1590–1599. [PubMed](#)
9. Aljabri MF, Kamal NM, Halabi A, Korbi H, Alsayyali MMA, Alzahrani YA. Lethal neonatal mitochondrial phenotype caused by a novel polymerase subunit gamma mutation. *Medicine*. 2018;97(40):e12591. [PubMed](#)
10. Dai L FF, Liu Z SD, C D, J L, X R, H W. Phenotype and genotype of twelve Chinese children with mitochondrial DNA depletion syndromes. *Chin J Pediatr*. 2019;57(3):211–216. [PubMed](#)
11. Han XD, Fang F, Li H, Liu ZM, Shi YQ, Wang JL, et al. Clinical and genetic characteristics of 62 children with mitochondrial epilepsy. *Chin J Pediatr*. 2019;57(11):844–85. [PubMed](#)
12. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and

- Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. 2015;17(5):405–423. [PubMed](#)
13. Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, et al. Comparison of Sanger Sequencing, Pyrosequencing, and Melting Curve Analysis for the Detection of KRAS Mutations. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2010;12(4):425–432. [PubMed](#)
 14. de Lange IM, Koudijs MJ, van 't Slot R, Sonsma ACM, Mulder F, Carbo EC, et al. Assessment of parental mosaicism in SCN1A-related epilepsy by single-molecule molecular inversion probes and next-generation sequencing. *Journal of Medical Genetics*. 2018;56(2):75–80. [PubMed](#)
 15. Møller RS, Liebmann N, Larsen LHG, Stiller M, Hentschel J, Kako N, et al. Parental mosaicism in epilepsies due to alleged de novo variants. *Epilepsia*. 2019. [PubMed](#)
 16. Anazi S, Al-Sabban E, Alkuraya FS. Gonadal mosaicism as a rare cause of autosomal recessive inheritance. *Clinical Genetics*. 2013;85(3):278–281. [PubMed](#)
 17. Velho RV, Alegria T, Sperb F, Ludwig NF, Saraiva-Pereira ML, Matte U, et al. A de novo or germline mutation in a family with Mucopolysaccharidosis III gamma: Implications for molecular diagnosis and genetic counseling. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. 2014;1:98–102. [PubMed](#)
 18. Wolf NI, Rahman S, Schmitt B, Taanman JW, Duncan AJ, Harting I, et al. Status epilepticus in children with Alpers' disease caused by POLG1 mutations: EEG and MRI features. *Epilepsia*. 2009;50(6):1596–1607. [PubMed](#)
 19. Tang S, Dimberg EL, Milone M, Wong LJC. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE)-like phenotype: an expanded clinical spectrum of POLG1 mutations. *Journal of Neurology*. 2011;259(5):862–868. [PubMed](#)
 20. Ramaekers VT, Rothenberg SP, Sequeira JM, Opladen T, Blau N, Quadros EV, et al. Autoantibodies to Folate Receptors in the Cerebral Folate Deficiency Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(19):1985–1991. [PubMed](#)
 21. Grapp M, Just IA, Linnankivi T, Wolf P, Lücke T, Häusler M, et al. Molecular characterization of folate receptor 1 mutations delineates cerebral folate transport deficiency. *Brain*. 2012;135(7):2022–2031. [PubMed](#)
 22. Grapp M, Wrede A, Schweizer M, Hüwel S, Galla HJ, Snaidero N, et al. Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma. *Nature Communications*. 2013;4(1). [PubMed](#)
 23. Tanji K, Schon EA, DiMauro S, Bonilla E. Kearns–Sayre syndrome: oncocytic transformation of choroid plexus epithelium. *Journal of the Neurological Sciences*. 2000;178(1):29–36. [PubMed](#)
 24. Hasselmann O, Blau N, Ramaekers VT, Quadros EV, Sequeira JM, Weissert M. Cerebral folate deficiency and CNS inflammatory markers in Alpers disease. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2010;99(1):58–61. [PubMed](#)
 25. Hikmat O, Naess K, Engvall M, Klingenberg C, Rasmussen M, Tallaksen CME, et al. Elevated cerebrospinal fluid protein in POLG-related epilepsy: Diagnostic and prognostic implications. *Epilepsia*. 2018;59(8):1595–1602. [PubMed](#)