

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ

ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА И ПАТОЛОГИЯ

Проблемы эволюционной медицины

Сборник научных трудов

Выпуск 10



Томск – 2014

УДК 575:616 – 056.7 – 092
ББК 28.704 + 52.5
Г340

Редакционный совет:

д-р биол. наук, профессор **В.А. Степанов** (главный редактор)
д-р биол. наук, профессор **А.Н. Кучер**
д-р биол. наук **И.Н. Лебедев**
д-р мед. наук, профессор **Л.П. Назаренко**
академик РАН, профессор **В.П. Пузырёв**
канд. мед. наук **А.А. Рудко**
канд. биол. наук **И.Ю. Хитринская**

*Проведение конференции поддержано грантом
Российского фонда фундаментальных исследований № 14-04-20158.*

Г340 **Генетика** человека и патология. Проблемы эволюционной медицины: сборник научных трудов / под ред. В.А. Степанова. Вып. 10. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2014. – 234 с.

ISBN 978-5-94476-304-4

Сборник приурочен к проведению X научной конференции НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск) «Генетика человека и патология». Десятая конференция посвящена проблемам эволюционной медицины – нового направления биомедицины, рассматривающего соотношение здоровье – болезнь в эволюционном контексте. Сборник включает статьи и тезисы статей участников конференции в области общих проблем эволюционной медицины, популяционной и эволюционной генетики человека, генетики многофакторных болезней и сложнаследуемых состояний, медицинской и клинической генетики, медико-генетического консультирования. Предназначен для научных работников, преподавателей, врачей, аспирантов и студентов, работающих в области генетики человека и медицинской генетики.

УДК 575:616 – 056.7 – 092
ББК 28.704 + 52.5

Научное издание

ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА И ПАТОЛОГИЯ
Проблемы эволюционной медицины

Сборник научных трудов

Выпуск 10

Ответственный за выпуск **Е.Е. Степанова**
Корректор **Е.В. Литвинова**
Технический редактор **О.А. Турчинович**
Компьютерная верстка **О.А. Турчинович**
Оригинал-макет издательства «Печатная мануфактура»

Лицензия ИД № 03931 от 07.02.2001. Подписано в печать 02.10.2014. Формат 60×84¹/₈. Печать офсетная. Бумага ВХИ. Гарнитура «Arial». Печ. л. 29,25. Усл. печ. л. 27,21. Уч.-изд. л. 37,39. Тираж 200 экз. Заказ № 435.

ООО «Печатная мануфактура».
634055, г. Томск, а/я 3967.
Тел./факс: 8 (382-2) 49-31-19, тел. 8 (382-2) 49-00-74.
E-mail: pechat@tomsk.ru

ISBN 978-5-94476-304-4

© НИИ медицинской генетики СО РАМН, 2014
© ООО «Печатная мануфактура», макет, 2014

ПРЕДИСЛОВИЕ

Конференция «Генетика человека и патология» проходит в этом году в десятый раз. За 30 с лишним лет, что прошли со времени проведения первой конференции, это, как принято говорить, научное мероприятие обрело признание в качестве одного из важнейших событий в изучении генетики человека и медицинской генетики в России. Раз в несколько лет в Томск съезжаются ведущие генетики страны, врачи, специалисты медико-генетических служб, талантливые молодые ученые, представители отечественных и зарубежных компаний, производящих и продающих оборудование и материалы для генетических и молекулярных исследований. Наша конференция заслужила статус значимого научного форума высоким качеством докладов и материалов, актуальностью тематик. Материалы конференции, опубликованные в сборниках, активно цитируются в научной литературе, используются в практике клинической генетики и медико-генетического консультирования. Уверен, что и юбилейный, 10-й выпуск сборника не разочарует читателей.

Для нас, для института, очередная конференция – повод для того, чтобы подвести итоги нашей работы за последние годы, подумать над новыми направлениями и горизонтами, повод оглянуться назад, с тем чтобы затем увереннее двигаться вперед. За время, прошедшее с предыдущей, IX конференции, несмотря на очередные попытки реформирования российской науки, наш институт продолжал развиваться и укрепляться. Мы выполняем значительный круг научных тематик по государственному заданию, по грантам РФФИ и госконтрактам федеральных целевых программ, международным проектам. Институт вновь подтвердил свой статус ведущей научной школы. Успешно для нас прошел и первый опыт участия в конкурсах недавно созданного Российского научного фонда. У нас по-прежнему активно работают единственная в России генетическая клиника, научно-образовательный центр, центр коллективного пользования «Медицинская геномика». В институте внедрены новые передовые технологии, включая масс-спектрометрический анализ ДНК, генотипирование на высокоплотных микроматрицах ДНК, секвенирование следующего поколения, клеточные технологии. Укрепили мы и традиционно тесное сотрудничество с другими НИУ и вузами, совместно работая в рамках таких структур, как кафедра медицинской генетики Сибирского государственного медицинского университета и недавно созданная лаборатория онтогенетики человека в Национальном исследовательском Томском государственном университете.

Логика развития науки, эволюция ее конкретных направлений, прогресс в технологиях получения и обработки научной информации требуют постоянной смены и корректировки фокуса научных исследова-

ний как отдельных научных коллективов – групп, лабораторий, институтов, так и всего научного сообщества. И мы, как и все наши коллеги-генетики, находимся в постоянном движении и поиске. Нынешняя конференция «Генетика человека и патология» – тематическая. Она посвящена проблемам эволюционной медицины – нового направления биомедицины, рассматривающего соотношение здоровье – болезнь в эволюционной перспективе.

Что такое эволюционная медицина? Это подход к изучению механизмов и распространенности болезней в эволюционном контексте, который постепенно складывается в новое формирующееся направление на стыке генетики человека и эволюционной биологии. В литературе присутствуют различные определения эволюционной медицины, но все они содержательно близки и при этом довольно широки. Один из основоположников этого направления Стивен Стёрнс в редакторской статье к первому выпуску журнала *Evolution, Medicine, and Public Health* пишет: «Подобно физике и химии, эволюция – фундаментальная наука, которая проникает в медицину и позволяет получить объяснение всему, с чем мы в ней сталкиваемся. Эволюционная (или дарвиновская) медицина тем самым включает любую область, где эволюционная мысль проливает свет на медицинские и эпидемиологические проблемы». То есть эволюционная медицина – попытка понимания механизмов возникновения и развития болезней, связи генетического разнообразия с болезнями в рамках современной теории эволюции и концепций эволюционной биологии. Эволюционная медицина – один из концептуальных подходов к анализу и осмыслению информации, генерируемой современными «омными» технологиями – полногеномным секвенированием, транскриптомикой, эпигеномикой.

Наряду с общими вопросами эволюционной медицины в рамках X конференции и на страницах этого сборника рассматриваются и смежные с ней проблемы – происхождение современного человека, палеогенетика и палеоантропология; эволюционная и популяционная генетика человека; генетика многофакторных болезней; проблемы клинической генетики и медико-генетического консультирования.

Искренне надеюсь, что материалы этого сборника послужат поводом для плодотворных дискуссий, еще одним камнем в строительстве бесконечной пирамиды знаний, стимулом для дальнейших поисков и очередным, пусть трудным и небольшим, шагом к познанию природы. Ведь в этом и заключается предназначение науки.

*Доктор биологических наук,
профессор
В.А. Степанов*

ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ СО РАМН

В.А. Степанов, Л.П. Назаренко, А.А. Рудко, В.П. Пузырёв

НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

Научно-исследовательский институт медицинской генетики СО РАМН (НИИМГ) является единственным в азиатской части страны научным учреждением меду-генетического профиля. Уникальность института базируется на передовых исследованиях и разработках мирового уровня, ориентированных на практическое внедрение в оказание медицинской помощи населению Сибири и Дальнего Востока; на сочетании фундаментальных и прикладных исследований; современной передовой технологической базе; тесной интеграции научных исследований с образовательным процессом; наличии полной цепочки (от исследования фундаментальных основ явления до трансляции в клиническую медицину), обеспечиваемой инфраструктурой НИИ (научные лаборатории – базовые кафедры и лаборатории вузов – генетическая клиника – инновационные предприятия).

Научно-исследовательская, образовательная и инновационная деятельность

Научно-исследовательская работа

Основными направлениями НИР института являются изучение структурно-функциональной организации генома человека, эпигенетических механизмов реализации наследственной информации в живых системах, молекулярно-цитогенетических основ онтогенеза человека; изучение генетического разнообразия популяций человека, структуры и эволюции генофонда народонаселения, закономерностей формирования генетического груза популяций; исследование генетических основ подверженности к мультифакторным заболеваниям, разработка и внедрение новых методов генодиагностики и лечения наследственной патологии.

Исследования выполняются в рамках *приоритетного направления* «Науки о жизни» и *критических технологий* «Биомедицинские и ветеринарные технологии», «Геномные, протеомные и постгеномные технологии», «Клеточные технологии», «Технологии снижения потерь от социально значимых заболеваний».

Фундаментальными предметными областями НИР института являются генетика, геномика, фундаментальная медицина, персонафицированная медицина, эпидемиология социально значимых заболеваний и орфанных болезней. *Области прикладного использования результатов НИР* – молекулярная диагностика (включая дородовую и преимплантационную), снижение потерь от заболеваний, повышение качества жизни населения, криминалистика и судебная медицина, арктическая медицина.

Среди *наиболее значимых фундаментальных разработок* НИИ можно назвать выявление структуры генофонда населения России и сопредельных стран; разработку концепции синтропных генов и болезней; выявление роли эпигенетических механизмов модификации генетической информации в наследственной патологии человека. Исследования в этих областях, выполненные в НИИМГ, являются пионерными в России и в мире.

Примеры *наиболее интересных и значимых прикладных разработок* – технологии и тест-системы для генетического тестирования ряда социально значимых заболеваний; технологии молекулярно-цитогенетической диагностики тонких хромосомных нарушений; технологии преимплантационной диагностики хромосомных болезней; тест-системы и базы данных для ДНК-идентификации в криминалистике и судебной медицине.

НИИМГ обладает передовой *материально-технической базой*, включающей самое современное оборудование, соответствующее высоким международным стандартам и позволяющее проводить исследования на базе наиболее передовых технологий в генетике, геномике и постгеномных отраслях. Среди *передовых технологий*, имеющихся в НИИМГ, можно назвать секвенирование нового поколения (NGS); молекулярную цитогенетику; клеточные технологии, включая работу с одной клеткой; высокоплотные биочипы; масс-спектрометрию; полногеномное гентипирование, транскриптомику, эпигенетику. НИИМГ обладает крупнейшим **банком биологического материала**, включающим более 20 тыс. образцов ДНК от представителей более чем 100 популяций народов России и ближнего зарубежья, коллекции ДНК от больных наследственными, сердечно-сосудистыми, иммуноаллергическими, нейропсихиатрическими заболеваниями и от соответствующих контрольных групп.

Высокая конкурентоспособность исследований НИИМГ на российском и мировом уровне подтверждена *многочисленными российскими и зарубежными грантами*. За последние годы НИИМГ участвовал в трех крупных фундаментальных научных консорциумах, финансируемых грантами 7-й рамочной программы Евросоюза (FP7), – GABRIEL, CHERISH и ADAMS; выполнял двусторонние НИР с такими странами, как Австралия, Индия, США, Казахстан. В НИИМГ выполнялись и выполняются десятки исследований по госконтрактам в рамках ФЦП «Исследования и разработки...» и ФЦП «Кадры...», десятки грантов РФФИ, гранты Президента РФ, Российского научного фонда (РНФ). Институт является участником платформы «Медицина будущего», участником российской программы «Протеом челове-

ка». Коллектив НИИМГ неоднократно подтверждал статус ведущей научной школы, выполнял проекты в рамках поддержки научно-образовательных центров (НОЦ). Общая доля грантового финансирования НИР в НИИМГ за последние 5 лет составляет около 60%. По этому показателю и числу грантовых и госконтрактных исследований НИИМГ является лидером среди всех учреждений СО РАМН.

Еще одним подтверждением актуальности и значимости исследований института является **высокая публикационная активность и уровень цитируемости работ**. Работы сотрудников НИИМГ регулярно публикуются в ведущих международных журналах системы Web of Sciences с высокими импакт-факторами, например в New England Journal of Medicine (IF = 51,6), American Journal of Human Genetics (IF = 11,2), Alzheimer's and Dementia (IF = 14,4), Molecular Biology and Evolution (IF = 8,8), PLoS pathogens (IF = 8,4), European Journal of Human Genetics (IF = 4,3), Fertility and Sterility (IF = 4,1) и др. По показателям цитируемости (число цитирований, индекс Хирша) ведущие ученые НИИМГ находятся в топе российских исследователей в области наук о жизни. Индекс Хирша НИИМГ, по данным РИНЦ, составляет 18.

Исследования НИИМГ проводятся в **тесной кооперации с мировым научным сообществом и российской наукой**. Почти половина всех публикаций (47%) выполнена в соавторстве с коллективами других учреждений, в том числе около 10% – с участием зарубежных авторов. Около 40% всех цитирований НИИМГ приходится на цитирование из зарубежных журналов. Ученые НИИМГ регулярно выступают с устными и приглашенными докладами на крупнейших международных научных форумах (например, на Европейской конференции по генетике человека, Международной конференции по геному человека, конференции по вариативности генома, конференции Европейского общества репродукции человека и эмбриологии и др.) и российских съездах (съездах ВОГиС, ПОМГ, конференции BGRS, конференции «Молекулярная диагностика» и др.). Институт с 1989 г. является организатором регулярной всероссийской научной конференции с международным участием «Генетика человека и патология».

Клиническая деятельность

С 1993 г. (приказ МЗ РФ № 316 от 30.12.1993) ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН является **федеральным центром медико-генетической службы** по Сибирскому и Дальневосточному федеральному округам.

В 1994 г. была основана **генетическая клиника** как отдельное подразделение института. В настоящее время генетическая клиника института – это первое и единственное за Уралом специализированное лечебно-профилактическое учреждение, организующее медицинскую помощь пациентам с наследственными и врожденными заболеваниями с целью диагностики, лечения, реабилитации больных и профилактики наследственной патологии. В структуру клиники входят **консультативно-диагностическое отделение**, где осуществляется амбулаторный прием пациентов; **клинико-диагностическая лаборатория**, занимающаяся проведением специальных биохимических, цитогенетических, молекулярно-генетических и других исследований с целью выяв-

ления и дифференциальной диагностики различных наследственных патологий; стационарное **отделение наследственных болезней** на 50 коек, где ежегодно получают специализированную, в том числе высокотехнологичную, диагностическую и лечебную помощь более 800 пациентов с наследственными заболеваниями и врожденными пороками развития.

Работа клиники института как федерального экспертного центра медико-генетической службы осуществляется в соответствии с поставленными задачами: консультирование сложных случаев патологии; подтверждающая цитогенетическая, биохимическая и молекулярно-генетическая диагностика сложных и редких случаев наследственных болезней; апробация новых методов диагностики, лечения и реабилитации наследственных заболеваний; подготовка и повышение квалификации специалистов медико-генетических учреждений, в том числе путем организации стажировки на рабочем месте; осуществление контроля качества работы медико-генетических учреждений. Ежегодно в центре проводится консультация 2 600–3 000 семей по вопросам прогноза генетического здоровья и уточнения диагноза, включая пренатальную диагностику болезней плода. На территории Сибири **пренатальная диагностика моногенной патологии** с помощью молекулярно-генетических методов проводится только в федеральном центре. До 30% всего объема специализированной помощи институт оказывает жителям Уральского, Сибирского и Дальневосточного федеральных округов.

С 2006 г. институт участвует в выполнении государственного задания по оказанию **высокотехнологичной медицинской помощи** по профилю «педиатрия». Около 50% квот направляется на лечение муковисцидоза, 30% – на лечение нервно-мышечных и нейродегенеративных заболеваний; 50% квот используется пациентами, проживающими за пределами Томской области (в регионах Сибири и Дальнего Востока).

Для успешного выполнения поставленных задач клиника в настоящее время оснащена современным, а по ряду позиций – уникальным высокотехнологичным оборудованием мирового уровня, позволяющим проводить молекулярно-генетическую и молекулярно-цитогенетическую диагностику, селективный биохимический скрининг, в том числе с помощью масс-спектрометрии. Штат генетической клиники включает в себя 100 ставок, в том числе 31 врачебную. Среди сотрудников клиники один доктор медицинских наук, восемь кандидатов наук, два заслуженных врача РФ, более половины врачей имеют высшую квалификационную категорию.

Высокая квалификация сотрудников клиники и тесное сотрудничество с научными подразделениями института позволяют использовать весь существующий арсенал технологий как для оказания медицинской помощи пациентам на самом высоком уровне, так и для разработки и внедрения в практику новых методов диагностики наследственных заболеваний и врожденных пороков развития. Так, использование полногеномного анализатора биочипов позволило выявить наследственную этиологию многих случаев недифференцированных форм умственной отсталости, что имеет ключевое значение для эффективной пренатальной диагностики в этих

семьях. В сотрудничестве с центрами ЭКО Томской области и Красноярского края успешно апробированы и внедрены в практику методы **преимплантационной диагностики**, позволяющие производить выбор здорового эмбриона в семьях, имеющих высокий риск рождения детей с хромосомными аномалиями.

Интеграция науки и образования

НИИМГ активно участвует в **образовательной деятельности**, тесно интегрирован с вузами. На базе НИИМГ с 1998 г. существует первая за Уралом **кафедра медицинской генетики** Сибирского государственного медицинского университета (СибГМУ) (г. Томск). В Национальном исследовательском Томском государственном университете (ТГУ) создана **лаборатория онтогенетики человека** – совместная лаборатория ТГУ и НИИМГ. Сотрудники НИИМГ являются профессорами Биологического института ТГУ. Уникальность образовательной деятельности НИИМГ основана на том, что институт является базовым НИИ для образования в области генетики как в медицине, так и в биологии. На базе НИИМГ ведется подготовка аспирантов, магистров, бакалавров, ординаторов СибГМУ и ТГУ. Наличие специализированной клиники позволяет характеризовать институт как уникальную и фактически единственную на территории Сибири и Дальнего Востока учебную базу для врачей по генетике. Институт имеет аспирантуру, ординатуру, диссертационный совет, который имеет право принимать к защите кандидатские и докторские диссертации по специальности «Генетика» по отраслям «Медицина» и «Биология». Этот диссовет является одним из четырех в России, принимающим к рассмотрению работы по генетике как по биологии, так и по медицине. На базе **научно-образовательного центра и ЦКП «Медицинская геномика»**, функционирующих в НИИМГ, проводятся исследования аспирантами и сотрудниками СибГМУ, ТГУ, НИУ СО РАН. НИИМГ осуществляет постдипломную подготовку и сертификацию специалистов по медицинской генетике и лабораторной генетике; издает методические разработки; учебники и учебные пособия федерального уровня. **Вовлечение молодежи и студентов в науку** является главным направлением кадровой политики НИИМГ. Многие молодые ученые начинают свою работу в НИИ со студенческой скамьи, а иногда приходят еще школьниками. Работы многих студентов и аспирантов НИИМГ отмечены медалями и дипломами федеральных конкурсов научных разработок.

Инновационная деятельность

Уникальность НИИМГ в сфере внедрения результатов фундаментальных исследований в практику базируется на наличии внутри НИИ **полной инновационной инфраструктуры** – **всей цепочки трансляции научного результата от фундаментальной разработки до постели больного**. Эта цепочка включает научные лаборатории НИИМГ, ЦКП, единственную в России генетическую клинику, малое инновационное предприятие, созданное при институте. НИИМГ обладает своей базой для транс-

ляционной медицины, апробации медицинских технологий и лекарственных средств, имеет соответствующие лицензии. Внедрение разработок в клиническую практику осуществляется как на базе генетической клиники НИИМГ, так и в других научно-практических и лечебных учреждениях Томска и Сибирского федерального округа. Приоритет НИИМГ в области инноваций закреплен серией патентов и свидетельств о госрегистрации баз данных и программных продуктов.

Среди примеров недавних инновационных разработок можно назвать запатентованные тест-системы определения индивидуальной радиочувствительности больных злокачественными новообразованиями при лучевой терапии; способ генетической диагностики неблагоприятных исходов после острого коронарного синдрома; программу для подбора терапевтической дозы варфарина; тест-систему для ДНК-идентификации личности на основе мультиплексного анализа маркеров Y-хромосомы.

Перспективы научно-исследовательской работы и развития НИИ

Исследования НИИМГ находятся на передовых рубежах генетики человека и медицинской генетики, являющихся главной основой фундаментальной медицины, персонифицированной медицины и трансляционной медицины. Направления работы института соответствуют ключевым социальным задачам (улучшение качества жизни населения, снижение потерь от распространенных болезней, освоение Арктики, борьба с терроризмом и биобезопасность).

В рамках перспективных направлений работы НИИМГ планирует несколько **крупных проектов**, направленных на поиск фундаментальных основ для решения этих задач. Эти проекты включают:

- полногеномный анализ генофонда популяций человека для выявления генетических характеристик, обеспечивающих адаптацию к экстремальным климатогеографическим условиям среды;
- геномика и эпигеномика возрастзависимых социально значимых заболеваний;
- изучение генофондов населения регионов России и разработка биоинформационных генетических технологий для медицины и криминалистики;
- цитогеномика и эпигеномика мозга и разработка технологий молекулярной диагностики наследственных причин интеллектуальных нарушений;
- генетика нарушений ранних этапов онтогенеза и разработка передовых технологий репродуктивной медицины в области неинвазивной пренатальной и преимплантационной диагностики наследственных болезней;
- разработка новых алгоритмов диагностики орфанных заболеваний и внедрение их в общеклиническую практику медико-генетического консультирования.

Залогом успешного выполнения прорывных проектов является технологическая база НИИМГ, наличие фундаментального задела для прорывных исследований; преемственность научных направлений; подготовка молодых исследователей, преемственность кадров.

Раздел 1

ОБЩИЕ ПРОБЛЕМЫ ЭВОЛЮЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ЧЕЛОВЕКА И ПРОБЛЕМЫ ЭВОЛЮЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ

В.А. Степанов

НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

Прогресс в описании генетического разнообразия современного человека, связанный с внедрением технологий широкогеномного генотипирования и полногеномного секвенирования, привел к описанию и каталогизации десятков миллионов полиморфных вариантов генома [1, 2]. С другой стороны, идеология поиска генетической компоненты комплексных распространенных болезней человека, основанная на ассоциативных исследованиях полиморфных вариантов генома, в том числе широкогеномных (GWAS), секвенировании экзонов и полных геномов, почти достигла предела возможности выявления наследуемой компоненты мультифакторных фенотипов. Проблему «упущенной наследуемости» практически невозможно решить в рамках существующей парадигмы, несмотря на бурный технологический прогресс геномики и производных от нее -омик. Обобщение и кристаллизация геномных данных в рамках подходов биоинформатики и системной биологии являются одним из возможных путей решения задачи, хотя примеров успешного системного синтеза в отношении распространенных болезней немного [3–5]. Еще один из резервов поиска кроется в исследовании патогенетики болезни на онтогенетическом уровне, в изучении «онтогенеза болезни» (эпигенетических модификаций наследственной информации, трансгенерационных эффектов, соматического мозаицизма, механизмов парадоминантного наследования) [4].

Несомненно, проблема понимания механизмов развития и распространенности комплексных мультифакторных заболеваний (МФЗ) в современных популяциях требует нового взгляда, новых подходов, новых гипотез и парадигм, не отрицающих огромные пласты достижений, полученных ранее, но дополняющих и расширяющих их. Одним из таких перспективных подходов в понимании природы болезней человека является эволюционная медицина – изучение заболеваний человека в эволюционном контексте. В отличие от классических подходов, ориентированных на прикладные вопросы о структуре и механизмах развития болезни, эволюционный подход шире, он позволяет ставить задачи понимания происхождения, распространения и поддержания высокой частоты патологических фенотипов в популяциях. В настоящей статье мы попытались кратко обобщить современные представления об эволюции генетического разнообразия человека, очертить контуры эволюционной медицины, проиллюстрировать не-

которую эволюционно-медицинскую проблематику рядом современных концепций и собственными данными.

Генетика происхождения и расселения современного человека

Современные исследования генетического разнообразия в популяциях человека на основе молекулярно-генетических данных реконструировали процессы происхождения и расселения *Homo sapiens* по территории земного шара. Согласно консенсусным представлениям о филогеографии и филогении линий униродительских участков генома человека (митохондриальной ДНК и нерекомбинантной части Y-хромосомы), а также данным по широкогеномным наборам однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и данным о секвенировании полных геномов генетическое разнообразие нашего вида восходит к предковой африканской популяции, долгое время обитавшей в условиях тропического климата и имевшей небольшую (от нескольких сотен до нескольких тысяч человек) численность [7, 8]. Время схождения генетического разнообразия человека по униродительским линиям к наименее древнему общему предку оценивается в 100–200 тыс. лет, а время начала расселения современного человека из Африки и экспансии численности – в 50–100 тыс. лет. Последние данные по секвенированию полных геномов неандертальца и денисовского человека показали возможность гибридизации *Homo sapiens* с параллельно существовавшими другими видами рода *Homo* [9–11], тем самым подвергнув сомнению гипотезу недавнего африканского происхождения современного человека в пользу модели мультирегиональной эволюции (гибридизационной модели) (см. [12]). Однако зафиксированный вклад других видов в генофонд современного человека невелик (не превышает долей процента); и факт гибридизации *Homo sapiens* с неандертальцем и денисовским человеком, который можно считать доказанным, не отменяет представления о недавних африканских корнях генетического разнообразия человека, полученных в рамках унирегиональной гипотезы, а лишь дополняет его, делая картину эволюции нашего вида более сложной. Примечательно, что современные молекулярно-генетические данные формируют представления о происхождении и расселении человека, не противоречащие классическим данным по белковым маркерам и данным смежной отрасли знания – палеоантропологии.

Средовые изменения и предпосылки для адаптивной эволюции генетического разнообразия

В ходе расселения из Африки современный человек, заселивший все континенты и все климатические зоны, столкнулся с глобальными средовыми вызовами, создавшими предпосылки для адаптивной эволюции генетического разнообразия [13]. Процесс заселения других континентов и других климатических зон, начавшийся порядка 70 тыс. лет назад и закончившийся заселением Америки около 20 тыс. лет назад и последними миграциями на отдаленные острова Океании около 2 тыс. лет назад, потребовал адаптации к климатогеографическим условиям новой среды обитания. Возникновение сельского хозяйства и переход от культур охотников и собирателей к культурам скотоводов и земледельцев, сопровождавшийся быстрой экспансией численности населения около 10 тыс. лет назад, привели к резкой смене диеты и необходимости адаптации к изменившейся структуре питания и метаболизма. В эпоху великих географических открытий и переселения народов (около 500 лет назад) массовые миграции буквально в течение одного поколения резко меняли среду обитания больших групп населения, например при колонизации Америки и вывозе рабов из Западной Африки в Новый Свет. Последним глобальным вызовом среды явились промышленная революция, загрязнение среды и появление большого числа новых химических веществ, не существовавших ранее в природе. Разумеется, генофонд как относительно медленно эволюционирующая система, а тем более геном человека не способны измениться под давлением средовых факторов за небольшое число поколений и быстро ответить на средовые вызовы, однако следы адаптивной эволюции, связанные с ранними событиями – расселением человека, адаптацией к смене питания в эпоху сельскохозяйственной революции, вполне могут быть предметом поиска и генетического анализа. Обратной стороной адаптивных изменений может быть «выщепление» генетической изменчивости, определяющей подверженность к распространенным заболеваниям, проявляющееся как высокая частота ряда многофакторных болезней.

Структура генетического разнообразия в современных популяциях человека

Эволюционная история генетического разнообразия в современных популяциях человека, сложившаяся в результате расселения из Африки и последующих миграционных событий, привела к формированию четко структурированной картины популяционных взаимоотношений. Наиболее общей закономерностью организации генетического разнообразия в популяциях человека является его строгая географическая структурированность, проявляющаяся как кластеризация географически близких популяций и клинальное изменение частот аллелей и гетерозиготности. Причина такой картины заключается в том, что главными движущими силами микроэволюции в ходе расселения были миграции, дрейф генов и изоляция расстоянием [7]. Сценарий постепенного заселения континентов и их регионов подразумевает последовательные акты миграций, дрейфа и изоляции с последующим умеренным потоком генов между близкими популяциями. При этом роль адаптивной эволюции, опосредованной естественным отбором в масштабах всего генома или генофонда, вероятно, скрыта более мощными нейтральными факторами.

Географическая структурированность генетического разнообразия проявляется практически на любых представительных выборках генетических маркеров любого типа; на различных масштабах – от глобального до субрегионального – и на различных единицах наблюдения – популяциях или индивидуальных геномах. Примером географического паттерна разнообразия является проведенный нами анализ 200 тыс. SNP в 79 мировых популяциях (неопубликованные данные). Расположение популяций в пространстве двух первых главных компонент частот 200 тыс. маркеров, распределенных по всему геному, практически идентично географической карте как в масштабе всего мира (рис. 1,а), так и в масштабе Евразии (рис. 1,б). Индивидуальные геномы повторяют ту же картину, которая формируется в основных чертах уже при нескольких десятках SNP, случайно выбранных из 200 тыс. Двумя главными факторами, объясняющими в данном случае более 40% вариативности частот аллелей, являются географические параметры – широта и долгота.

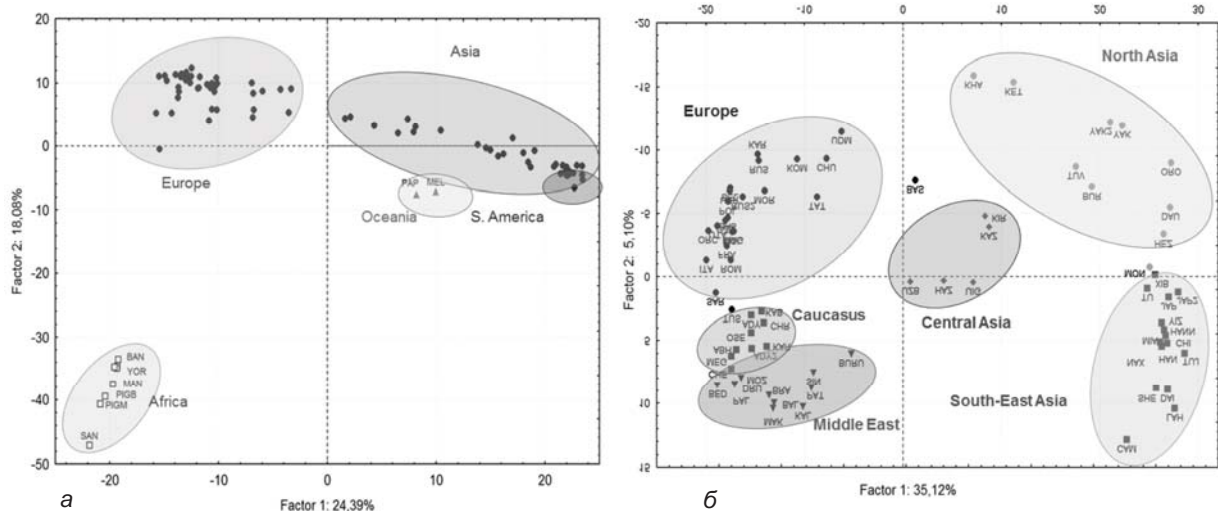


Рис. 1. Пространство главных компонент частот аллелей 200 тыс. SNP в мировых популяциях: а – 79 популяций мира; б – 66 популяций Евразии (те же популяции, что и на рис. 1,а, за исключением популяций Африки, Америки и Океании)

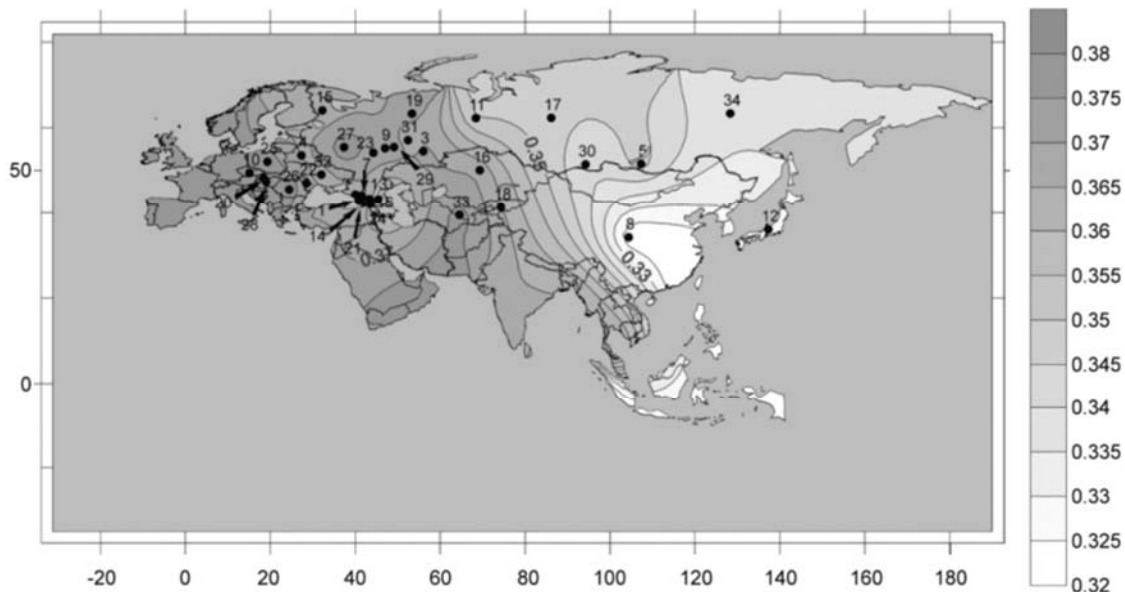


Рис. 2. Клинальное изменение генетического разнообразия (средней гетерозиготности 200 тыс. SNP) в Евразии

Указанная закономерность распределения генетического разнообразия в популяциях человека имеет два главных следствия, подтвержденных экспериментально. Во-первых, человек характеризуется относительно низким уровнем генетической дифференциации популяций при высоком уровне внутривидового разнообразия. Доля межпопуляционных генетических отличий в общем разнообразии в масштабах населения мира не превышает 10–15% (см. [7]). В частности, в приведенном выше примере анализа 79 мировых популяций по 200 тыс. SNP глобальный уровень подразделенности популяций составляет 11,4% ($F_{st} = 0,114$). Во-вторых, на уровне всего генома или на несдвинутых выборках нейтральных маркеров наблюдается постепенное (клинальное) уменьшение генетического разнообразия от центра происхождения (Африки) на периферию ареала. Пример такой картины для Евразии, полученной нами с помощью 200 тыс. SNP, приведен на рис. 2.

Болезни человека в эволюционном контексте

Разумеется, следует ожидать, что сложившаяся эволюционно картина генетического разнообразия отражается и на той части генетической изменчивости, которая имеет отношение к болезням человека. При этом можно предположить, что если «гены болезней» не связаны с адаптацией к глобальным средовым вызовам, то они должны вести себя так же, как и основная часть генофонда, т.е. географически близкие популяции должны обладать сходным спектром мутаций при моногенных болезнях или сходным спектром состава и частот генетических маркеров подверженности к распространенным многофакторным заболеваниям. В то же время если генетическая компонента заболеваний обладала адаптивной значимостью, для «генов болезней» можно ожидать нарушения общей закономерности географического структурирования генетического разнообразия вследствие большей роли естественного отбора для этой части генома по сравнению с нейтральными маркерами или общегеномной картины.

В литературе достаточно примеров первого паттерна – можно назвать близость спектра и частот

мутаций при муковисцидозе в популяциях европеоидного происхождения [14] или этнотерриториальную структурированность спектра частот маркеров МФЗ, ассоциированных с болезнями по данным широкогеномного анализа ассоциаций (GWAS) [7, 15]. Второй сценарий тоже выявляется в экспериментальных данных как для моногенных заболеваний (классический пример – распространенность гетерозиготного носительства мутаций в генах гемоглобина при серповидно-клеточной анемии и бета-талассемии в районах распространения малярии (см. [8, 16]), так и для МФЗ. Одним из примеров нарушения географической структурированности частот маркеров при МФЗ являются частоты генов подверженности к аутоиммунным и иммунозависимым болезням, демонстрирующие эффект деканализации геном-феномных отношений, опосредующих иммунный ответ, под действием адаптации к глобальным средовым факторам [17].

Анализ болезней человека в эволюционном контексте представляет значительный интерес с точки зрения поиска генов и маркеров болезней исходя из эволюционных концепций, составляя один из резервов обнаружения «упущенной наследуемости» при МФЗ. При этом учет эволюционных факторов добавляет еще одну размерность к феномену сложности сложнаследуемых заболеваний и требует специального внимания при формировании рабочей гипотезы и планировании дизайна исследования. Пример структуры типичного ассоциативного исследования приведен на рис. 3. В дизайне «случай – контроль» набирается группа больных с определенным фенотипом, в которую из-за большой роли средовых факторов, клинической и генетической гетерогенности практически любого сложного заболевания с неизбежностью попадают и индивиды со сходным фенотипом, но другой этиологией заболевания. Затем, исходя из гипотезы работы, выбираются генетические маркеры, генотипирование которых у больных и в контроле позволяет сделать вывод о связи (ассоциации) маркера и болезни. При этом фундаментом эндифенотипов, лежащих в основе комплексной болезни, является огромное разнообразие взаимодействующих генетических и средовых факторов.

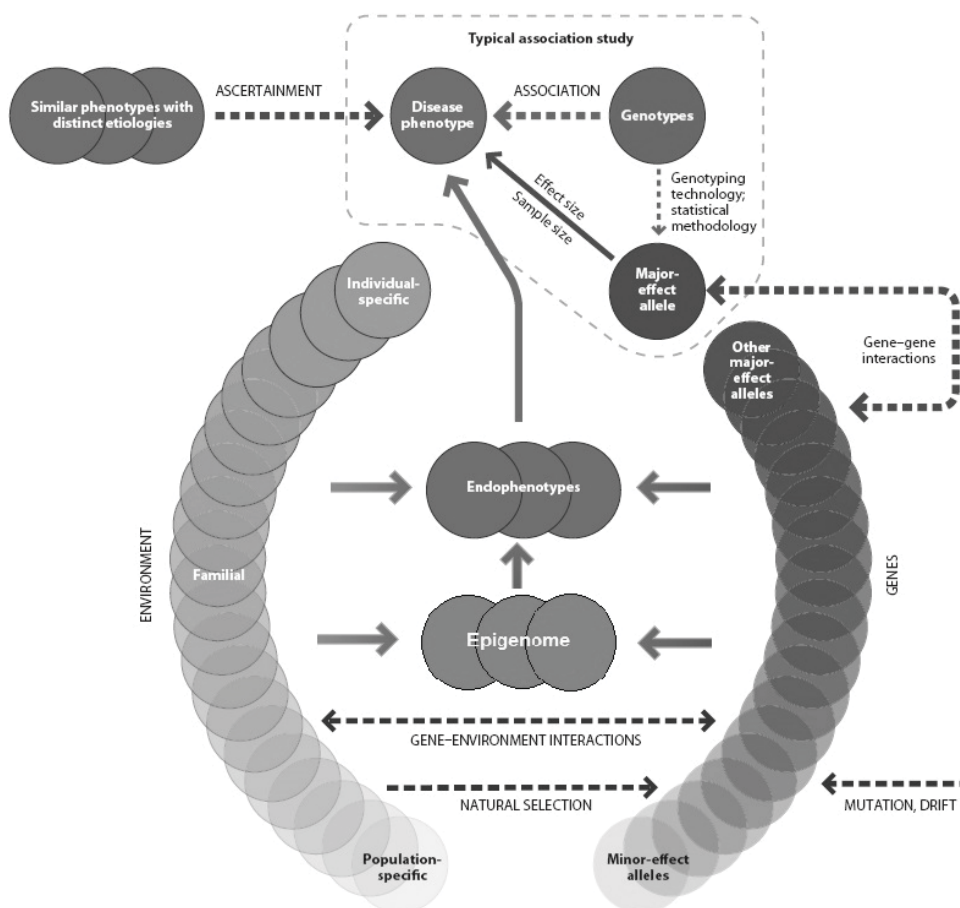


Рис. 3. Схематическое представление взаимодействия средовых, генетических, эпигенетических и микроэволюционных факторов в патогенезе сложнаследуемых заболеваний, а также дизайна ассоциативного исследования «случай – контроль» (по [8], с изменениями)

Генетические факторы ранжируются от аллелей с минимальным эффектом до вероятных для некоторых фенотипов «главных генов», а факторы среды – от популяционно-специфичных до семейных и индивидуальных. Ген-генные взаимодействия, взаимодействия генов и среды и эпигенетические механизмы регуляции, в свою очередь также находящиеся под влиянием генетического контроля и средовых сигналов, тоже являются факторами, дополняющими общую картину формирования эндофенотипов. Не-направленное действие микроэволюционных факторов (мутаций и дрейфа) обеспечивает случайную изменчивость генетической компоненты болезни, тогда как направленное влияние среды на генетическую компоненту фенотипа опосредуется действием естественного отбора. Выявление его роли в болезнях на фоне нейтральной эволюции частот генов, сформировавших основной вектор генетической изменчивости в популяциях человека, и представляется одной из главных проблем эволюционной медицины.

Эволюционная медицина. Определение и краткая история

Что такое эволюционная медицина? Это подход к изучению механизмов и распространенности болезней в эволюционном контексте, который постепенно складывается в новое формирующееся направление на стыке генетики человека и эволюционной биологии. В литературе присутствуют раз-

личные определения эволюционной медицины, но все они содержательно близки и при этом довольно широки. Так, один из основоположников этого направления Стивен Стёрнс в редакционной статье к первому выпуску журнала *Evolution, Medicine, and Public Health* пишет: «Подобно физике и химии, эволюция – фундаментальная наука, которая проникает в медицину и позволяет получить объяснения всему, с чем мы в ней сталкиваемся. Эволюционная (или дарвиновская) медицина, тем самым, включает любую область, где эволюционная мысль проливает свет на медицинские и эпидемиологические проблемы» [18]. Близкое определение дано и в последнем, втором, издании руководства *Human Evolutionary Genetics*: «Мышление в терминах эволюции может прояснить генетический ландшафт комплексных болезней, подход который называется эволюционной медициной. Эволюционная медицина есть приложение эволюционной теории к пониманию здоровья и болезней» [8]. Примечательно, что если первое издание этой монографии в 2004 году содержало лишь небольшую страничную вставку, обозначенную как «Дарвиновская медицина» [16], то второе издание спустя 10 лет включает целую главу, названную «Эволюция и комплексные болезни».

Можно заключить, что эволюционная медицина рассматривает соотношение здоровье – болезнь в эволюционной перспективе. Это есть попытка понимания механизмов возникновения и развития болезней, связи генетического разнообразия с болез-

ниями в рамках современной теории эволюции и концепций эволюционной биологии. Эволюционная медицина – один из концептуальных подходов к анализу и осмыслению информации, генерируемой современными –омными технологиями – полногеномным секвенированием, транскриптомикой, эпигеномикой.

Несмотря на свой несформировавшийся статус, эволюционная медицина имеет довольно давнюю предысторию. Первым, кто использовал термин «дарвиновская медицина», был сэр Бенджамин Уорд Ричардсон, британский врач и физиолог. Он применил этот термин в одной из своих статей в 1893 г., правда, не в отношении Чарльза Дарвина, а в отношении воззрений его деда Эразма [19]. Эразм Дарвин в 1794 г. опубликовал монументальный труд «Зоономия» [20], в первом абзаце которого писал: «Целью следующих страниц является попытка редуцировать факты жизни животных в классы, порядки, жанры и виды; и, сравнивая их друг с другом, приоткрыть теорию болезней». Спустя несколько десятилетий Чарльз Дарвин написал «Происхождение видов путем естественного отбора...» [21], и в конце XIX – первой половине XX в. идеи дарвинизма в медицине были довольно популярны. Историки науки называют этот период, пик которого приходился на 1920–1930-е гг., медицинским дарвинизмом [22, 23]. Медицинский дарвинизм рассматривал болезнь как результат проявления признаков, избежавших естественного отбора. Современная же эволюционная медицина рассматривает болезнь как фенотип, возникший под действием эволюционных факторов (не только отбора), а иногда и поддерживаемый ими.

Современное прочтение термин «дарвиновская медицина» получил в середине 1990-х гг. с опубликованием нескольких монографий, заложивших основы новой эволюционной медицины. В 1994 г. была издана книга Рэндольфа Нессе и Джорджа Уильямса *Why we get sick* [24], чуть позднее появились *Evolution in Health and Disease* под редакцией Стивена Стёрнса [25] и *Evolutionary Medicine* Венды Треватан и соавторов [26]. Термин «дарвиновская медицина», до сих пор иногда используемый (например, тем же Нессе и его школой), постепенно уступает место термину «эволюционная медицина», раскрывающему более широкую трактовку болезней в рамках различных эволюционных концепций, не только неodarвинистских.

Прогрессу и постепенному созреванию эволюционной медицины в отдельное направление способствовали достижения современной геномики, производных –омик и системной биологии. Именно необходимость как-то понять и объяснить накапливающиеся данные с точки зрения соотношения здоровье – болезнь и вызвало всплеск интереса к эволюционной медицине. Среди достижений этого направления в последние годы можно назвать первый полногеномный поиск сигналов естественного отбора в геноме человека [27], открытие орфанных генов у человека [28], полногеномное исследование сигналов адаптации к климату [29].

Проблемы эволюционной медицины

Каков круг проблем, рассматриваемый эволюционной медициной? Здесь уместно вспомнить так называемые «Четыре вопроса Тинбергена» [22].

Нобелевский лауреат 1973 г., немецкий зоолог и эволюционист Николас Тинберген когда-то сформулировал четыре вопроса, ответов на которые требует полное биологическое описание признака [30]. Два вопроса он называл прикладными (*proximate*) и два – эволюционными. К прикладным Тинберген относил вопросы о механизме (какова структура и композиция признака и как она работает?) и онтогении – как признак развивается у индивида? К эволюционным, по Тинбергену, относятся вопросы о филогении (какова эволюционная история признака?) и селективном преимуществе (как признак пробился сквозь сито естественного отбора?). Собственно, в этом поле и находятся проблемы, рассматриваемые эволюционной медициной. Среди проблем, развиваемых в рамках концепций эволюционной медицины, можно назвать:

- роль эволюции генетического разнообразия в болезнях, в том числе поиск генов и маркеров болезней исходя из эволюционных гипотез;

- концепции «несоответствия» генетики и среды – медленной эволюции частот генов и быстрого изменения средовых факторов;

- эволюционные подходы в репродуктивной биологии и медицине;

- эволюционные основы дегенеративных болезней и процесса старения;

- коэволюция патогена и хозяина при инфекционных болезнях;

- «сравнительная медицина» – исследование проблемы здоровья и болезни при сравнении геномных взаимоотношений у разных видов или при сравнительном анализе геномов (например, выявление «орфанных» генов и их роли в болезнях).

Примечательно, что проблемы, которые Тинберген называл прикладными, тоже попадают в «эволюционное» поле зрения. Так, развиваются представления об эволюционно-онтогенетическом аспекте болезней человека, включая исследование селективных процессов в пределах отдельных тканей и клеток организма в патогенезе МФЗ («онтогенез болезней») [6].

Некоторые концепции роли эволюционных факторов в болезнях человека

Применительно к микроэволюционным процессам в популяциях человека разрабатывались и разрабатываются различные теоретические концепции и гипотезы, раскрывающие возможные механизмы действия отбора в отношении структуры генофонда и фенофонда популяций человека, в том числе моногенных и хронических распространенных болезней. В ряду важных теоретических представлений следует отметить концепцию канализации Уоддингтона [31], представления Шмальгаузена о стабилизирующем отборе [32, 33], концепцию Алтухова [34, 35] об оптимальном уровне гетерозиготности популяции. В отношении роли отбора в эпидемиологии распространенных болезней развивались концепции «экономных генов» [36, 37], «дрейфующих генов» и ряд других. Появление в последние годы новых данных, основанных на полногеномных и постгеномных технологиях, привело к новому всплеску концептуального осмысления роли естественного отбора в рамках подходов эволюционной медицины и поиску сигналов отбора в популяциях человека. Среди новых теоретических представлений можно назвать модель «предковой предрасположенности»

(Ancestral Susceptibility) ди Ренцо и Хадсона [38], концепцию деканализации Гибсона [39, 40]. Попробуем кратко рассмотреть указанные представления и их «сферу компетенции».

Концепция канализации, разработанная автором термина «эпигенетика» Конрадом Уоддингтоном в 40-е гг. XX в. [31] применительно к процессам онтогенеза и развиваемая его последователями [41, 42], постулирует эволюцию системы к наиболее стабильному состоянию, устойчивому к генетическим и средовым изменениям, представленному оптимумом фенотипа у большей части популяции. Такая «канализованная» популяция максимально адаптирована к конкретному средовому ландшафту посредством действия соответствующих эпигенетических и средовых сигналов (рис. 4). Близки идеям Уоддингтона и представления Шмальгаузена о стабилизирующем отборе [32, 33], и более поздняя концепция Алтухова об оптимальном уровне гетерозиготности популяции, авторегулируемым факторами популяционной динамики [34, 35].

Представления Уоддингтона подвергаются сейчас переосмыслению в связи с накоплением больших массивов генетических и геномных данных и проблемами поиска генетических основ распространенных болезней. В частности, австралийский ис-

следователь Грег Гибсон предложил концепцию деканализации для объяснения эволюционных механизмов накопления распространенных болезней в популяциях [39, 40]. Концепция деканализации подразумевает, что расселение человека за пределы ареала предковых популяций нарушило канализованный оптимум, привело к проявлению криптической (скрытой, не проявляющейся в канализованной популяции) генетической изменчивости и повышению частоты связанных с ней заболеваний. Средовые и культурные изменения за последние 100 лет (диета, курение, загрязнение среды) еще в большей степени сдвинули физиологию от устойчивых канализованных механизмов (рис. 4).

Гипотеза «предковой предрасположенности» (Ancestral Susceptibility) [38] в соответствии с принципом канализации постулирует, что предковые аллели были адаптивными для древних популяций человека, а производные – «вредными». С расселением и сменой средовых факторов давление отбора на производные аллели упало, а предковые аллели стали аллелями предрасположенности к хроническим болезням. Фактически гипотеза «предковой предрасположенности» является частным случаем «деканализации», действующей в отношении предковых аллелей.

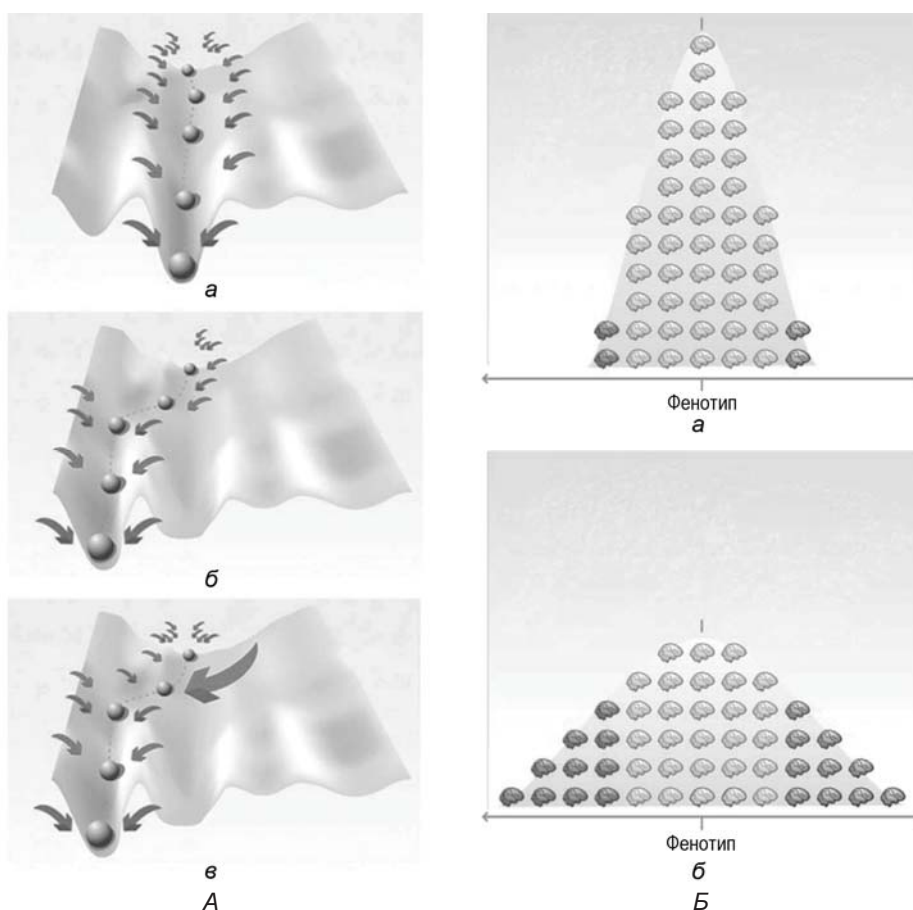


Рис. 4. Канализация и деканализация геном-феномных отношений: А – эволюция системы в генетическом ландшафте: а – оптимальная траектория эволюции, задаваемая средовыми и эпигенетическими факторами (показаны стрелками); б – деканализация и переход на другую траекторию при исчезновении определенных факторов; в – деканализация при появлении новых мощных внешних факторов; Б – распределение количественного фенотипа в канализованной и деканализованной популяциях: а – в канализованной популяции большинство индивидов представлено оптимальным фенотипом (центр распределения), доля отклонений от оптимума на краях распределения невелика; б – в деканализованной популяции доля отклонений от оптимума возрастает. На краях распределения, за порогом нормальных значений признака – патологические эндотипы (по [40], с изменениями)

Концепция «экономных генотипов» (thrifty genotypes) [36, 37], предполагающая направленный отбор в древних популяциях аллелей, запасующих энергию в виде жиров, что привело к высокой частоте диабета и ожирения в современных популяциях, в свою очередь, является частным случаем «предковой предрасположенности».

Канализация и деканализация геном-феномных отношений в ходе расселения современного человека: пример генов аутоиммунных и иммунозависимых болезней

Эволюционные предшественники *Homo sapiens* и предковые популяции современного человека на протяжении многих поколений подвергались усиленному давлению средовых факторов, связанных с инфекционными тропическими болезнями (гельминты, бактериальные инфекции). Роль паразитарных (прежде всего гельминтных инфекций) в заболеваемости населения подчеркивается данными эпидемиологических исследований. Согласно данным ряда работ [43, 44], гельминтозы встречаются гораздо чаще в условиях жаркого и влажного тропического климата по сравнению с популяциями умеренной и арктической зон. В тропических популяциях естественный отбор благоприятствовал накоплению вариантов генов, обеспечивающих более мощный иммунный ответ на паразитарные инфекционные заболевания по Th2-типу [45, 46], что должно было привести к канализации генетической структуры популяции за счет направленного отбора провоспалительных аллелей генов, участвующих в гуморальном иммунном ответе, опосредованном Т-хелперами второго типа (Th2-ответ). Можно предполагать, что расселение человека в зоны умеренного и арктического климата и экспозиция другими инфекционными агентами (вирусными и внутриклеточными бактериальными инфекциями) могли привести к сдвигу устоявшегося баланса Th2/Th1 и деканализации сложившихся в предковых популяциях взаимоотношений «генотип – среда».

Для проверки этой гипотезы мы исследовали распределение функциональных аллелей нескольких

генов иммунной системы в 15 мировых популяциях, представляющих различные климатические зоны земного шара и оценили взаимосвязь генетического разнообразия с климато-географическими факторами [17].

В рамках этого исследования мы обнаружили определенные особенности распределения генетического разнообразия по генам иммунных заболеваний в мировых популяциях, отличающие их от структуры разнообразия, наблюдающейся по всему геному и обсужденной выше. Такие особенности названы нами «сигналами деканализации» и сводятся к следующему:

1) ассоциация генетического маркера с клиническим фенотипом или эндофенотипом (в качестве доказательства мы рассматривали высокодоверенную ассоциацию в GWAS);

2) снижение частоты ассоциированного с фенотипом (предкового) аллеля от Африки к Евразии;

3) корреляция генетического разнообразия с широтой и климатом;

4) увеличение генетического разнообразия от Африки к Евразии в отличие от полногеномного разнообразия;

5) накопление сигналов естественного отбора (положительных тестов) для «деканализованных» маркеров;

6) большая степень дифференциации популяций мира по «деканализованным» маркерам по сравнению с нейтральными;

7) возможно, меньшее гаплотипическое разнообразие в «деканализованных» участках генома по сравнению с «нейтральными».

В целом полученные нами данные в рамках гипотезы деканализации иммунного ответа в ходе расселения современного человека можно суммировать следующим образом (рис. 5):

1) в предковой популяции современного человека в Африке сложились канализованные направленные отбором отношения «генотип – среда», обеспечивающие эффективный иммунный ответ на паразитарные инфекции за счет сдвига баланса иммунной системы в сторону Th2-пути.

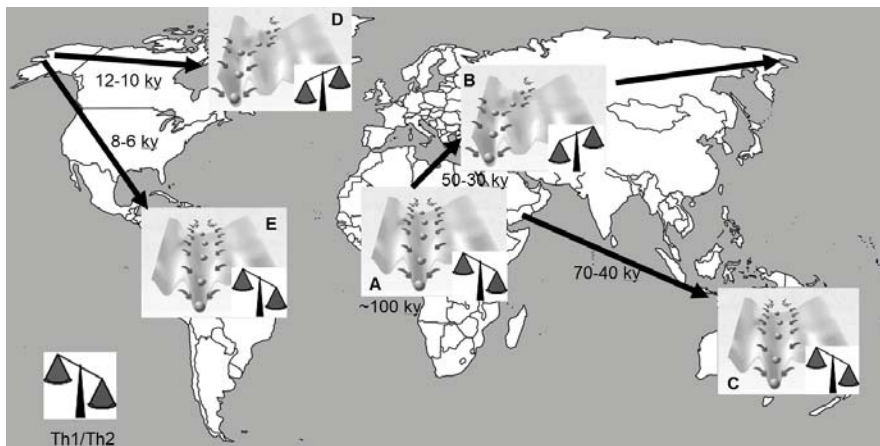


Рис. 5. Гипотеза канализации и деканализации генетического ландшафта иммунной системы в ходе расселения современного человека (по [17]). Генетический ландшафт изображен в виде рельефа канализованных состояний (долины); действие канализирующих средовых факторов показано стрелками; Th1/Th2 – гипотетический баланс основных путей иммунного ответа, исходя из предположения о деканализации иммунной системы в ходе расселения человека; ky – тысяч лет назад; а – канализованный ландшафт в предковых и современных африканских популяциях; б – расселение в Евразию и деканализация ландшафта за счет ослабления действия канализирующих факторов среды. Сдвиг баланса Th1/Th2; в – заселение Австралии, сохранение канализованного ландшафта; г – заселение Америки с территории Азии, сохранение деканализованного ландшафта у инуитов; д – заселение Южной Америки. Вторичная канализация (реканализация) генетического ландшафта исходными средовыми факторами

Эта канализованная система сохранилась и у современных африканцев, и в других коренных популяциях экваториального и тропического климатического пояса;

2) по мере расселения современного человека из Африки в регионы с умеренным и арктическим климатом прослеживается снижение интенсивности провоспалительных реакций, свидетельствующее, согласно нашей гипотезе, о возможном смещении баланса иммунного ответа в сторону Th1-пути. Средовые факторы, связанные с адаптацией к экваториальному тропическому климату и специфической для него инфекционной нагрузкой, сменились средой, требующей адаптации к более суровому климату и большей эффективности гуморального иммунного ответа. Исчез канализирующий средовой фактор и произошла деканализация системы. В современных популяциях эта деканализация может проявляться повышенной подверженностью к ряду распространенных заболеваний (астма, системная красная волчанка и др.), унаследованной от предковых популяций, где эта подверженность была криптической (скрытой);

3) при возвращении популяций, прошедших долгий путь изменения частот генов, в исходные средовые условия тропического климата (например, для южноамериканских индейцев варао) канализирующий средовой фактор возвращается и оказывается достаточно сильным, чтобы вернуть частоты функционально значимых провоспалительных аллелей в близкое исходному состояние (реканализация).

Адаптация к климату и болезни человека

Деканализация иммунного ответа в ходе расселения человека является примером возможных адаптивных изменений частот генов и генотипов в популяциях человека по мере продвижения из Африки, вызванных направленным действием средовых факторов (в данном случае смены инфекционной нагрузки, сдвинувшей баланс иммунного ответа), связанных с климатогеографическими условиями среды обитания. Эти результаты, полученные в рамках кандидатного подхода (выбор генетических маркеров, ассоциированных с кандидатным для деканализации фенотипом), инициировали нас к позиционному полногеномному поиску сигналов деканализации и адаптации к климату в ходе расселения человека. Вопросы, на которые мы попытались найти ответы, были нами сформулированы так: какие гены могли быть мишенями для естественного отбора в ходе расселения человека? какие биологические процессы могли быть связаны с адаптацией к меняющейся среде в ходе расселения человека? какие болезни могут быть результатом выщепления «криптической изменчивости», если адаптация связана с деканализацией и реализацией «предковой предрасположенности» к МФЗ? Данные анализа, проведенного на 79 мировых популяциях, прогенотипированных по 200 тыс. SNP еще находятся в стадии обработки, однако некоторые предварительные результаты заслуживают внимания.

Мы выявили около 1 тыс. SNP, распределенные по геному и принадлежащие областям примерно 450 генов, высокодостоверно ($p < 1 \cdot 10^{-8}$ с поправкой FDR для полногеномного анализа) ассоциированные с ключевыми климатическими факторами и широтой и демонстрирующие другие сигналы декана-

лизации. Поиск болезней, ассоциированных с этими генами по данным Genetic Association Database [47], выявил порядка 1 тыс. достоверных ассоциаций ген – болезнь. Распределение этих ассоциаций по классам заболеваний показывает, что среди наиболее обогащенных ассоциациями групп заболеваний встречаются ожидаемые группы фенотипов, в частности сердечно-сосудистые заболевания и связанные с ними метаболические эндотипы (20% всех ассоциаций), иммунные и инфекционные болезни (8%). Среди неожиданно высокообогащенных групп оказались ассоциации с хемозависимостями и фармакогенетическими признаками (21%), а также неврологические и психиатрические заболевания (30%). Вероятно, первая группа фенотипов демонстрирует адаптивный ответ генофонда на ксенобиотики и изменение структуры питания, а высокая доля нейро- и психиатрических болезней, возможно, является следствием выщепления криптической изменчивости, связанной с поведенческими фенотипами, способствовавшими миграционной активности и «поиску новизны».

Ключевыми биологическими процессам – генными онтологиями, достоверно обогащенными в группе генов, показавших сигналы адаптивной эволюции по результатам нашего анализа, являются процессы, кластеризующиеся в такие группы генных онтологий, как регуляция метаболизма; ответ на различные эндо- и экзогенные субстраты; передача сигнала; регуляция транскрипции; неврология и поведение.

Роль естественного отбора в формировании систематического изменения частот аллелей по мере расселения человека (снижение частоты предкового аллеля и рост гетерозиготности) для этой группы генов, вероятно, была существенной. Положительные тесты для отдельных SNP демонстрируют до 20% маркеров, причем наблюдается рост интенсивности отбора в популяциях от экватора к полюсам, чего не обнаружено для других частей генома, вариабельность которых не коррелирует с климатогеографическими параметрами среды обитания. Анализ сигналов отбора в деканализованных участках генома с помощью тестов, ориентированных на структуру неравновесия по сцеплению и вариабельность гаплотипов на данных проекта 1 тыс. геномов, выявляют достоверные сигналы балансирующего и направленного отбора. К числу примененных нами тестов относятся тест Таджимы, кросс-популяционный тест на протяженную гомозиготность гаплотипов (XP-EHH, cross-population extended haplotype homozygosity), кросс-популяционное композитное мультилокусное соотношение вероятностей (XP-CLR, cross-population multilocus composite likelihood ratio).

Одним из примеров действия отбора на генетическое разнообразие локусов, входящих в наш «топ-1000» деканализованных маркеров, является ген *UGT2B7*, кодирующий один из вариантов уридин-5-дифосфат глюкуронилтрансферазы – фермента фазы II детоксикации ксенобиотиков. Функцией белка является перенос гликозильных групп по УДФ-молекулам, который превращает токсичные вещества в водорастворимые безвредные глюкурониды [48]. Полиморфизм этого гена ассоциирован с такими заболеваниями, как системная красная волчанка, ВИЧ, ожирение и эпилепсия, и ответом на лекарственную терапию ряда заболеваний [49, 50].

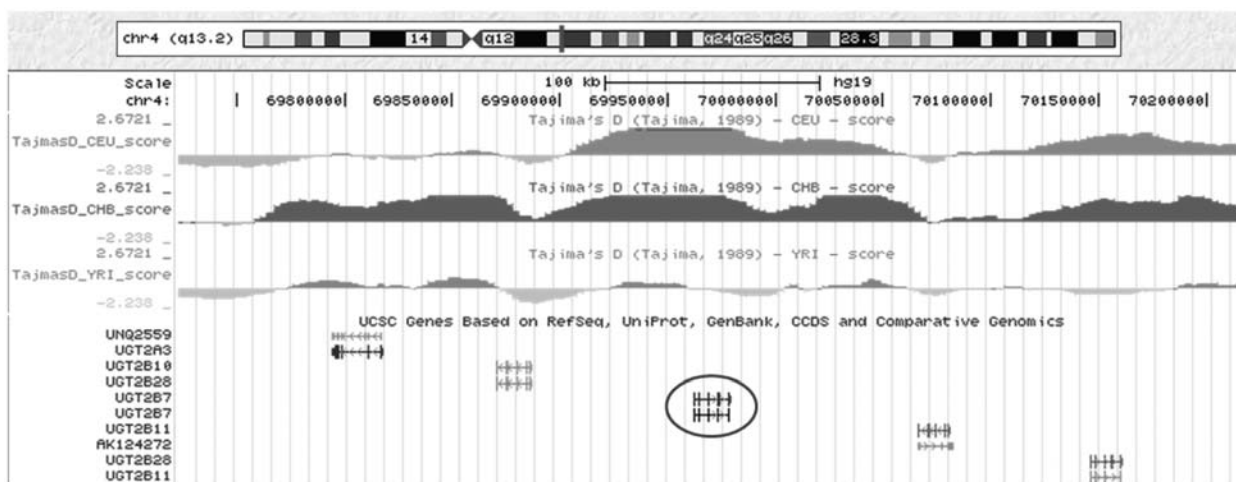


Рис. 6. Сигнал балансирующего отбора на участке хромосомы 4 в геномном браузере проекта «1000 геномов». Участок длиной около 500 тыс. п.н. содержит ген *UGT2B7* и четыре других белок-кодирующих гена. Значения теста Таджimy вдоль хромосомы показаны для европейцев (CEU, верхний график, зеленый), азиатов (CHB, средний график, синий) и африканцев (YRI, нижний график, красный). Ниже показана локализация генов в данном участке хромосомы. Позиция гена *UGT2B7* обведена овалом

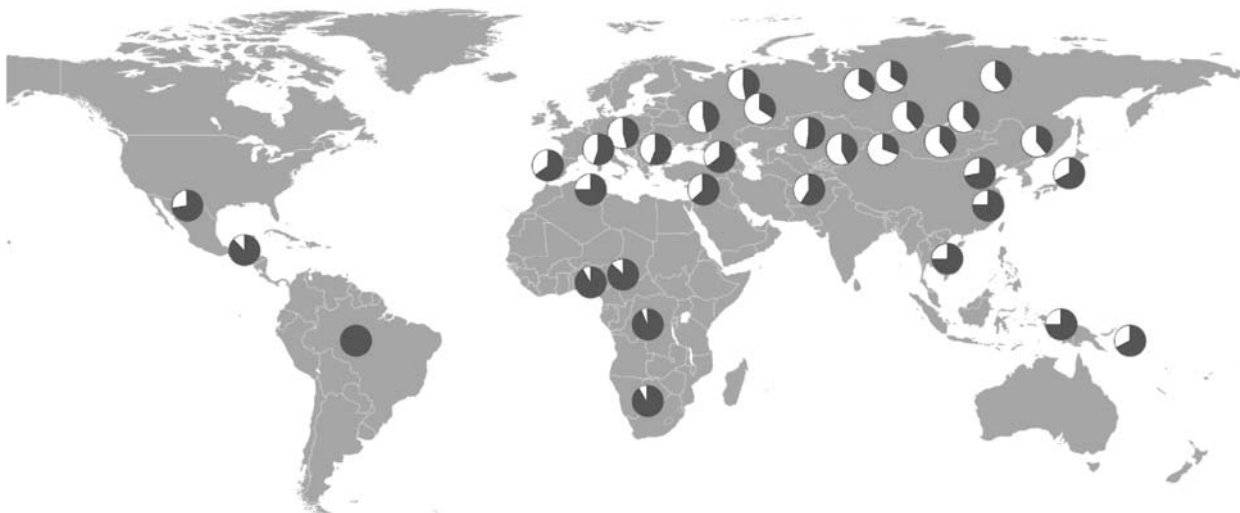


Рис. 7. Частоты аллелей rs4587017 гена *UGT2B7* в мировых популяциях. Предковый аллель показан черным, производный – белым

Рис. 6 демонстрирует значимый сигнал балансирующего отбора в локусе гена *UGT2B7* на хромосоме 4 и вокруг него в европейских (синий график) и азиатских (красный график) популяциях, но не у африканцев (красный график). Зона действия отбора простирается примерно на 150 тыс. пар оснований, содержащих всю кодирующую область гена и его 5'UTR- и 3'UTR-районы. При этом распределение аллелей rs4587017 гена *UGT2B7*, показывающего наиболее выраженные сигналы отбора и деканализации (рис. 7), свидетельствует о направленном изменении частот аллелей от высокой частоты предкового аллеля (показан синим), связанного с медленным метаболизмом, к высокой частоте (более 60%) производного аллеля – быстрого метаболизатора в Северо-Восточной Азии. По мере обратного продвижения человека к тропикам предковый аллель снова становится наиболее частым, вплоть до его полной фиксации в экваториальных популяциях индейцев Бразилии. То есть мы видим ту же цепочку событий, опосредованных адапта-

цией к климату за счет действия отбора, что и в случае генов иммунозависимых заболеваний – канализацию в предковых и современных африканских популяциях – деканализацию по мере продвижения на север и реканализацию при возвращении в исходные средовые условия. Ну а медленный направленный отбор против исходно наиболее частого предкового аллеля по мере удаления от Африки в данном случае приводит к постепенному повышению генетического разнообразия в большинстве нетропических популяций, тем самым мимикрируя под сигнал балансирующего отбора.

Заключение

Генетическое разнообразие современных популяций человека сложилось под действием различных микроэволюционных факторов, действовавших в ходе расселения человека по территории Земли. Наиболее выражены эффекты миграций, дрейфа и изоляции расстоянием, сформировавшие картину

строгой географической структурированности генетической изменчивости человечества. Эффекты естественного отбора, как правило, скрыты или стертые более мощным действием дрейфа генов. Однако современный арсенал полногеномных методов анализа генетического полиморфизма в совокупности с биоинформационными подходами дает возможность выявлять сигналы отбора и анализировать роль микроэволюционных факторов в распространенных заболеваниях человека. Эта задача является одной из основных проблем эволюционной медицины – формирующегося направления современной биомедицины, заключающегося в изучении болезней и здоровья человека в эволюционном контексте.

Некоторые гипотезы и концепции эволюционной медицины могут быть продуктивными для выявления механизмов возникновения, распространения и патогенетики МФЗ. Одной из таких концепций является гипотеза канализации – деканализации геном-феномных отношений в ходе расселения современного человека.

Широкогеномный позиционный поиск позволил выявить генетические маркеры и локусы генома, несущие сигналы деканализации и адаптации к климату. Часть вариабельности генома человека, ассоциированная со сменой среды в ходе расселения из Африки, обогащена вариантами, связанными с нейрорепсихиатрическими заболеваниями и поведенческими признаками, иммунными и инфекционными болезнями, ответом на ксенобиотики. Ключевые биологические процессы, в которые вовлечены эти гены и маркеры, включают регуляцию метаболизма, передачу сигналов, ответ на внешние стимулы, регуляцию нервной системы. Одним из многих примеров генов, несущих сигналы отбора и деканализации, является ген уридин-5-дифосфат глюкурозилтрансферазы (*UGT2B7*), участвующий в метаболизме ксенобиотиков и ассоциированный с рядом комплексных заболеваний человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 12-04-00595; контракта № 11.519.11.2036 ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 гг.» и контракта № 14.BBB.21.0066 ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.».

Литература

1. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi
2. *The 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1092 human genomes // Nature. 2012. V. 491. P. 56–65.*
3. *Knox S.S. From 'omics' to complex disease: a systems biology approach to gene-environment interactions in cancer // Cancer Cell International. 2010. V. 10:11.*
4. *Chen L., Wu J. Systems biology for complex diseases // Journal of Molecular Cell Biology. 2012. V. 4. P. 125–126.*
5. *Li H. Systems biology approaches to epidemiological studies of complex diseases // WIREs Syst. Biol. Med. 2013. V. 5. P. 677–686.*
6. *Лузырёв В.П., Кучер А.Н. Эволюционно-онтогенетические аспекты патогенетики хронических болезней человека // Генетика. 2011. Т. 47. С. 1573–1585.*
7. *Степанов В.А. Геномы, популяции, болезни: этническая геномика и персонализированная медицина // Acta Naturae. 2010. № 4. С. 18–34.*
8. *Jobling M., Hollox E., Hurler M. et al. Human Evolutionary Genetics. 2nd edition. 2014. New York, London: Garland Science. 670 p.*
9. *Meyer M., Kircher M., Gansauge M.-T. et al. A High-Coverage Genome Sequence from an Archaic Denisovan Individual // Science. 2012. V. 338. P. 222–226.*
10. *Prufer K., Racimo F., Patterson N. et al. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains // Nature. 2014. V. 505. P. 43–49.*
11. *Noonan J.P. Neanderthal genomics and the evolution of modern humans // Genome Res. 2010. V. 20. P. 457–553.*
12. *Степанов В.А. Этногеномика населения Северной Евразии. Томск: Печатная мануфактура, 2002. 244 с.*
13. *Balaresque P.L., Ballereau S.J., Jobling M.A. Challenges in human genetic diversity: demographic history and adaptation // Human Molecular Genetics. 2007. Vol. 16, Review Issue 2. P. R134–R139.*
14. *Wiuf C. Do DF508 heterozygotes have a selective advantage? // Genet. Res. 2001. V. 78. P. 41–47.*
15. *Adeyemo A., Rotimi C. Genetic variants associated with complex human diseases show wide variation across multiple populations // Public Health Genomics. 2010. V. 12. P. 72–79.*
16. *Jobling M.A., Hurler M.E., Tyler-Smith C. Human evolutionary genetics. Origins, peoples and diseases. New York: Garland Publishing. 2004. 524 p.*
17. *Степанов В.А., Канделария П., Кхо С.И. др. Деканализация иммунного ответа при расселении современного человека: связь генетического разнообразия в генах иммунной системы с климатогеографическими факторами // Мед. генетика. 2013. Т. 12, № 4. С. 8–18.*
18. *Day T., Stearns S.C. Editorial: evolutionary medicine special issue // Evolution, Medicine, and Public Health. 2013. V. 1. P. 7–9.*
19. *Richardson B.W. Erasmus Darwin, M. D., F. R. S., and Darwinian Medicine // Asclepiad. 1893. V. 37. P. 63–91.*
20. *Darwin E. Zoonomia; or, The Laws of Organic Life. Part I. London: J. Johnson, 1794.*
21. *Darwin Ch. On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. London: Jon Murray, 1859. 502 p.*
22. *Zampieri P. Medicine, Evolution, and Natural Selection: an historical overview // The Quarterly Review of Biology. 2009. V. 4. P. 333–355.*
23. *Zampieri P. Origins and History of Darwinian Medicine // Humana Mente. 2009. V. 9. P. 13–38.*
24. *Nesse R.M., Williams G.C. Why We Get Sick? The New Science of Darwinian Medicine. New York: Time Books. 1994.*
25. *Stearns S.C., editor. Evolution in Health & Disease. New York: Oxford University Press, 1999.*
26. *Trevathan W.R., McKenna J.J., Smith E.O., editors. Evolutionary Medicine. New York: Oxford University Press, 1999.*
27. *Voight B.F., Kudaravalli S., Wen X., Pritchard J.K. A Map of Recent Positive Selection in the Human Genome // PLoS Biol. 2006. V. 4. P. 446–458.*
28. *Knowles D.G., McLysaght A. Recent de novo origin of human protein-coding genes // Genome Res. 2009. V. 19. P. 1752–1759.*
29. *Hancock A.M., Witonsky D.B., Alkorta-Aranburu G. et al. Adaptations to Climate-Mediated Selective Pressures in Humans // PLoS Genetics. 2011. V. 7. P. 1–16.*
30. *Tinbergen N. On the Aims and Methods of Ethology // Zeitschrift für Tierpsychologie. 1963. V. 20. P. 410–463.*
31. *Waddington C.H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. 1942. Nature V. 150. P. 563–565.*
32. *Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции (теория стабилизирующего отбора). М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1946. 96 с.*
33. *Schmalhausen I.I. Factors of evolution: the theory of stabilizing selection. Philadelphia: Blakiston, 1949.*
34. *Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях: 3-е изд. М.: Академкнига, 2003. 432 с.*

35. Алтухов Ю.П., Корочкин Л.И., Рычков Ю.Г. Наследственное биохимическое разнообразие в процессах эволюции и индивидуального развития // Генетика. 1996. Т. 32. С. 1450–1473.
36. Neel J.V. Diabetes Mellitus: A «Trifty» Genotype Rendered Detrimental by «Progress»? // Am. J. Hum. Genet. 1962. V. 14. P. 353–362.
37. Neel J.V. The «Trifty» Genotype in 1998 // Nutrition Reviews. 1998. V. 57. P. S2–S9.
38. Di Rienzo A. and Hudson R.R. An evolutionary framework for common diseases: the ancestral-susceptibility model // Trends Genet. 2005. V. 21. № 11. P. 596–601.
39. Gibson G. Decanalization and the origin of complex disease // Nature Review Genetics 2009. V. 10, № 2. P. 134–140.
40. McGrath J.J., Hannan A.J., Gibson G. Decanalization, brain development and risk of schizophrenia // Transl. Psychiatry. 2011. V. 1. e14.
41. Scharloo J. Canalization: genetic and developmental aspects // Annual Review of Ecology and Systematics. 1991. V. 22. P. 65–93.
42. Siegal P., Bergman J. Waddington's canalization revisited: developmental stability and evolution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99, № 16. P. 10528–10532.
43. Bethony J., Brooker S., Albonico M. et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm // Lancet. 2006. V. 367. P. 1521–1532.
44. WHO Expert Committee. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. World Health Organ Tech Rep Ser, 2002. 912 p.
45. Hughes R.G. Environmental influences on helminthiasis and nutritional status among Pacific schoolchildren // Int. J. Environ Health Res. 2004. V. 14. P. 163–177.
46. Le Souef P.N., Goldblatt J., Lynch N.R. Evolutionary adaptation of inflammatory immune responses in human beings // Lancet. 2000. V. 356. P. 242–244.
47. <http://geneticassociationdb.nih.gov/>
48. Mackenzie P., Little J.M., Radomska-Pandya A. Glucosidation of hyodeoxycholic acid by UDP-glucuronosyltransferase 2B7 // Biochem. Pharmacol. 2003. V. 65. P. 417–421.
49. Fujita K.I., Ando Y., Yamamoto W. et al. Association of UGT2B7 and ABCB1 genotypes with morphine-induced adverse drug reactions in Japanese patients with cancer // Cancer chemotherapy and pharmacology. 2009. V. 65. P. 251–258.
50. Rouguieg K., Picard N., Sauvage, F.L. et al. Contribution of the different UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms to buprenorphine and norbuprenorphine metabolism and relationship with the main UGT polymorphisms in a bank of human liver microsomes // Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 2010. V. 38.

ГЕНЕТИКА МНОГОФАКТОРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ (ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АСПЕКТ)

А.Н. Кучер

НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск
Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

В структуре заболеваемости и смертности населения современных популяций главенствующая роль принадлежит болезням многофакторной природы, в основе которых лежат генетические и средовые факторы. Поэтому в последние десятилетия усилия многочисленных исследовательских коллективов различных стран мира были направлены на раскрытие генетической компоненты многофакторных заболеваний (МФЗ). Однако на настоящий момент, несмотря на привлечение для данных разработок самых современных методов и технологий, успехи в этой области достаточно скромны и трансляция полученных результатов в практическую медицину сталкивается с обоснованной осторожностью со стороны практикующих врачей. Одной из причин этого является прежде всего неоднозначность полученных результатов с точки зрения вовлеченности различных генетических маркеров в формирование предрасположенности к заболеваниям многофакторной природы в разных популяциях и этнических группах. Наряду с этим результаты ассоциативных исследований оказываются труднообъяснимы с точки зрения определения конкретных причинных вариантов болезни и их функциональной значимости [1]. Кроме того, оказалось, что аллельные варианты, которые показали ассоциации с тем или иным заболеванием, в ряде случаев широко распространены в популяции (иногда преобладают), что кажется нелогичным. Так, в общей сложности от 40 до 70% аллельных вариантов, ассоциированных по данным GWAS с такими многофакторными заболеваниями, как ишемическая болезнь сердца, гипертония, инфаркт миокарда, сахарный диабет 2-го типа, регистрируются в контрольной группе с часто-

той выше 0,5, а в ряде случаев приближаются к 1,0 (рис. 1). Если бы эти аллельные варианты оказывали негативное воздействие на здоровье индивидов в предыдущих поколениях, следовало бы ожидать их «вымывания» из популяций.

По мере накопления данных о вовлеченности генетических маркеров в формирование риска развития МФЗ стало очевидным, что для того, чтобы активно использовать достижения геномных исследований в практической медицине, необходимо пройти ряд этапов, среди которых ключевые позиции отведены познанию биологии генома как основы понимания биологии болезни [2]. Для этого следует подойти к вопросу «здоровье – болезнь» с иной точки зрения – с позиций эволюционной медицины. «Эволюционная медицина рассматривает болезнь как результат конфликта между произошедшим в прошлом отбором по генетическим маркерам и требованиям сегодняшнего дня (т.е. неспособность наших генов «соответствовать» современному стилю жизни)» [3]. Действительно, формирование генофондов современных популяций человека происходило в ходе многовековой эволюции, что обеспечивало их адаптацию к определенным, достаточно стабильным на протяжении ряда поколений условиям среды обитания. В настоящее время происходит быстрая и резкая смена среды обитания человека, начавшаяся в начале XX в. и значительно интенсифицировавшаяся в последние 50 лет (с демографических позиций – два поколения). В повседневной жизни люди сталкиваются с огромным количеством синтетических веществ (бытовая химия, пищевые добавки, лекарства и т.д.), традиционное питание заменяется переработанными и рафинированными продуктами

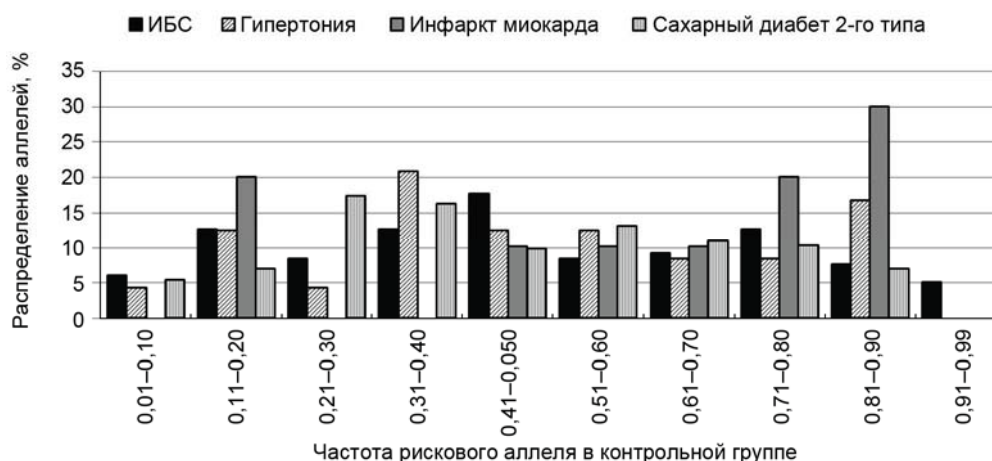


Рис. 1. Распределение (%) в популяционных выборках частот аллелей, ассоциированных по данным GWAS [4] с многофакторными заболеваниями (ишемическая болезнь сердца (ИБС), гипертония, инфаркт миокарда, сахарный диабет 2-го типа)

с дефицитом микро- и макроэлементов; стремительно возрастает темп жизни, человек испытывает интенсивные информационные и стрессовые нагрузки, при этом значительно снижается физическая активность и т.д. Популяции также претерпевают значительные генетико-демографические преобразования: для населения характерны интенсивные, зачастую дальние миграции (смена экологических и климатогеографических условий); снижена значимость генетических факторов в определении дифференциальной плодовитости и смертности населения; увеличивается продолжительность жизни, что создает возможность для проявления эффектов антагонистического плейотропизма генов и т.д. Все это приводит к тому, что генофонды популяций оказываются дезадаптированы по отношению к среде обитания, и, как следствие, происходит распространение болезней цивилизации, таких как ишемическая болезнь сердца, гипертония, инсульт, сахарный диабет 2-го типа, метаболический синдром, ожирение и др.

К настоящему времени эволюционные гипотезы распространенности сформулированы в отношении ряда многофакторных заболеваний (см. [3, 5, 6]). Это гипотеза «экономных генов» Дж. Нила (распространение у современного человека таких болезней цивилизации, как ожирение и сахарный диабет, является результатом отбора аллелей, которые дают возможность «запасать» углеводы в виде жира, что благоприятно для выживания человека во время голода) и ее модификация, предложенная М. Chakravarty и F. Booth (у древних охотников-собирателей были периоды переизбытка и голода, чередующиеся с обязательными периодами физической активности и отдыха); гипотеза «экономного фенотипа», выдвинутая С.Н. Hales и коллегами (согласно этой гипотезе окружающая среда при развитии и росте эмбриона определяет в итоге патологию взрослого); концепция «деканализации» G. Gibson и др. Все эти гипотезы как находили своих приверженцев, так и подвергались критике со стороны исследователей (см., например, [3, 5]).

Несмотря на то что нет единодушия в отношении эволюционных взглядов на причины распространенности тех или иных МФЗ, эволюционная медицина как научное направление довольно активно развивается. В пользу концепции эволюционной

медицины могут свидетельствовать данные, подтверждающие влияние отбора на формирование генетического разнообразия различных популяций (прежде всего по генам и полиморфным вариантам, для которых показана вовлеченность в формирование предрасположенности к многофакторным заболеваниям), а также наличие специфических ген-средовых взаимодействий и установление их значимости для функционирования организма в норме (здоровье) и при патологии.

Гены и естественный отбор

В результате многочисленных исследований выявлено большое число генов (полиморфных вариантов, регионов хромосом), подверженных действию естественного отбора [7–12]. По данным разных авторов, число и спектр таких генов различаются, а степень их перекрытия не превышает одной трети [11]. Это может быть следствием использования различных как методических (например, сравнение генетического разнообразия между популяциями человека или между человеком и шимпанзе), так и статистических подходов (*Fst*-статистика; *LD*-тест; тест Таджимы (*D*); сравнение соотношения несинонимичных и синонимичных замен (*dN/dS*) и др.), примененных авторами. Например, в исследовании R. Nielsen и соавт. [8] эффект отбора как на раннем этапе эволюции человека (показано при сравнении SNP между человеком и шимпанзе), так и для современных популяций установлен для 50 генов, участвующих в регуляции следующих биологических процессов: обоняние, взаимодействие «хозяин – патоген», сперматогенез, онкогенез, апоптоз. В работе J.M. Akey и соавт. [7] к кандидатным для отбора отнесены 174 гена, продукты которых выполняют различные функции (ферменты, сигналы трансдукции, регуляторы транскрипции и др.) и вовлечены в разнообразные биологические процессы (межклеточные взаимодействия, клеточный рост, транскрипция, транспорт, процессы развития и др.). Еще в одном исследовании [10] приводятся 112 генов с очевидными эффектами отбора, соответствующих следующим функциональным категориям: репродукция, взаимодействие «хозяин – патоген», клеточный цикл, метаболизм белков, функционирование нейронов, метаболизм ДНК. По данным В.Ф. Voight и соавт. [12], среди 16 категорий биологических про-

цессов (согласно базе данных GeneOntology (GO)), в которые вовлечены продукты подверженных отбору генов, были как категории, селективная значимость для которых в предыдущих исследованиях зарегистрирована на этапе дивергенции человека и шимпанзе (хемосенсорное восприятие, обоняние, гаметогенез, сперматогенез, оплодотворение), так и новые классы биологических процессов (метаболизм углеводов, фосфатов, транспорт витаминов). Примечательно, что спектр селективно значимых биологических процессов (табл. 1) и генов не перекрывался для разных территориальных групп населения, привлеченных к исследованию. Например, селективная значимость генов, вовлеченных в биологические процессы, затрагивающие различные аспекты фертильности и репродукции, наиболее выражена для европеоидов и населения Восточной Азии, но по отдельным генам, отнесенным к данной категории, эффекты отбора показаны и у йоруба: для гена основного белка спермы *RBSN1* – у жителей Восточной Азии и йоруба; для генов, отвечающих за подвижность спермы, – *SPAG4* у европеоидов и населения Восточной Азии и *ODF2* у европеоидов; жизнеспособность сперматозоидов и яйцеклетки – *ACV1* у европеоидов и *CPEB2* у йоруба; для генов, регулирующих иммунный ответ женщины на сперму, (*TGM4*) и оплодотворение яйцеклетки (*CRISP* кластер генов вблизи бр21.3) у европеоидов [12].

Таблица 1

Значения достигнутых уровней статистической значимости для биологических процессов (по Gene Ontology), в которых задействованы продукты селективно значимых генов в трех географических группах населения (по [12])

| Категория по Gene Ontology | Восточная Азия (ASN) | Европеоиды (CEU) | Йоруба (YRI) |
|---|----------------------|------------------|--------------|
| Хемосенсорное восприятие | – | 0,0006 | 0,0004 |
| Обоняние | – | 0,0006 | 0,0008 |
| Гаметогенез | 0,008 | – | – |
| Сперматогенез и подвижность сперматозоидов | 0,02 | 0,03 | – |
| Оплодотворение | 0,004 | 0,003 | – |
| Метаболизм углеводов | 0,0002 | – | – |
| Транспорт электронов | – | 0,0002 | – |
| Упаковка/ремоделирование хроматина | <0,0001 | 0,01 | – |
| Иммунитет, опосредованный главным комплексом гистосовместимости | – | <0,0001 | 0,02 |
| Метаболизм стероидов | – | – | <0,0001 |
| Связывание липидов и жирных кислот | 0,001 | – | – |
| Инициация транскрипции мРНК | – | 0,002 | – |
| Модификация белков | 0,002 | – | – |
| Транспорт витаминов | 0,002 | – | – |
| Метаболизм фосфатов | 0,002 | 0,03 | – |
| Пероксисомный транспорт | – | – | 0,002 |

Несмотря на определенную несогласованность информации о генах, подверженных отбору, по данным разных авторов, важным представляется тот факт, что для некоторых из них (8,0–19,7% от числа таких генов [7, 10]) установлены ассоциации с патологическими состояниями и признаками (табл. 2).

Помимо приведенных в табл. 2 доказанными считаются эффекты отбора на распространенность генетических вариантов ряда других генов-кандидатов многофакторных заболеваний: *ACE*, *AGT*, *CYP3A5*, *GNB3*, *GRK4*, *SCG2* (участвуют в регуляции уровня артериального давления); *APOE*, *LDLR*, *PCSK9*, *SCARB1*, *ANGPTL4* (задействованы в метаболизме липидов); *CAPN10*, *TCF7L2* (вовлечены в энергетический метаболизм); *F7*, *F9* (регуляторы свертываемости крови); *IL4*, *IL4RA*, *IL13*, *IL1A*, *MMP3* (осуществляют контроль воспалительного процесса) [13].

Таблица 2.

Примеры некоторых подверженных действию отбора генов и ассоциированные с ними заболевания (признаки) по данным GWAS [4, 7, 10, 12]

| Ген | Патология/признак |
|----------------|--|
| <i>IL12RB2</i> | Первичный билиарный цирроз печени; болезнь Бехчета |
| <i>APOB</i> | Общий холестерин; холестерин в составе липопротеидов высокой плотности; холестерин в составе липопротеидов низкой плотности; холестерин в составе липопротеидов очень низкой плотности; триглицериды; метаболический синдром; эректильная дисфункция, гиперлипидемия |
| <i>ADCY3</i> | Ожирение, индекс массы тела; воспалительные заболевания кишечника |
| <i>LPP</i> | Глютеновая болезнь; витилиго; аллергия |
| <i>RNLS</i> | Сахарный диабет 1-го типа |
| <i>FTO</i> | Ожирение; экстремальное ожирение; метаболический синдром; сахарный диабет 2-го типа; меланома; остеоартрит; подкожная жировая ткань; индекс массы тела; масса тела; окружность талии; холестерин в составе липопротеидов высокой плотности; триглицериды; уровень глобулина, связывающего половые гормоны; менархе |
| <i>NT5C2</i> | Артериальное давление (систолическое, диастолическое, пульсовое); ишемическая болезнь сердца; шизофрения и другие психические расстройства |
| <i>TYR</i> | Меланома; возрастзависимая дегенерация желтого пятна |
| <i>PIGU</i> | Меланома |

Народонаселение мира характеризуется высокой генетической гетерогенностью по частотам ассоциированных с широко распространенными заболеваниями полиморфных вариантов [13, 14]. По частотам аллелей 621 SNP, локализованных в генах, для которых при GWAS установлены ассоциации со сложнаследуемыми заболеваниями человека и признаками (26 заболеваний и признаков), в некоторых случаях регистрируются 10-кратные и более межпопуляционные различия (например, по частотам аллелей генов, контролирующих уровень липидов). Значения генной дифференциации по изученным вариантам варьируют в широких пределах как для разных групп патологий (от *Fst* = 0,067 для синдрома дефицита внимания и гиперреактивности до *Fst* = 0,164 для заболеваний сердечно-сосудистой системы), так и для различных SNP в пределах одной патологии/признака (например, для SNP, ассоциированных с ростом, *Fst* = 0,008–0,504; с уровнем липидов – *Fst* = 0,006–0,520) [14]. При этом авторы подчеркивают, что сходство в частотах аллелей значительно ниже между популяциями, локализованными в разных частях света – в Южной Азии, Европе, Африке, чем в пределах этих геогра-

фических регионов. Такая согласованность в варьировании частот аллелей в пределах географически близких групп популяций может отражать эффекты стабилизирующего отбора.

Доказательства действия отбора на формирование генетического разнообразия были получены по генам кандидатам заболеваний сердечно-сосудистой системы, задействованным в функционировании шести биологических процессов: апоптоз, кровообращение и газообмен, гомеостаз, иммунный ответ, метаболизм липидов [15]. При этом доля генов, по которым установлены высокие значения коэффициента генной дифференциации, различалась для разных пар сравниваемых рас. Например, между негроидами и монголоидами более высокие значения *F_{st}* установлены для большей доли генов, регулирующих апоптоз, кровообращение и газообмен, чем при сравнении европеоидов с негроидами и монголоидами. Одним из объяснений этого факта, по мнению авторов, может быть локальная адаптация. К числу генов с локальной адаптацией отнесены: при сравнении негроидов и европеоидов – гены иммунного ответа (*GRB2*, *IKBKB*), апоптоза (*ARHGFI*, *RIPKI*) и метаболизма липидов (*PMVK*); при сравнении негроидов и монголоидов – гены иммунного ответа (*GRB2*), апоптоза (*BCL2LI*) и метаболизма липидов (*PMVK*); при сравнении европеоидов и монголоидов – гены иммунного ответа и апоптоза (*IL4*, *IL6*), свертывания крови (*F2*).

Различия по частотам аллельных вариантов регуляторных областей могут определять специфические профили экспрессии генов, что было убедительно показано в исследовании R.S. Spielman и соавт. [16]: статистически значимые различия в уровне экспрессии между европеоидными и монголоидными популяциями зарегистрированы для 26,1% проанализированных генов. Среди генов с максимальными различиями по уровню экспрессии – *DPYSL2*, *UGT2B17*, *FCER2* (по данным генам выше уровень экспрессии регистрировался у европеоидов); *CTSS*, *SLC2A5*, *NFIL3*, *DNAJB9* (выше у монголоидов). На основании данных по уровню экспрессии 1 097 генов все обследованные индивиды практически со 100%-й вероятностью кластеризуются в две группы: монголоиды и европеоиды. Авторы данного исследования показали, что 18–81% тотальной изменчивости уровня экспрессии генов определяется частотами SNP в соответствующих популяциях. Например, различия в уровне экспрессии между этими двумя сравниваемыми группами по гену *UGT2B17* регистрировались при $p < 1,03 \cdot 10^{-18}$, частота аллеля A по rs3100645 этого гена, ассоциированного с более высоким уровнем экспрессии, составила у европеоидов 0,68, у монголоидов – 0,15 [16]. Приведенные данные также свидетельствуют о возможных эффектах отбора на формирование генетического разнообразия по локализованным в регуляторных областях генов функционально значимым полиморфным вариантам в популяциях различной расовой принадлежности.

Несмотря на накопленную к настоящему времени информацию о роли естественного отбора в формировании генетического разнообразия современных популяций (а может быть, и благодаря этому), в научных публикациях все чаще высказываются суждения о спорности роли естественного отбора в эволюции человека (см., например, [17]). Одна из

причин этого может заключаться в сложности установления специфических факторов отбора, определяющих генетические особенности структуры генофондов конкретных популяций, но такие данные накапливаются.

Факторы естественного отбора

На протяжении всех этапов эволюции человека среди значимых факторов, оказывающих влияние на характер генетического разнообразия, были природно-климатические условия и особенности питания (диета).

C. Suo и соавт. [18] на основании анализа информации, содержащейся в базах данных HarMap, HGDP и SGVP для 22 двух популяций Востока и азиатских популяций Юго-Востока, выделили 23 гена (*HLA-DRB1*, *HLA-DMB*, *HLA-DQA1-2*, *HLA-DMA*, *HLA-DOA*, *HLA-DOB*, *PSMB9*, *BRD2*, *TAP2*, *PSMB8*, *TAP1*, *NRG1*, *WDR48*, *GORASP1*, *TTC21A*, *AXUD1*, *CMYA1*, *CX3CR1*, *CCR8*, *SLC25A38*, *LAMR1*, *MOBP*, *EPHB1*), избыточно содержащие полиморфные варианты, частота аллелей которых коррелировала с географической широтой локализации популяций. В исследовании S.M. Raj и соавт. [19] для 354 генов показана ассоциация с климатом, в том числе для двух генов, *ADRA2A* и *ADRA2C*, продукты которых участвуют в реакции сужения сосудов в ответ на холод и болевые раздражения, получены доказательства действия стабилизирующего отбора.

Проводятся также исследования, в которых не только устанавливается зависимость SNP от потенциальных факторов отбора (экологические параметры, способ ведения хозяйства, характер питания), но и даются биологические объяснения установленным закономерностям. Например, для SNP, локализованных в генах, продукты которых вовлечены в энергетический метаболизм (*ME2*, *ME3*), показана ассоциация с таким экологическим параметром, как «полярный регион»; при анализе характера питания (диета) для популяций, где главным компонентом диеты являются клубни и корнеплоды, специфическими оказались варианты в генах, задействованных в метаболизме крахмала и сахарозы (*GAA*, *GBE1*, *GBA3*), в биосинтезе фолатов (*MTRR*), а при преобладании в питании злаков – варианты гена *PLRP2* (гидролизует галактолипиды – главный компонент триглицеридов у растений) [20]. Установлено, что число копий гена *AMY1* (кодирует амилазу слюны) положительно коррелирует с уровнем белка амилазы, а индивиды из популяций, в которых традиционно в диете высока доля крахмалсодержащих продуктов, в среднем имеют большее число копий данного гена, чем те, в питании которых доля таких продуктов невысока [21]. Для генов и полиморфных вариантов, по которым установлена зависимость частоты регистрации аллелей от экологических факторов или типа диеты, установлены ассоциации с болезнями или патогенетически значимыми признаками (табл. 3).

Генофонды, специфичность которых формировалась на протяжении многих поколений и «оттачивалась» естественным отбором, в настоящее время во многих современных популяциях могут быть дезадаптивными. Те генетические маркеры, которые в прошлом давали адаптивные преимущества их носителям, в современном обществе могут терять селективную значимость (снижено влияние ряда климатических факторов в силу создания более

комфортных условий проживания), и может проявляться их неблагоприятный эффект в формировании предрасположенности к многофакторным болезням. Кроме того, население развитых стран испытывает серьезное давление со стороны резко меняющихся традиций в пищевом поведении, а также вследствие введения в ежедневный обиход бытовых синтетических веществ, лекарственных препаратов, пищевых добавок и т.д. Действительно, как отмечалось выше, некоторые генетические особенности у индивидов, принадлежащих к той или иной популяции, могли быть сформированы в ответ на специфичность питания (диеты), и изменение в пищевом рационе может привести к развитию патологических состояний.

Таблица 3

Гены, подверженные отбору в популяциях человека, предполагаемые селективные факторы, ассоциированные с генами болезни (патогенетически значимые признаки)

| Ген (SNP) | Предполагаемый фактор отбора | Фенотип (болезнь/признак) | Источник |
|--------------------------|--|--|----------|
| <i>CYP3A5</i> (*1/*3) | Климат: солевой обмен | Гипертония, преэклампсия | [22] |
| <i>AGT</i> (M235T) | | | |
| <i>LEPR</i> (R109K) | Климат: устойчивость к холоду | Нарушение метаболизма | [23] |
| <i>FABP2</i> (A54T) | | | |
| <i>GNB3</i> (C825T) | | | |
| <i>FADS2</i> (rs174570) | Экология | Метаболизм липидов | [20] |
| <i>TNXB</i> (rs2269426) | Диета: мясомолочные продукты | Количество эозинофилов | |
| <i>ZCNQ1</i> (rs2722425) | Диета: клубни и корнеплоды | Уровень глюкозы натощак | [19] |
| <i>KCNQ1</i> (rs2237892) | | Сахарный диабет 2-го типа | |
| <i>MTRR</i> (rs162036) | | Метаболизм фолатов | |
| <i>ICOS</i> | Климат: температура зимой | АСТ/АЛТ; глютеновая болезнь | [19] |
| <i>TMEM212</i> | Климат: относительная влажность летом | Индекс массы тела, биполярные расстройства, шизофрения | |
| <i>GLI3</i> | Климат: температура зимой | Возрастзависимая дегенерация желтого пятна, аллергия | |
| <i>ADRA2A</i> | Климат: осадки зимой и солнечное излучение летом | Уровень глюкозы натощак, агрегация тромбоцитов | |
| <i>DHCR</i> | Солнечное излучение зимой | Недостаточность витамина D | |
| <i>POLD3</i> | Температура зимой | Колоректальный рак | |

Нутригеномика и многофакторные болезни

О том, что генетические особенности при воздействии специфических пищевых компонент могут привести к развитию болезни, известно давно. В качестве примера можно привести такие наследственные заболевания, как фенилкетонурия (токсический эффект фенилаланина у лиц с мутацией в гене фенилаланингидроксилазы – *PAH*), галактоземия

(нарушение превращения галактозы в глюкозу в результате мутации гена, ответственного за синтез галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы – *GALT*); железодефицитная анемия, не поддающаяся лечению препаратами железа (нарушено всасывание железа клетками в результате мутаций в гене *TMPRSS6*); гемохроматоз (накопление железа в тканях вследствие избыточного всасывания железа в кишечнике; причина – мутации в гене *HFE*) и др.

Однако не только мутации, но и широко распространенные полиморфные варианты генов могут определять различия в ответе на прием макро- и микронутриентов у человека. В настоящее время вопросам индивидуальных реакций на прием нутриентов в зависимости от генетических особенностей населения занимаются специалисты в области нутригеномики.

J. Karut и R.L. Rodriguez [25] указали, что «нутригеномика стремится обеспечить генетическое понимание того, как обычный химический состав диеты (т.е. питание) определяет баланс между здоровьем и болезнью посредством изменения экспрессии и (или) структуры индивидуального генетического состава», и сформулировали пять основных положений данного научного направления:

- обычный химический состав пищи влияет на геном человек либо напрямую, либо опосредованно;
- при определенных условиях у некоторых индивидов особенности питания могут выступать в качестве серьезного фактора риска ряда заболеваний;
- некоторые регулируемые питательными веществами (диетой) гены, вероятно, играют роль в определении начала, прогрессии и (или) клинической картины течения хронических заболеваний;
- степень влияния диеты на баланс между болезнью и здоровьем может определяться индивидуальными генетическими особенностями;
- подбор диеты, основанный на знаниях о пищевых потребностях, обеспеченности каждого отдельного организма нутриентами и генотипе («индивидуализированное питание»), может быть использован для предупреждения, облегчения течения или лечения хронических заболеваний.

Известно, что дефицит ряда микронутриентов (человеку для нормального функционирования организма требуется приблизительно 40 различных микронутриентов) приводит к развитию заболеваний сердечно-сосудистой системы (витамины группы В, витамин Е, каротиноиды; кальций, магний и др.), онкопатологии (фолаты, каротиноиды), дефекта нервной трубки (фолаты), определяют массу костей (витамин D); дефицит витаминов (В12, В6, С, Е, фолиевая кислота, никотиновая кислота) и некоторых металлов (Fe, Zn) может приводить к различным повреждениям ДНК (цит. по [25]). Например, к повреждениям, характерным при радиационном воздействии (радиационная мимикрия), приводит дефицит витамина С (при этом увеличивается риск развития онкопатологии и катаракты (в 4 раза)) и витамина Е (увеличивается риск развития рака толстой кишки (в 2 раза), болезней сердца (в 1,5 раза), иммунной дисфункции) и др. [25]. В то же время, как показали многочисленные исследования (в том числе и GWAS, см. табл. 4), уровень микронутриентов может отличаться у индивидов с различными генетическими вариантами. Такая ситуация наблюдалась, в частности, в отношении уровня витаминов в сыворотке крови – А, В6, В12, D, Е, фолиевой кислоты (табл. 4).

Таблица 4

Полиморфные варианты, показавшие ассоциации с уровнем некоторых витаминов в организме человека и потреблением нутриентов (по данным GWAS*)

| Витамины и нутриенты | rs | Ген | p | Другие признаки, ассоциированные с SNP |
|-------------------------|----------|--------------------|---------------------|--|
| Витамин B ₁₂ | 492602 | FUT2 | 1·10 ⁻¹⁷ | Уровень общего холестерина |
| | 1047781 | | 4·10 ⁻³⁶ | Маркеры онкопатологии |
| | 602662 | | 2·10 ⁻¹⁵ | – |
| | | | 3·10 ⁻²⁰ | – |
| | 2298585 | MS4A3 | 1·10 ⁻¹⁵ | – |
| | 526934 | TCN1 | 2·10 ⁻¹⁰ | – |
| | | | 2·10 ⁻⁶ | – |
| | 3760776 | FUT6 | 4·10 ⁻¹³ | Маркеры онкопатологии; уровень N-гликанов |
| | 41281112 | CLYBL | 9·10 ⁻¹⁰ | – |
| | 1801222 | CUBN | 3·10 ⁻⁹ | – |
| | 11254363 | | 1·10 ⁻⁶ | – |
| 9473555 | MUT | 5·10 ⁻⁸ | – | |
| 10515552 | – | 4·10 ⁻⁸ | – | |
| 12377462 | – | 2·10 ⁻⁶ | – | |
| Витамин B ₆ | 4654748 | NBPF3 | 8·10 ⁻¹⁸ | Активная форма перидоксаль-5'-фосфата |
| Витамин D | 2282679 | GC | 2·10 ⁻¹⁴ | Недостаточность витамина D |
| | | | 2·10 ⁻²⁹ | |
| | 3829251 | NADSYN1 | 3·10 ⁻⁹ | – |
| | 2060793 | CYP2R1 | 3·10 ⁻¹⁷ | – |
| Витамин E | 964184 | ZNF259 | 8·10 ⁻¹² | Изменение в уровне альфа-токоферола в ответ на прием витамина E; уровень общего холестерина, холестерина липопротеидов высокой плотности; холестерина липопротеидов низкой плотности, триглицеридов; активность липопротеинассоциированной фосфолипазы 2; гипертриглицеридемия; ишемическая болезнь сердца |
| | 2108622 | CYP4F2 | 1·10 ⁻¹⁰ | Уровень глицеролфосфохолина; уровень альфа-токоферола; поддерживающая доза варфарина и аценокумарола |
| | 11057830 | SCARB1 | 8·10 ⁻⁹ | – |
| Витамин A | 10882272 | FFAR4 | 7·10 ⁻¹⁵ | – |
| | 1667255 | | 6·10 ⁻¹⁴ | – |
| Фолат | 982393 | FIGN | 8·10 ⁻⁸ | – |
| | 153734 | PRICKLE2-AS1 | 7·10 ⁻⁶ | – |
| Углеводы | 197273 | TANK | 2·10 ⁻⁵ | – |
| | 10163409 | FTO | 3·10 ⁻⁸ | – |
| | 838145 | IZUMO1 | 3·10 ⁻⁷ | – |
| Жиры | 838145 | IZUMO1 | 4·10 ⁻¹⁰ | – |
| Белки | 838133 | FGF21 | 8·10 ⁻⁹ | Уровень гомоцистеина |
| | 1421085 | FTO | 1·10 ⁻⁹ | Ожирение |

Примечание. * – составлено по [4, 28]; p – достигнутый уровень значимости.

Известны и другие примеры генетической обусловленности в потребности нутриентов: G1958A (rs2236225) в гене *MTHFD1* – развитие дефицита холина при низком его содержании в принимаемой пище [26]; rs12325817 гена *PEMT* – большая потребность в холине у женщин [28] и др. В обзоре M.D. Lucock и соавт. [6] приведены гены, эффект которых в той или иной степени зависит от компонентов пищи, в том числе *SLC24A5* (витамин D), *AMY1* (крахмал), *LCT* (лактоза), *ALDH2* (алкоголь), *ACE* (соль), кластер генов *FAD* (полиненасыщенные жирные кислоты), *C282Y* (железо), *AGT* (мясо), *CYP450* и *GST* (растительные алкалоиды и другие ксенобиотики) и др. При этом, с одной стороны, в ряде случаев для полиморфных вариантов, которые влияли на уровень витаминов, установлены ассоциации с заболеваниями (или патогенетически значимыми признаками – см. табл. 4), с другой – показаны существенные различия по частоте регистрации аллельных вариантов этих генетических маркеров у представителей различных расовых групп населения. Напри-

мер, по rs964184 гена *ZNF259* частота аллеля C варьирует в пределах 0,125–0,900, по rs1047781 гена *FUT2* аллель T не регистрировался в обследованных выборках европеоидов и достигал величины 0,478 у представителей других групп населения [29]. Помимо приведенных в табл. 4 ряд других полиморфных вариантов генов, ассоциированных с уровнем витаминов, показали связь с патогенетически значимыми признаками и заболеваниями. В частности, по данным GWAS [4], варианты гена *FUT2* ассоциированы с уровнем гомоцистеина, почечных ферментов (щелочной фосфатазой, гамма-глутаматтрансферазой), болезнью Крона, биполярным расстройством, ишемической болезнью сердца; варианты гена *CLYBL* – с синдромом дефицита внимания и гиперреактивности; гена *GC* – неалкогольной жировой болезнью печени; гена *ZNF259* – с уровнем различных липидных показателей, с метаболическим синдромом. С таким широко распространенным в современных популяциях патологическим состоянием, как ожирение, ассоциированы более полусотни генов [5, 6].

На прием макронутриентов также может быть разный ответ у лиц в зависимости от их генотипических особенностей (табл. 4). По данным метаанализа GWAS с уровнем потребления белка установлена ассоциация ($p = 9,96 \cdot 10^{-10}$) аллеля rs1421085 (ген *FTO*), для которого ранее была показана ассоциация с более высокими значениями индекса массы тела, а rs838145 (локализован в интроне гена *IZUMO1*) был ассоциирован с высоким уровнем потребления углеводов ($p = 1,68 \cdot 10^{-8}$) и низким уровнем потребления жира ($p = 1,57 \cdot 10^{-9}$) [30]. Что касается последнего из упомянутых SNP, то авторы отнесли его к категории кандидатного ген-ростового фактора фибробластов *FGF21* (локализован вблизи гена *IZUMO1*), продукт которого вовлечен в метаболизм глюкозы и липидов, так как данный полиморфный вариант был ассоциирован с концентрацией циркулирующего белка *FGF21* (но не с уровнем мРНК). Особенности питания были выявлены у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа, имеющих генотип AA по rs99939609 гена *FTO*: для них характерно было повышенное потребление жиров и низкий уровень потребления клетчатки [31]. В другом исследовании было показано, что недостаточность витамина D способствует увеличению массы тела у детей, обладающих рискованным аллелем rs9939609 гена *FTO*, но такой зависимости не зарегистрировано у детей с нормальным потреблением витамина D [32].

Макронутриенты также могут модулировать ассоциации с патологическими состояниями, как это было показано, в частности, для полиморфных вариантов генов *PLIN*, *FTO*, *MC4R* [33, 34]. Так, несмотря на то что не установлено зависимости ряда антропометрических показателей, информативных для оценки ожирения (окружность талии и бедер, индекс массы тела), от генотипов по полиморфному варианту 11482G/A (rs894160) гена *PLIN*, показано, что у лиц, в питании которых был высокий уровень потребления сложных углеводов, более редкий аллель (A) выступал в качестве протективного для развития ожирения, а у индивидов с низким уровнем потребления сложных углеводов, напротив, данный аллельный вариант показал ассоциацию с риском развития ожирения [33]. Только у лиц, не придерживающихся средиземноморской диеты, показан риск развития сахарного диабета 2-го типа у обладателей производных аллелей по rs9939609 гена *FTO* и rs17782313 гена *MC4R* по сравнению с обладателями предковых аллелей [34].

С учетом вышеприведенных данных вполне ожидаемым является то, что ответ на прием макро- и микронутриентов также может быть генетически детерминированным. Так, при проведении широкогеномного ассоциативного исследования J. M. Major и соавт. [35] выявили ряд SNP, включая три независимых локуса (rs964184, rs12272004, rs7834588), ассоциированных с уровнем альфа-токоферола в сыворотке крови в ответ на длительный прием витамина E, причем два первых из трех указанных вариантов локализованы вблизи генов, задействованных в транспорте и метаболизме витамина E (*BUD13*, *CYP4F2*), а третий – в гене *NKAIN3* (Na⁺/K⁺ transporting ATPase interacting 3). Более выраженное снижение массы тела в ответ на низкокалорийную диету (с высоким содержанием как мононенасыщенных, так и полиненасыщенных жиров) наблюдалось у лиц, гомозиготных по аллелю Trp64 поли-

морфного варианта Trp64Arg гена *ADRB3* по сравнению с обладателями других генотипов, а улучшение таких показателей, как уровень холестерина, холестерина липопротеинов низкой плотности, триглицеридов, глюкозы инсулина и других, было более значимо у обладателей гетерозиготных генотипов по данному полиморфному варианту [36]. Установлено также, что у здоровых мужчин полиморфный вариант 211377C/G гена адипонектина (*ADIPOQ*) может выступать в качестве фактора, обуславливающего различия в ответе на чувствительность к инсулину после применения диеты, обогащенной мононенасыщенными жирными кислотами, и диеты, обогащенной углеводами [37].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что в зависимости от генетических особенностей индивиды могут различаться в потребностях макро- и микронутриентов, которые важны для нормального функционирования организма. От генетических особенностей может зависеть и рекомендуемые профилактические, а также лечебные назначения.

Не только потребности в макро- и микронутриентах могут зависеть от генетических вариантов тех или иных генов, но сами нутриенты оказывают влияние на функционирование генов, что достигается посредством различных механизмов: 1) нутриенты могут непосредственно взаимодействовать с рецептором, который связывается с ДНК и индуцирует экспрессию генов (например, взаимодействие витамина D с геном рецептора витамина D (*VDR*), кальция – с кальцинурином) и т.д.; 2) нутриенты участвуют в эпигенетических модификациях (на уровне регуляции транскрипции (посредством метилирования ДНК и гистонов) и трансляции (посредством остановки трансляции мРНК с помощью микро-РНК) [38, 39]. Так, известно, что и макронутриенты (жиры, белки, алкоголь), и микронутриенты (витамин E) изменяют уровень экспрессии многих микро-РНК и вовлечены в фолатзависимый метаболизм одноуглеродных соединений (см. рис. 2), играющий ключевую роль в процессах метилирования ДНК и гистонов (витамины B₁₂, B₆, B₂, фолат, Zn, Se, белок и др.) (цит. по [39]).

Эпигенетическая модификация генома как причина развития многофакторных болезней – одно из активно развивающихся направлений современных геномных исследований [39–41]. Так, A.P. Feinberg [41] рассматривает несколько моделей формирования риска болезни на основании изменения ДНК: 1) модель формирования риска независимо от эпигенетических механизмов (эта модель преобладала в исследованиях по изучению генетики многофакторных болезней до настоящего времени); 2) гены могут выступать в качестве посредников эпигенетических модификаций других генов (т.е. изменения в генах, управляющих «эпигенотипом»; например, в генах фолатного цикла, что может сказаться на поддержании метилирования ДНК); 3) модель, где эффект генетического варианта будет зависеть от его эпигенетического контекста (подробнее – см. [41]). Из трех предложенных моделей две так или иначе учитывают эпигенетические изменения в организме. В связи с этим следует также отметить, что накопление эпигенетических изменений с возрастом происходит довольно интенсивно (более выражены, чем соматические геномные нарушения), и это может быть объяснением накопления многофакторных болезней у пожилых людей.

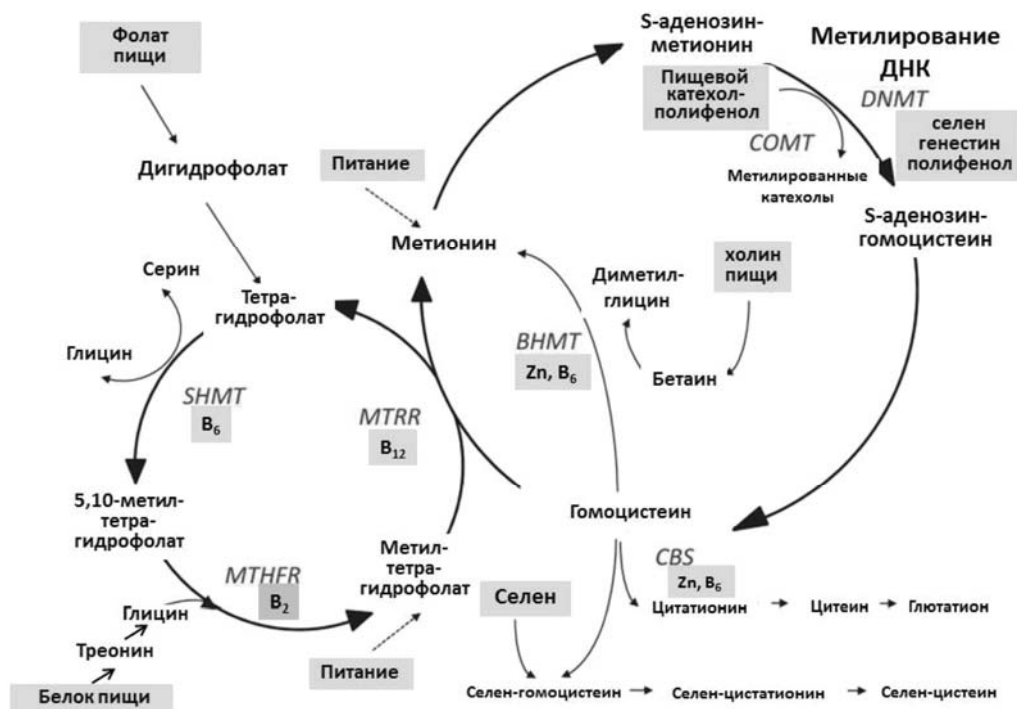


Рис. 2. Основные пути фолатазависимого метаболизма одноуглеродных соединений. Курсивом приведены гены, продукты которых вовлечены в данный физиологический процесс, на сером фоне указаны нутриенты и компоненты питания, значимые для данного метаболического пути (составлено по [39])

Для генов, продукты которых задействованы в процессах метилирования, известны ассоциации с многочисленными заболеваниями многофакторной природы и клинически значимыми биохимическими показателями. Так, полиморфные варианты, локализованные в гене *SHMT*, ассоциированы с различными онкологическими заболеваниями; в гене *MTRR* – с дефицитом фолиевой кислоты и витамина B_{12} , гипергомоцистеинемией, онкопатологией, тромбозом, в гене *COMT* – с различными психическими заболеваниями (шизофрения, болезнь Альцгеймера и др.), гипертонией, ишемией миокарда; в гене *CBS* – с уровнем гомоцистеина; в гене *MTHFR* – с уровнем гомоцистеина, сахарным диабетом типа 1 и 2, гипертонией, гиперхолестеринемией, атеросклерозом, инфарктом миокарда и т.д. [29, 42]. Одним из наиболее изученных генетических вариантов является С677Т в гене *MTHFR*, замена С на Т приводит к снижению энзиматической активности, и обладатели гомозиготного генотипа имеют повышенный уровень гомоцистеина, пока они не начинают принимать высокие дозы фолата. Но так как нутриенты являются донорами метильных групп, а микронутриенты кофакторами энзимов, задействованных в фолатазависимом метаболизме одноуглеродных соединений, не только генетический полиморфизм, но и недостаток любого из этих веществ может повлиять на работу генов и функциональное состояние организма в целом. В то же время дефицит микронутриентов широко распространен, например, у пожилых австралийцев потребление от рекомендуемой нормы составляет: селена – 5%, кальция – 10%, железа – 11%, витамина А – 7%, витамина D – 10% (цит. по [6]). Понимание значимости микронутриентов в развитии сложноследуемых состояний уже сейчас привело к разработке профилактических и лечебных программ для раз-

личных заболеваний многофакторной природы (болезни сердечно-сосудистой системы, дефект нервной трубки, онкопатология и др.) [39, 43].

До настоящего времени в области генетики многофакторных заболеваний все еще преобладают исследования, посвященные выявлению групп риска развития многофакторных заболеваний и поиску мишеней для разработки таргетных лекарственных препаратов. Но представляются еще более актуальными исследования, направленные на понимание тех генетических и эпигенетических механизмов, сложившихся в ходе эволюции, которые определяют «генетически обоснованную персонализированную карту здоровья». Этой цели может послужить нутригеномика – быстро развивающаяся отрасль исследований, с огромным потенциалом, которая в дальнейшем может стать основой для разработки персонализированных рекомендаций по питанию с целью предупреждения развития болезней и даже их лечения [44]. В этом случае наличие генетического паспорта позволит каждому человеку самостоятельно сделать выбор между «генетикой для разработки стратегии здорового образа жизни» или «генетикой для определения карты болезней и для оптимизации тактики их лечения».

Литература

1. Hofker M., Fu J., Wijmenga C. The genome revolution and its role in understanding complex diseases // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014 May 13. pii: S0925-4439(14)00130-6. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.05.002.
2. Green E.D., Guyer M.S. National Human Genome Research Institute. Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside // *Nature*. 2011. V. 470. P. 204–212.
3. Пузырёв В.П., Кучер А.Н. Эволюционно-онтогенетические аспекты патогенетики хронических болезней человека // *Генетика*. 2011. Т. 47, № 12. С. 1573–1585.

4. *A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies*. http://www.genome.gov/gwastudies/index.cfm?pmid=23281178#result_table.
5. *Speakman J.R.* Evolutionary Perspectives on the Obesity Epidemic: Adaptive, Maladaptive, and Neutral Viewpoints // *Annu. Rev. Nutr.* 2013. V. 33. P. 289–317.
6. *Lucock M.D., Martin C.E., Yates Z.R., Veysey M.* Diet and Our Genetic Legacy in the Recent Anthropocene: A Darwinian Perspective to Nutritional Health // *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2014. V. 19(1). P. 68–83.
7. *Akey J.M., Zhang G., Zhang K. et al.* Interrogation a high-density SNP map for signature natural selection // *Genome Res.* 2002. V. 12. P. 1805–1814.
8. *Nielsen R., Bustamante C., Clark A.G. et al.* A scan for positively selected genes in the genomes of human and chimpanzees // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. № 6. P. 976–985.
9. *Carlson C.S., Thomas D.J., Eberle M.A. et al.* Genomic regions exhibiting positive selection identified from dense genotype data // *Genome Res.* 2005. V. 15. P. 1553–1565.
10. *Wang E.T., Kodama G., Baldy P., Moyzis R.K.* Global landscape of recent inferred Darwinian selection for Homo sapiens // *PNAS.* 2006. V. 103, № 1. P. 135–140.
11. *Biswas S., Akey J.M.* Genomic insights into positive selection // *Trends in genet.* 2006. V. 22, № 8. P. 437–446.
12. *Voight B.F., Kudaravalli S., Wen X., Pritchard J.K.* A map of recent positive selection in the human genome // *PLoS Biol.* 2006. V. 4(3). P. e72.
13. *Ding K., Kullo I.J.* Evolutionary genetics of coronary heart disease // *Circulation.* 2009. V. 119. P. 459–467.
14. *Adeyemo A., Rotimi C.* Genetic associated with complex human diseases show wide variation across multiple population // *Public health genomics.* 2010. V. 13. P. 72–79.
15. *Kullo I.J., Ding K.* Patterns of differentiation of candidate genes for cardiovascular disease // *BMC Genet.* 2007. V.8: P. 48 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/8/48>).
16. *Spielman R.S., Bastone L.A., Burdick J.T. et al.* Common genetic variants account for differenced in gene expression among ethnic groups // *Nat. Genet.* 2007. V. 39, № 2. P. 226–231.
17. *Enard D., Messer P.W., Petrov D.A.* Genome-wide signals of positive selection in human evolution // *Genome Res.* 2014. May 2.10.1101/gr.164822.113.
18. *Suo C., Xu H., Khor Ch. et al.* Natural positive selection and north–south genetic diversity in East Asia // *Europ. J. Hum. Genet.* 2012. V. 20. P. 102–110.
19. *Raj S.M., Pagani L., Romero I.G. et al.* A general linear model-based approach for inferring selection to climate // *BMC Genetics.* 2013. V. 14. P. 87. <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/14/87/>.
20. *Hancock A.M., Witonsky D.B., Ehler E. et al.* Human adaptation to diet, subsistence, and ecoregion are due to subtle shifts in allele frequency // *PNAS.* 2010. V. 107, Suppl. 2. P. 8924–8930.
21. *Perry G.H., Dominy N.J., Claw K.G. et al.* Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation // *Nat. Genet.* 2007. V. 39, № 10. P.1256–1260.
22. *Thompson E.E., Kuttub-Boulos H., Witonsky D. et al.* CYP3A variation and the evolution of salt-sensitivity variants // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 75, № 6. P. 1059–1069.
23. *Hancock A.M., Witonsky D.B., Gordon A.S. et al.* Adaptations to climate in candidate genes for common metabolic disorders // *PLoS Genet.* 2008. V. 4. P. e32.
24. *Young J.H., Chang Y.P., Kim J.D. et al.* Differential susceptibility to hypertension is due to selection during the out-of-Africa expansion // *PLoS Genet.* 2005. V. 1, № 6. P. e82.
25. *Kaput J., Rodriguez R.L.* Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era // *Physiol. Genomics.* 2004. V. 16. P. 166–177.
26. *Kohlmeier M., da Costa K.A., Fisher L.M., Zeisel S.H.* Genetic variation of folate-mediated one-carbone transfer pathway predicts susceptibility to choline deficiency in human // *PNAS.* 2005. V. 102. P. 16025–16030.
27. *Costa K.A. da, Kozyreva O.G., Song J. et al.* Common genetic polymorphisms have major effects on the human requirement for nutrient choline // *FASEB J.* 2006. V. 20. P. 1336–1344.
28. *Chu A.Y., Workalemahu T., Paynter N.P. et al.* Novel locus including FGF21 is associated with macronutrient intake // *Hum. Mol. Genet.* 2013. V. 22, № 9. P. 1895–1902.
29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.
30. *Tanaka T., Ngwa J.S., van Rooij F.J. et al.* Genome-wide meta-analysis of observational studies shows common genetic variants associated with macronutrient intake // *Am. J. Clin. Nutr.* 2013. V. 97(6). P. 1395–1402.
31. *Stemburgo T., Azevedo M.J., Gross J.L. et al.* The rs9939609 polymorphism in the FTO gene is associate with fat and fiber intakes in patients with 2 diabetes // *J. Nutrigenet. Nutrigenom.* 2013. V. 6(2). P. 97–106.
32. *Lourenco B.H., Qi L., Willett W.C. et al.* FTO genotype, vitamin D status, and weight gain during childhood // *Diabetes.* 2014. V. 63 (2). P. 808–814.
33. *Smith C.E., Tucker K.L., Yiannakouris N.* Perilipin Polymorphism Interacts with Dietary Carbohydrates to Modulate Anthropometric Traits in Hispanics of Caribbean Origin // *J. Nutr.* 2008. V. 138. P. 1852–1858.
34. *Ortega-Azorin C., Sorli J.V., Asensio E.M. et al.* Association of the FTO rs9939609 and MC4R rs17782313 polymorphism with type 2 diabetes are modulated by diet, being higher when adherence to the Mediterranean diet pattern is low // *Cardiovas. Diabetol.* 2012. V. 11. P. 137. (<http://www.cardiab.com/content/11/1/137>).
35. *Major J.M., Yu K., Chung Ch.C.* Genome-Wide Association Study Identifies Three Common Variants Associated with Serologic Response to Vitamin E in Men // *J. Nutr.* 2012. V. 142. P. 866–871.
36. *Luis D.A. de, Aller R., Izaola O. et al.* Genetic variation in the beta 3-adrenoreceptor gene (Trp64Arg polymorphism) and its influence on anthropometric parameters and insulin resistance under a high monounsaturated versus a high polyunsaturated fat hypocaloric diet // *Ann. Nutr. Metab.* 2013. V. 62(4). P. 303–309.
37. *Perez-Martinez P., Lopez-Miranda J., Cruz-Teno C. et al.* Adiponectin Gene Variants Are Associated with Insulin Sensitivity in Response to Dietary Fat Consumption in Caucasian Men // *J. Nutr.* 2008. V. 138. P. 1609–1614.
38. *Zeisel S.H.* Nutrigenomics and metabolomics will change clinical nutrition and public health practice: insights from studies on dietary requirements for choline // *Am. J. Clin. Nutr.* 2007. V. 86. P. 542–548.
39. *McKay J.A., Mathers J.C.* Diet induced epigenetic changes and their implication for health // *Acta Physiol.* 2011. V. 202. P. 103–118.
40. *Relton C.L., Smith G.D.* Epigenetic Epidemiology of common complex disease: prospects for prediction, prevention, and treatment // *PLoS Medicine.* 2010. V. 7, № 10. P. e1000356.
41. *Feinberg A.P.* Genome-scale approaches to the epigenetics of common human disease // *Virchows Arch.* 2010. V. 456. P. 13–21.
42. *Genetic Association Database.* <http://geneticassociationdb.nih.gov/cgi-bin/index.cgi>
43. *Пырочкин В.М., Снежицкий В.А., Шейбак В.М. и др.* Способ профилактики повторного инфаркта миокарда путем коррекции уровня гомоцистеина, гипоселенемии и дисфункции эндотелия у пациентов с ишемической болезнью сердца. Инструкция по применению. Гродно: Гродн. гос. мед. ун-т, 2009. 6 с.
44. *Ordovas J.M.* Genotype–Phenotype Associations: Modulation by Diet and Obesity // *Obesity.* 2008. V. 16, Suppl. 3. P. S40–S46.

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ АРХИТЕКТУРЫ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА И ХРОМОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ

А.А. Кашеварова^{1,2}, Н.А. Скрябин^{1,2}, И.Н. Лебедев^{1,2}

¹ ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН, г. Томск

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

Понятие архитектуры генома объединяет в себе структуру, содержание и организацию наследственного материала, включая расположение и порядок генов в хромосоме [1]. Нарушение любого из этих уровней может привести к развитию патологического процесса, будь то неаллельная гомологичная рекомбинация между сегментными дупликациями генома, приводящая к хромосомным микроделециям и микродупликациям, экспансия тринуклеотидных повторов и микросателлитов, аномалии упаковки хроматина или изменение хромосомных территорий в ядре. В данном обзоре будет рассмотрен один аспект архитектуры генома, ассоциированный с хромосомными заболеваниями человека – сегментные дупликации (segmental duplications (SDs)).

SDs в геноме человека представляют собой крупные, высоко идентичные и распределенные по геному последовательности, обычно разделенные уникальными последовательностями размером более 1 Мб. Большинство SDs человека группируются примерно в 400 областях генома, образуя так называемые дупликационные блоки (рис. 1) [2]. Внутри этих блоков SDs представляют собой мозаику из дупликонов различного происхождения. Дополнительные раунды дупликации внутри дупликационных блоков являются отличительной чертой гоминоидов [3].

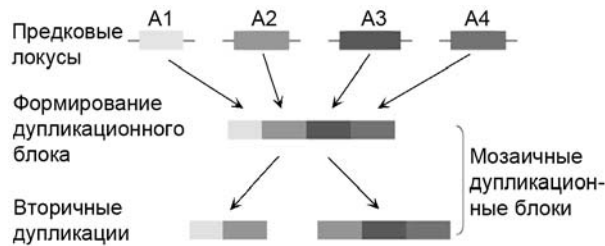


Рис. 1. Формирование дупликационных блоков (по [4])

Установлено, что по содержанию SDs к геному человека ближе всего геном шимпанзе. Оба генома в среднем содержат по 5% дупликаций. Около 66% SDs являются общими для человека и шимпанзе, остальные же 34% регионов дуплицированы только у человека, включая ряд областей, ассоциированных с патогенными микроструктурными хромосомными перестройками (микроделеция 7q11.23 при синдроме Вильямса–Бойрена; микроделеция 2q13 при нефронофтисисе, тип 1; микроделеция 15q11.2q11.3 при синдромах Ангельмана и Прадера–Вилли и др.). Значительное количество специфичных для человека SDs расположено на хромосомах 5 и 15 [5]. В геноме орангутана SDs на 40% меньше, чем у человека или шимпанзе. Геном макаки содержит всего 2,4% дупликаций, в основной массе отличающихся от тех, что присутствуют у человека. Эти данные подтверждают модель, в которой накопление SDs ускорилось после отделения африканских приматов (шимпанзе, горилла и человек) от азиатских (орангутана). Интересно, что увеличение количества SDs в этот период проходило на фоне замедления других мутационных процессов,

таких как точковые мутации и перемещение ретротранспозонов [6].

Содержание SDs в геномах других млекопитающих, не приматов, менее изучено. Исключением является геном мыши, который, как и геном человека, содержит около 5% дупликаций, однако их организация значительно отличается от таковой у человека. 88 и 33% крупных дупликаций (более 20 кб) у мыши и человека соответственно образуют тандемы. В целом эти данные указывают на фундаментальный сдвиг в организации и эволюции SDs приматов, среди которых мозаичная архитектура и экспансия высоко идентичных распределенных по геному внутрихромосомных дупликаций являются наиболее выраженными в геномах человека и человекообразных обезьян [6].

Связь между сегментными дупликациями, эволюцией и патологией

SDs могут быть ориентированными в одном направлении (прямые SDs) и в противоположных (обратные SDs). Путем неаллельной гомологичной рекомбинации (nonallelic homologous recombination (NAHR)) между прямыми SDs будут возникать делеции и дупликации. В случае обратных SDs NAHR приведет к образованию инверсий (рис. 2). Показано, что 12% генома человека потенциально предрасположены к инверсиям путем NAHR, приводя к вторичному по отношению к микроструктурной хромосомной мутации повреждению примерно 942 генов, включая 99 генов X-хромосомы [8].

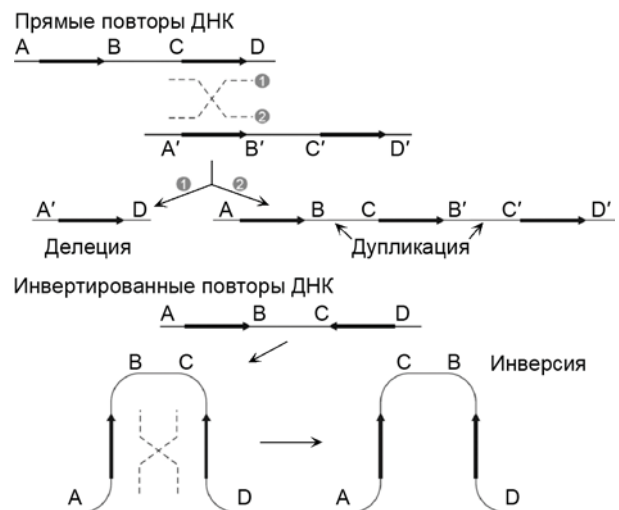


Рис. 2. Механизмы формирования структурных хромосомных aberrаций вследствие неаллельной гомологичной рекомбинации между сегментными дупликациями генома [7]

Что касается перекрывающихся нерекуррентных вариаций числа копий ДНК (copy number variations (CNVs)) различного размера, архитектура генома также может стимулировать их образование, но потенциально посредством недавно опи-

санного механизма, основанного на процессе репликации и получившего название опосредованной микрогомологии, индуцированной разрывами репликации (microhomology-mediated break-induced replication (MMBIR)) и остановки вилки репликации и перемены матрицы (fork stalling and template switching (FoSTeS)) [9–11].

SDs могут быть вовлечены в развитие патологического процесса не только за счет изменения числа копий участков ДНК, расположенных между ними, но и за счет непосредственного увеличения или уменьшения числа копий какого-либо гена или частей гена, расположенного внутри SD [12]. Большинство рекуррентных крупных CNVs, ассоциированных с нейрокognитивными расстройствами, принадлежат к первой категории, тогда как большинство полиморфных вариантов числа копий генов, ассоциированных с заболеваниями у человека, – ко второй [13].

Сравнение SDs человека и приматов показало, что, например, ген *SMN2*, ассоциированный со спинальной мышечной атрофией, дублирован как у человека, так и у шимпанзе [14]. Ген липопротеина *LPA* частично перекрывается с SD, сходной у человека, шимпанзе и макаки, в отличие от орангутана, у которого наблюдается уменьшение количества tandemных повторов. Экспансия данного блока повторов приводит к уменьшению уровня липопротеина А, выполняющего протекторную функцию при ишемической болезни сердца [13].

Для некоторых патогенных дубликаций был определен период их возникновения в эволюции. Так, например, дубликации LCR22, фланкирующие область проксимальной микроделеции 22q11.2, амплифицировались после отделения гоминоидов от обезьян Старого Света [15]. SDs, фланкирующие область синдрома Ангельмана (Прадера–Вилли), начали амплифицироваться до разделения обезьян Старого Света, в то время как блоки SDs, специфичные для синдрома Смит–Магенис, – после этого периода [16]. Этот сравнительный анализ указывает на то, что предрасполагающая к большинству структурных нарушений хромосом архитектура генома формировалась в течение последних 25 млн лет.

Области SDs предрасположены к бесконечным циклам перестроек. Если дубликации не элиминируются отбором, они могут индуцировать дополнительные раунды делеций, дубликаций и инверсий. Неудивительно, что уникальные гены, расположенные рядом с предковыми дубликациями, имеют в 20 раз большую вероятность быть дублированными [5, 17]. Учитывая высокий динамизм этих областей,

часто обнаруживаются рекуррентные перестройки в практически одних и тех же областях генома. Например, полиморфная область в сегменте Xq28 размером 150 кб была инвертирована в эволюции плацентарных млекопитающих множество раз [18] частично благодаря наличию дублированных последовательностей в точках инверсии у практически всех видов млекопитающих. Полиморфный участок в области 17q21.31 размером 970 кб инвертировался по меньшей мере три раза независимо у орангутана, человека и шимпанзе [19, 20]. Данная инверсия часто встречается в европейских популяциях, ассоциирована с повышенным уровнем рекомбинации и плодовитостью у женщин [21] и является предрасполагающим фактором к возникновению синдрома микроделеции 17q21.31 (синдром Кулена–де Ври) [22–24]. Как инверсия, так и предрасположенность к микроделециям в европейской популяции являются следствием архитектуры дубликаций, которая эволюционировала в ряду высшие приматы – человек.

Известно несколько регионов в геноме, ассоциированных с микроделеционными и микродубликационными синдромами, когда в области SD находятся гены, представленные десятками копий. Наибольшее специфичное для человека количество копий обнаружено для генов *NBPF*, *NPIP*, *GOLGA* и *TBC1D3* (таблица). Чрезвычайно интересным представляется семейство генов *GOLGA*, множество копий которых распределено по всей хромосоме 15, включая точки разрывов при микроделециях, микродубликациях, инвертированных дубликациях и трипликациях участков данной хромосомы. Считается, что увеличение копийности генов в ходе эволюции приматов дало преимущества для выживания, тогда как возникновение микроструктурных хромосомных перестроек в областях, фланкированных SDs, является отрицательным побочным эффектом организации данных регионов [25].

Лишь в 2013 г. была описана первая микроделеция размером 1,7 Мб в сегменте 17p11.2 (включая ген *RAI1*) у шимпанзе с клинической картиной человеческого синдрома Смит–Магенис [26]. Признаки данного синдрома, обнаруженные у шимпанзе: агрессия, ожирение и пороки развития почек. Примечательно, что геном шимпанзе в области 17p11.2 имеет более сложную архитектуру и отличные точки разрывов по сравнению с человеком. Вероятно, это связано с тем, что экспансии у шимпанзе подверглись другие дубликационные блоки, также предрасполагающие к NAHR в данном локусе.

Семейства многокопийных генов, фланкирующих области микроструктурных хромосомных перестроек

| Ген | Функция | Число копий в геноме человека | Хромосомный регион | Ассоциированные геномные нарушения |
|---------------|---|-------------------------------|--------------------|--|
| <i>NBPF</i> | Предположительно ДНК-связывающийся транскрипционный фактор [27] | 40–60 | 1q21.1 | Синдромы микроделеции и микродубликации 1q21.1, синдром тромбоцитопении и аплазии лучевой кости |
| <i>GOLGA</i> | Белок комплекса Гольджи [28] | 35 | 15q | Синдромы Прадера–Вилли, Ангельмана, микроделеции и микродубликации 15q13, микроделеции 15q24, другие перестройки области 15q |
| <i>NPIP</i> | Белок, взаимодействующий с ядерным поровым комплексом [28] | 20–30 | 16p | Синдромы микроделеций и микродубликаций 16p11.2 и 16p13.11 |
| <i>TBC1D3</i> | ГТФаза-активирующий белок [28] | 25 | 17q12 | Синдромы микроделеции и микродубликации 17q12 |

При проведении крупномасштабного, основанного на клонгах секвенирования было показано, что геномы человека и шимпанзе обладают наиболее сложной структурой [19]. Таким образом, молекулярные причины таких заболеваний, как шизофрения, эпилепсия, интеллектуальные нарушения и задержка развития, частично являются результатом гоминид-специфичной архитектуры дупликаций, которая появилась в течение эволюции этих видов.

SD-направленная эволюция генов

Множество генов внутри самих SDs в ходе эволюции подверглись диверсификации и неофункционализации. Так, например, продукт гена *AANAT* у беспозвоночных участвует в детоксикации эндо- и экзогенных арилалкаламинов и полиаминов. В результате дупликации у позвоночных белок *AANAT* приобрел способность превращать серотонин в мелатонин (регулятор суточных ритмов), что, в свою очередь, способствовало развитию эпифиза [29]. Подобное внутриврохромосомное ремоделирование с участием SDs обычно происходит в эухроматиновых областях хромосом. Многие из таких генов расположены в паралогичных областях, подверженных рекуррентным патогенным перестройкам, как при синдромах микроделеции 16p11.2, микроделеции и микродупликации 16p13.11, проксимальных микроделеции и микродупликации 22q11.2, Вильямса, Прадера–Вилли, Смит–Магенис, при нейрофиброматозе и спинальной мышечной атрофии. Классическим примером внутриврохромосомного ремоделирования является семейство генов сна *NPIP*, расположенных в дупликационных блоках LCR16a. Количество копий сегмента хромосомы 16 (LCR16a) размером 20 кб увеличилось с 1–2 у обезьян Старого света до 15–20 у человека и шимпанзе [30]. Подобный паттерн эволюционной динамики привел к изменению экспрессии генов этого семейства – от специфичной экспрессии в яйцках у павиана до экспрессии во всех тканях у человека и близких приматов [13].

Межхромосомное ремоделирование заключается в слиянии дублированных сегментов различных хромосомных регионов, приводящем к возникновению новых генов. Например, ген трипсиногена IV возник в результате слияния гена *PRSS3* (7q35) и LOC120224 (11q24) [4, 31]. Такое соседствующее расположение SDs с хромосом 7 и 11 произошло после отделения гоминид от обезьян Старого Света.

Микроделеционные и микродупликационные синдромы

К настоящему времени описано более 211 микроделений и 79 микродупликаций у пациентов с нарушениями развития и умственной отсталостью (УО). Реципрокные мутации (микроделеции и микродупликации одной и той же области) показаны только для 56 локусов (21%) [32]. В то же время с использованием биоинформационного подхода было предсказано большее количество регионов в геноме человека, потенциально подверженных возникновению хромосомных мутаций путем NAHR. Так, в одной из первых работ на основе версии генома hg16 было предположено существование 130 геномных областей размером 0,05–10 Мб, фланкированных прямыми паралогичными SDs размером более 10 кб с идентичностью последовательности ДНК более 95% и предрасположенных к микрострук-

турным перестройкам [33]. Используя те же условия, но более новую версию генома hg19 Liu и соавт. выявили 89 областей генома, предрасположенных к NAHR [34]. Различия в числе идентифицированных регионов авторы объясняют разными версиями генома и подходами, использованными для биоинформационного анализа. В другой работе на версии генома hg19 было предсказано 198 областей, потенциально подверженных NAHR, 105 из которых фланкированы прямыми паралогичными SDs или их кластерами. Остальные 93 региона находились внутри самих кластеров SDs [8]. 53 области были ассоциированы с известными NAHR-опосредованными делециями и реципрокными дупликациями на аутосомах и X-хромосоме. К геномным регионам с высокой плотностью SDs относятся 16p11.2p12.1 (22 пары SDs), 10q11.21q11.23 (18 пар SDs), 5q13.2 (13 пар SDs) и 15q25.2 (12 пар SDs). При сопоставлении результатов работ Sharp и соавт. [33] и Dittwald и соавт. [8] оказалось, что перекрываются только 92 предсказанные области (71%), в то время как все 89 регионов, показанных Liu [34], были также обнаружены в исследовании Dittwald. Из-за структурных различий между специфическими гаплотипами, возникшими в результате инверсии определенных участков ДНК, и референсным гаплотипом геномом Dittwald и соавт. не обнаружили две известные SD-опосредованные рекуррентные CNVs: небольшую делецию/дупликацию *CHRNA7* в области 15q13.3 и делецию/дупликацию 17q21.31, а также некоторые варианты перестроек в области синдрома микроделеции 15q24, которые фланкированы SDs с идентичностью последовательности менее 95%.

Кроме функционально значимых генов, 99% обнаруженных на данный момент CNVs затрагивают безгенные консервативные некодирующие последовательности (conserved noncoding sequences (CNSs)). CNSs занимают 1–2% генома человека и насчитывают около 327 тыс. вариантов. Большинство из них межгенные [35, 36]. Эволюционный анализ указывает на консервативную функциональную роль этих последовательностей [37, 38], а мутации в CNSs приводят к таким заболеваниям, как талассемия, преаксиальная полидактилия, X-сцепленная глухота, тип 3 [39–42]. Поскольку CNSs могут выступать в качестве дозозависимых элементов, CNVs, затрагивающие эти последовательности, будут вносить вклад в фенотипическую вариабельность или развитие заболеваний.

Клиническая значимость CNV главным образом определяется размером перестройки, количеством и статусом генов внутри аберрации и ее происхождением. Большинство патогенетически значимых CNVs содержат дозозависимый (гаплонедостаточный) ген, который приводит к развитию аномального фенотипического признака за счет увеличения или уменьшения количества его белкового продукта. И в отличие от моногенного заболевания, обусловленного единственным подобным геном, микроделеционные и микродупликационные синдромы [43] развиваются в результате CNVs, содержащих два и более дозозависимых гена, что обычно приводит к формированию более сложного фенотипа.

Нами на предмет наличия микроделений и микродупликаций обследовано 86 детей в возрасте от 2,5 до 18 лет: 14 детей в возрасте до 5 лет с задержкой интеллектуального развития и 72 ребенка

с идиопатической умственной отсталостью (IQ < 70 у детей старше 5 лет) [44, 45]. Сбор клинического материала осуществлялся на базе генетического клиники ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН. Проведение исследования одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИИМГ» СО РАМН. Информированное согласие от родителей пробандов получено во всех случаях. У всех пациентов исключены крупные хромосомные перестройки, биохимические дефекты и некоторые известные моногенные наследственные синдромы, проявляющиеся нарушениями интеллектуального развития ребенка (Мартина–Белл, Прадера–Вилли, Ангельмана). Большинство детей дополнительно имели различные фенотипические особенности.

У 37 пациентов с УО кариотип оказался нормальным. У 24 детей были выявлены нейтральные CNVs. Всего идентифицировано 6 NAHR-опосредованных патогенных CNVs, ассоциированных с синдромами микроделеций 15q24 (2 пациента), 16p11.2 (3 пациента) и синдромом проксимальной микроделеции 22q11.2 (1 пациент). У одного пробанда обнаружена 12,5 Мб делеция в области синдрома кошачьего крика, которая также содержит SDs. В кариотипах остальных 18 пациентов были обнаружены 23 потенциально патогенные хромосомные мутации. При сопоставлении наших данных с «горячими» областями CNVs оказалось, что регионы всех выявленных нами микроделеционных синдромов и делеции в области синдрома кошачьего крика были предсказаны на молекулярном уровне. Кроме них с данными литературы о наличии SDs пересекались обнаруженные нами впервые области потенциально патогенных del2q12.3 и dup10q11.21q11.22. Возможно также, что не все области были предсказаны. Так, у 2 пробандов были обнаружены реципрокные перестройки del3p26.3 и dup3p26.3, содержащие только один ген (*CNTN6*), кодирующий белок контактин 6, участвующий в обеспечении взаимодействия между аксонами при развитии нервной системы. И, наконец, 7 предсказанных областей пересекались с регионами нейтральных вариаций.

Дополнительно кроме пациентов с УО нами был проведен поиск микроструктурных хромосомных мутаций в плацентарных тканях спонтанных абортусов (СА) с диагнозом «анэмбриония», полученных от пар с невынашиванием беременности [46]. При исследовании 13 СА было обнаружено 142 CNV, из которых 21 заслуживала внимания с точки зрения возможного влияния на процессы внутриутробного развития, поскольку до настоящего времени не была описана у здоровых индивидов или при патологии. В 9 случаях (del3q13.31q13.32, del4q13.1q13.2, del5q14.3, dup5q35.3, del7q21.11, del8p22, del10q21.3, dup11p15.1, del18p11.32p11.31), согласно базе данных университета Калифорнии Санта-Крус [48], в областях перестроек содержались мелкие SDs. Наибольшее внимания здесь заслуживает область 10q21.3, содержащая единственный ген *CTNNA3*, кодирующий белок адгезионного комплекса в эпителиальных клетках [28]. Данная область и ген были обозначены как возможно ассоциированные с нарушением внутриутробного развития и в работах других авторов [49]. Нами микроделеция 10q21.3 была выявлена у 2 из 13 эмбрионов. Остальные перестройки являлись нейтральными или не содержали генов. 13 нейтральных CNV перекрывались с «горя-

чими» областями перестроек. Фенотипически нейтральные del8q11.22 и del/dup15q11.2 наиболее часто встречались в обследованных нами выборках как среди пациентов с интеллектуальными нарушениями, так и в случаях анэмбрионии.

Заключение

Дуплицированные последовательности являются основой для возникновения новых генов, увеличения копийности существующих генов, дающих преимущества видам в борьбе за выживание, и в то же время обуславливают геномную нестабильность, которая может быть фенотипически нейтральной или патогенетически значимой. Современное развитие молекулярно-цитогенетических технологий, в частности матричной сравнительной геномной гибридизации, позволяет выявлять такую форму структурной геномной вариабельности, как вариации числа копий ДНК (CNV), клиническая значимость которых не всегда однозначно понятна. У человека патогенные CNV чаще всего ассоциированы с задержкой развития, нейropsychическими нарушениями и дисморфиями, и выделены отдельные микроделеционные и микродупликационные синдромы, в то время как у наиболее эволюционно близких к человеку приматов лишь недавно описан первый микроделеционный синдром, по клиническим проявлениям соответствующий синдрому Смит–Магенис у человека. С одной стороны, отсутствие подобных синдромов у приматов может быть связано с тем, что пораженные особи оказываются неконкурентными в борьбе за выживание в дикой природе и рано погибают, не встречаясь человеку. С другой стороны, высокая частота патогенных структурных хромосомных мутаций у человека может быть обусловлена особенностями его архитектуры генома (в частности, большим числом копий дупликационных блоков) и является своеобразной платой за эволюционные преимущества, связанные с увеличением копийности генов в составе сегментных дупликаций.

Работа получила финансовую поддержку гранта CHERISH № 223692, федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (соглашения № 8720, 8727, 8276), гранта РФФИ № 14-04-32047 и гранта РФФИ № 14-15-00772.

Литература

1. http://www.ucdenver.edu/academics/colleges/medicalschoo/department/biochemistry/GraduatePrograms/genomics/Documents/ShaiKhLecture_022312.pdf
2. She X., Horvath J.E., Jiang Z. et al. The structure and evolution of centromeric transition regions within the human genome // *Nature*. 2004. V. 430 (7002). P. 857–864.
3. Johnson M.E., Cheng Z., Morrison V.A. et al. Recurrent duplication-driven transposition of DNA during hominoid evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2006. V. 103 (47). P. 17626–17631.
4. Jiang Z., Tang H., Ventura M. et al. Ancestral reconstruction of segmental duplications reveals punctuated cores of human genome evolution // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. P. 1361–1368.
5. Cheng Z., Ventura M., She X. et al. A genome-wide comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications // *Nature*. 2005. V. 437 (7055). P. 88–93.
6. She X., Jiang Z., Clark R.A. et al. Shotgun sequence assembly and recent segmental duplications within the human genome // *Nature*. 2004. V. 431 (7011). P. 927–930.

7. Lupski J.R. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet.* 1998. V. 14 (10). P. 417–422.
8. Dittwald P., Gambin T., Szafranski P. et al. NAHR-mediated copy-number variants in a clinical population: Mechanistic insights into both genomic disorders and Mendelizing traits // *Genome Res.* 2013. V. 23. P. 1395–1409.
9. Slack A., Thornton P.C., Magner D.B. et al. On the mechanism of gene amplification induced under stress in *Escherichia coli* // *PLoS Genet.* 2006. V. 2 (4). P. e48.
10. Lee J.A., Carvalho C.M., Lupski J.R. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders // *Cell.* 2007. V. 131 (7). P. 1235–1247.
11. Hastings P.J., Ira G., Lupski J.R. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation // *PLoS Genet.* 2009. V. 5 (1). e1000327.
12. Hastings P.J., Lupski J.R., Rosenberg S.M., Ira G. Mechanisms of change in gene copy number // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10 (8). P. 551–564.
13. Marques-Bonet T., Girirajan S., Eichler E.E. The origins and impact of primate segmental duplications // *Trends Genet.* 2009. V. 25 (10). P. 443–454.
14. Rochette C.F., Gilbert N., Simard L.R. SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to *Homo sapiens* // *Hum. Genet.* 2001. V. 108 (3). P. 255–266.
15. Babcock M., Yatsenko S., Hopkins J. et al. Hominoid lineage specific amplification of low-copy repeats on 22q11.2 (LCR22s) associated with velo-cardio-facial/digeorge syndrome // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16 (21). P. 2560–2571.
16. Park S.S., Stankiewicz P., Bi W. et al. Structure and evolution of the Smith-Magenis syndrome repeat gene clusters, SMS-REPs // *Genome Res.* 2002. V. 12 (5). P. 729–738.
17. Marques-Bonet T., Kidd J.M., Ventura M. et al. A burst of segmental duplications in the genome of the African great ape ancestor // *Nature.* 2009. V. 457. P. 877–881.
18. Cáceres M., Sullivan R.T., Thomas J.W. A recurrent inversion on the eutherian X chromosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104 (47). P. 18571–18576.
19. Zody M.C., Jiang Z., Fung H.C. Evolutionary toggling of the MAPT 17q21.31 inversion region // *Nat. Genet.* 2008. V. 40 (9). P. 1076–1083.
20. Bekpen C., Marques-Bonet T., Alkan C. et al. Death and Resurrection of the Human IRGM Gene // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. P. e1000403.
21. Stefansson H., Helgason A., Thorgeirsson G. et al. A common inversion under selection in Europeans // *Nat. Genet.* 2005. V. 37 (2). P. 129–137.
22. Bailey J.A., Baertsch R., Kent W.J. et al. Hotspots of mammalian chromosomal evolution // *Genome Biol.* 2004. V. 5. P. R23.
23. Koelen D.A., Vissers L.E., Pfundt R. et al. A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. P. 999–1001.
24. Shaw-Smith C., Pittman A.M., Willatt L. et al. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. P. 1032–1037.
25. Watson C.T., Marques-Bonet T., Sharp A.J., Mefford H.C. The Genetics of Microdeletion and Microduplication Syndromes: An Update // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2014. 15:6.1–6.30.
26. Sudmant P.H., Huddleston J., Catacchio C.R. et al. Evolution and diversity of copy number variation in the great ape lineage // *Genome Res.* 2013. V. 23. P. 1373–1382.
27. Zhou F., Xing Y., Xu X. et al. NBPF is a potential DNA-binding transcription factor that is directly regulated by NF- κ B // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013. V. 45 (11). P. 2479–2490.
28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
29. Falcón J., Coon S.L., Besseau L. et al. Drastic neofunctionalization associated with evolution of the timezyme AANAT 500 Mya // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111 (1). P. 314–319.
30. Johnson M.E., Viggiano L., Bailey J.A. et al. Positive selection of a gene family during the emergence of humans and African apes // *Nature.* 2001. V. 413 (6855). P. 514–519.
31. Rowen L., Williams E., Glusman G. et al. Interchromosomal segmental duplications explain the unusual structure of PRSS3, the gene for an inhibitor-resistant trypsinogen // *Mol. Biol. Evol.* 2005. V. 22. P. 1712–1720.
32. Weise A., Mrasek K., Klein E. et al. Microdeletion and microduplication syndromes // *J. Histochem Cytochem.* 2012. V. 60.(5). P. 346–358.
33. Sharp A.J., Hansen S., Selzer R.R. et al. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome // *Nat. Genet.* 2006. V. 38 (9). P. 1038–1042.
34. Liu P., Carvalho C.M., Hastings P., Lupski J.R. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2012. V. 22. P. 211–220.
35. Dermitzakis E.T., Reymond A., Scamuffa N. et al. Evolutionary discrimination of mammalian conserved nongenic sequences (CNGs) // *Science.* 2003. V. 302. P. 1033–1035.
36. Dermitzakis E.T., Reymond A., Antonarakis S.E. Conserved non-genic sequences - an unexpected feature of mammalian genomes // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. P. 151–157.
37. Tanabe H., Muller S., Neusser M. et al. Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 4424–4429.
38. Glazko G.V., Koonin E.V., Rogozin I.B. et al. A significant fraction of conserved noncoding DNA in human and mouse consists of predicted matrix attachment regions // *Trends Genet.* 2003. V. 19. P. 119–124.
39. Kioussis D., Vanin E., deLange T. et al. b-globin gene inactivation by DNA translocation on g- β -thalassaemia // *Nature.* 1983. V. 306. P. 662–666.
40. De Kok Y.J., Vossenaar E.R., Cremers C.W. et al. Identification of a hot spot for microdeletions in patients with X-linked deafness type 3 (DFN3) 900 kb proximal to the DFN3 gene *POU3F4* // *Hum. Mol. Genet.* 1996. V. 5. P. 1229–1235.
41. Lettice L.A., Horikoshi T., Heaney S.J.H. et al. Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 7548–7553.
42. Lettice L.A., Heaney S.J., Purdie L.A. et al. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly // *Hum. Mol. Genet.* 2003. V. 12. P. 1725–1735.
43. Schmickel R.D. Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes // *J. Pediatr.* 1986. V. 109 (2). P. 231–241.
44. Кашеварова А.А., Скрябин Н.А., Черемных А.Д. и др. Клинико-генетическая характеристика недифференцированной умственной отсталости на основе матричной сравнительной геномной гибридизации // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2013. № 9. С. 70–74.
45. Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Skryabin N.A. et al. Array CGH analysis of a cohort of Russian patients with intellectual disability // *Gene.* 2014. V. 536 (1). P. 145–150.
46. Лебедев И.Н., Кашеварова А.А., Скрябин Н.А. и др. Матричная сравнительная геномная гибридизация (аггау-СГН) в диагностике хромосомного дисбаланса и CNV-полиморфизма при анэмбрионии // *Журнал акушерства и женских болезней.* 2013. Т. LXII (2). С. 117–125.
47. Скрябин Н.А., Кашеварова А.А., Лебедев И.Н. Возможности и перспективы метода матричной сравнительной геномной гибридизации в клинической практике // *Якутский мед. журнал.* 2014. № 2. С. 51–52.
48. <https://genome-euro.ucsc.edu/index.html>
49. Rajcan-Separovic E., Diego-Alvarez D., Robinson W.P. et al. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss // *Hum Reprod.* 2010. V. 25 (11). P. 2913–2922.

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ГЕНЕТИКА В КОНТЕКСТЕ ЭВОЛЮЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ**М.В. Голубенко***НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск**НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, г. Кемерово
Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск*

Эволюционно сложившиеся особенности митохондриального генома человека (кодирование белковых субъединиц дыхательной цепи митохондрий, униродительское наследование, высокий темп мутирования, большое число копий в клетке) определяют интерес к нему как в области эволюционной генетики, так и в медицинской генетике. Благодаря эндосимбиотическому происхождению митохондрий мтДНК сохранила некоторые черты генома бактерий. Вместе с тем в ходе эволюции эукариот произошел перенос большинства митохондриальных генов в ядро. Таким образом, митохондриальный геном, обладая некоторой автономией, но находясь под контролем ядерного генома, представляет собой уникальную генетическую структуру, играющую ключевую роль в обеспечении функционирования человеческого организма. Филогеографические исследования позволили описать изменчивость митохондриальной ДНК практически во всех регионах мира и построить схему филогенетических связей между последовательностями мтДНК, а также установить географические особенности их распространения. Отдельные ветви на филогенетическом древе мтДНК человека – гаплогруппы – характеризуются набором последовательных мутаций, в том числе аминокислотных замен и мутаций в генах РНК. Возможное функциональное значение таких замен, традиционно рассматриваемых как нейтральный полиморфизм, является предметом дискуссий в митохондриальной генетике распространенных заболеваний. Функционально значимый полиморфизм мтДНК должен влиять на эффективность окислительного фосфорилирования, в результате чего могут изменяться скорость синтеза аденозинтрифосфата, концентрация активных форм кислорода, активность анаэробного дыхания, выработка тепла. Оптимальное соотношение этих процессов может быть различным в зависимости от условий окружающей среды. Учитывая разные климатические условия, в которых долгое время существовали человеческие популяции после расселения по планете, было предположено, что не только дрейф генов, но и отбор повлиял на картину географической дифференциации полиморфизма мтДНК, и это доказывается сдвигом соотношения синонимичных и несинонимичных замен в отдельных гаплогруппах, а также географическим градиентом распространенности субгаплогрупп, несущих замены, связываемые с климатической адаптацией [1–5]. Полиморфизм, являвшийся адаптивным в условиях сурового климата и недостатка пищи, может стать неблагоприят-

ным при изменении стиля жизни и питания, произошедшем в течение последних десятилетий. Избыток калорий, поступающих с пищей, стимулирует окислительное фосфорилирование и сопряженную с ним продукцию активных форм кислорода, что ведет к накоплению соматических мутаций мтДНК, вносящих вклад в развитие возрастзависимых заболеваний. С этим может быть связан и эффект антагонистической плейотропии некоторых вариантов мтДНК (преимущества в молодом возрасте и неблагоприятный эффект в позднем возрасте или наоборот) [6]. Многочисленные исследования полиморфизма мтДНК в связи с многофакторными заболеваниями, а также эксперименты, оценивающие функцию митохондрий в зависимости от генотипа мтДНК, показали, что популяционный полиморфизм мтДНК действительно может влиять на фенотип. Д. Уоллесом, определяющим жизнь как «взаимодействие между структурой, энергией и информацией», выдвинута гипотеза о центральной роли метаболизма энергии в климатической адаптации и возрастзависимых заболеваниях, в том числе нейродегенеративных и онкологических [7, 8]. Это подчеркивает значимость митохондриальной генетики в развитии концепции эволюционной медицины.

Литература

1. *Mishmar D. et al.* Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 171–176.
2. *Elson J.L. et al.* Comparative genomics and the evolution of human mitochondrial DNA: assessing the effects of selection // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 74. P. 229–238.
3. *Montiel-Sosa F., et al.* Differences in sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages // *Gene.* 2006. V. 368. P. 21–27.
4. *Ельцов Н.П. и др.* Роль естественного отбора в эволюции митохондриальных гаплогрупп северо-восточной Евразии // *Генетика.* 2010. Т. 46, № 9. С. 1247–1249.
5. *Малярчук Б.А.* Сигналы адаптивной эволюции митохондриальных генов у европейцев // *Биохимия.* 2011. Т. 76, № 6. С. 858–863.
6. *Ruiz-Pezini E., Wallace D.C.* Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of human mitochondrial DNA // *Human Mutation.* 2006. V. 27, № 11. P. 1072–1081.
7. *Wallace D.C.* A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine // *Annu. Rev. Genet.* 2005. V. 39. P. 359–407.
8. *Wallace D.C.* Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine // *Annu. Rev. Biochem.* 2007. V. 76. P. 781–821.

Раздел 2

ЭВОЛЮЦИОННАЯ И ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА

ЭТНИЧЕСКАЯ КОНСОЛИДАЦИЯ НА УКРАИНЕ И ЕЕ РОЛЬ В ПОПУЛЯЦИОННЫХ, МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Л.А. Атраментова¹, О.В. Филипцова², М.Н. Кобец², Д.О. Сивальнёва², Ю.Н. Кобец²

¹ Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, г. Харьков, Украина

² Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

В современном обществе возрастает необходимость создания баз данных по генетической структуре населения с использованием как классических, так и ДНК-маркеров. Наиболее остро стоит вопрос о создании так называемых референтных баз данных, однако общих принципов формирования референтной популяции не существует в связи со спецификой демографических, социокультурных, этноконфессиональных процессов в разных странах и регионах [1].

При решении различных проблем, связанных с наследственностью человека, нередко возникает необходимость получить точную генеалогическую информацию, в которой одним из важнейших показателей является этническая принадлежность, национальность [2–4]. Этот показатель необходим для корректного применения ДНК-маркеров в криминалистике, медицинской генетике, при решении вопросов этногенеза, эволюции человека и др. [5–9]. Информация о фармакогенетических особенностях различных этнических групп в полиэтническом населении позволит разработать для каждой из них рекомендации по организации фармакотерапии [10]. Учет этнической принадлежности приобретает колоссальное значение при прогнозе так называемых этнических болезней, популяционная частота которых носит специфический характер. Так, методы превентивной медицины в отношении болезни Тея–Сакса особенно важны среди евреев ашкенази, в то время как в японских популяциях большее значение приобретает диагностика акаталазии, а в средиземноморских и африканских странах – недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и т.д.

Во всем мире в связи с повышением доли внебрачных рождений, применением репродуктивных технологий растет число детей, не имеющих генетического родства с одним или обоими родителями [11], и Украина не является исключением [12]. Осложняет работу украинских генетиков и то, что население, не привычное к популяционным исследованиям, выражает непонимание и обеспокоенность относительно использования генеалогических данных. Изъятие из паспорта гражданина Украины позиции «национальность» привело к тому, что большинство молодых людей стали отождествлять этническую принадлежность и гражданство. Такая ситуация снижает точность научных исследований и вероятность медико-генетических и других прогнозов.

При сборе генеалогической информации возникает ряд вопросов: что вкладывают в понятие «на-

циональность» жители Украины? каков критерий самоназвания украинцев, русских и представителей других национальностей? как происходит этническое самоопределение в разных географических локальностях страны? как устанавливается национальность, если для исследования берется биологический материал в медицинских учреждениях, где в обязанности сотрудников не входит выяснение генеалогии пациентов? Рассмотрению этой ситуации посвящена данная статья.

Материал и методы

В работе использованы данные записей ЗАГС [13–15] и собранные авторами 4 450 анкет (в 2004–2007 и 2014 гг.), в которых имелась информация о национальности пробанда, его родителей и прародителей. По имеющимся данным рассчитаны общезначимые статистики. Сравнение средних арифметических и дисперсий проведено с использованием критериев *t*, *F*. При сравнении долей использовали *φ*-трансформацию. При множественных сравнениях применяли поправку Бонферрони [16]. Проверку статистических гипотез проводили на уровне значимости 0,05.

Результаты и обсуждение

Этнический состав жителей Украины изучался неоднократно, в том числе в наших собственных исследованиях на основе брачных записей в различных популяциях Украины (табл. 1). Как следует из результатов, приведенных в табл. 1, основной тенденцией в отношении этнического самоопределения на Украине является то, что молодые люди (участники исследований 2004–2007 и 2014 гг.) ассоциируют свою этническую принадлежность с гражданством. Этот феномен приводит к тому, что на данный момент более 90% жителей Украины называют себя украинцами, т.е. в явном виде происходит этническая консолидация. По данным брачных записей 1993 г. украинцев, например, в Харькове было 49,9% и почти столько же русских – 43,6% [17]. Такое резкое изменение можно объяснить изменением самоназвания.

Этот результат имеет большое значение при проведении молекулярно-генетических исследований на Украине. Если раньше такие исследования предполагали в основном взятие биологического материала для ДНК-анализа у лиц, имеющих в трех поколениях предков титульной национальности, то в настоящее время такое требование сложно реализовать.

Таблица 1

Этнический состав жителей Украины в разные периоды времени (с 1960 по 2014 г.)

| Город | Национальность, % | | | | | | Литературный источник | |
|---------------------------|-------------------|---------|-------|----------|-------|--------|-----------------------|--|
| | Украинцы | Русские | Евреи | Белорусы | Греки | Другие | | |
| <i>1960-е гг.</i> | | | | | | | | |
| Харьков | 51,9 | 39,7 | 5,8 | 0,7 | – | 1,9 | [13–15] | |
| Донецк | 43,0 | 43,3 | 6,7 | 2,5 | 1,1 | 3,4 | | |
| Полтава | 80,3 | 15,6 | 2,6 | – | – | 1,5 | | |
| <i>1980-е гг.</i> | | | | | | | | |
| Харьков | 49,5 | 43,5 | 4,3 | – | – | 2,6 | | |
| Донецк | 41,9 | 48,8 | 3,4 | 1,5 | 1,1 | 3,3 | | |
| Полтава | 76,9 | 20,1 | 0,9 | – | – | 2,1 | | |
| <i>1990-е гг.</i> | | | | | | | | |
| Харьков | 47,5 | 46,1 | 2,3 | 0,9 | – | 3,3 | | |
| Донецк | 42,5 | 49,2 | 3,3 | 1,4 | 1,0 | 2,6 | | |
| Полтава | 84,0 | 13,9 | 0,3 | – | – | 1,9 | | |
| <i>2004–2007 гг.</i> | | | | | | | | |
| Харьков (преимущественно) | 75,3 | 21,2 | – | – | – | 3,6 | | |
| <i>2014 г.</i> | | | | | | | | |
| Харьков | 90,1 | 7,3 | – | – | – | 2,6 | | |
| Донецк | 91,3 | 7,0 | – | – | – | 1,7 | | |
| Полтава | 97,2 | 0,9 | – | – | – | 1,9 | | |

По-видимому, в дальнейшем роль этнической принадлежности на Украине для этих целей будет терять свое значение, а этническая группа украинцев становится более генетически гетерогенной. В то же время следует отметить, что в ряде популяционно-генетических исследований ученые активно продолжают выявлять особенности украинцев как этнической группы с целью дальнейших практических рекомендаций в области здравоохранения. В частности, данные по частотам аллелей гена *CYP2C9* в ряде этнических групп населения Ставропольского края (русских и украинцев, армян, карачаевцев, туркмен) показали, что частота клинически значимого аллеля 359Leu (*3) чаще выявляется у армян по сравнению со славянской этнической группой, а карачаевцы и туркмены занимают промежуточное положение. У славян частота клинически значимого аллеля 359Leu, ответственного за проявление геморрагического синдрома, была минимальной [10].

В другом исследовании в восточно-европейских популяциях частота аллеля *CCR5delta32* была повышена, но между выборками украинцев, русских и гагаузов его частота не различалась [18].

В табл. 2 представлено распределение основных этнических групп (по самоназванию) в зависимости от места проживания в западной или восточной части Украины в 2014 г. Как видим, в восточной Украине считают себя украинцами почти 90% населения, а в западной – практически все.

Таблица 2
Распределение национальностей в восточной и западной Украине (данные 2014 г.)

| Регион Украины | Украинцы | | Русские | | Другие | | Σ |
|----------------|----------|-------|---------|------|--------|------|------|
| | Абс. | % | Абс. | % | Абс. | % | |
| Восточный | 1 214 | 89,86 | 101 | 7,48 | 36 | 2,66 | 1351 |
| Западный | 489 | 99,39 | 1 | 0,20 | 2 | 0,41 | 492 |
| Σ | 1 703 | 92,40 | 102 | 5,54 | 38 | 2,06 | 1843 |

На Украине среди лиц титульной национальности больше женщин, в то время как среди мужчин почти в три раза больше представителей не славянской национальности (табл. 3).

Таблица 3

Распределение обследованного контингента по этнической принадлежности (данные 2014 г.)

| Национальность | Мужчины | | Женщины | | Σ |
|----------------|---------|--------|---------|--------|-------|
| | Абс. | % | Абс. | % | |
| Украинцы | 318 | 87,36 | 1 677 | 92,09 | 1 995 |
| Русские | 21 | 5,77 | 99 | 5,44 | 120 |
| Другие | 25 | 6,87 | 45 | 2,47 | 70 |
| Σ | 364 | 100,00 | 1 821 | 100,00 | 2 145 |

Больше всего русских и представителей других национальностей сосредоточено в мегаполисах (табл. 4).

Таблица 4

Этническая принадлежность жителей населенных пунктов разной степени урбанизации (данные 2014 г.)

| Тип населенного пункта | Украинцы | | Русские | | Другие | |
|------------------------|----------|------|---------|-----|----------|-------|
| | Абс. | % | Абс. | % | Абс. | Всего |
| 1 | 969 | 89,7 | 74 | 6,8 | 38 (3,5) | 1 081 |
| 2 | 539 | 90,6 | 38 | 6,4 | 18 (3,0) | 595 |
| 3 | 478 | 95,8 | 11 | 2,2 | 10 (2,0) | 499 |
| Всего | 1 986 | 91,3 | 123 | 5,7 | 66 (3,0) | 2 175 |

Примечание. 1 – города с населением более 1 млн человек; 2 – города с населением 100–500 тыс. человек; 3 – города с населением до 100 тыс. человек и села.

Обычно, если человек затрудняется определить свою национальную принадлежность, особенно если он является потомком межнационального брака, генетики ориентируются на национальность родителей и прародителей. Оказалось, что информационная ценность и этих показателей не абсолютна, особенно если анкетированным является мужчина (табл. 5). При этом не смогли ответить ни на один вопрос анкеты относительно национальности 8,1% мужчин и 2,8% женщин. Следует отметить, что в 2014 г. таких людей стало намного меньше: не смогли определиться в отношении собственной национальности лишь менее 1% жителей Украины, причем половых различий по этому признаку не выявлено.

Таблица 5

**Уровень осведомленности обследованных об этнической принадлежности ближайших родственников
(данные 2004–2007 гг.)**

| Уровень осведомленности | Мужчины | | Женщины | |
|--|---------|------|---------|------|
| | Абс. | % | Абс. | % |
| Смогли определиться с собственной этнической принадлежностью | 634 | 85,6 | 1 400 | 89,5 |
| Знали национальность отца | 515 | 69,5 | 1 267 | 81,0 |
| Знали национальность матери | 563 | 76,0 | 1 260 | 80,6 |
| Знали национальность бабки по матери | 268 | 36,2 | 762 | 48,7 |
| Знали национальность деда по матери | 242 | 32,7 | 693 | 44,3 |
| Знали национальность бабки по отцу | 209 | 28,2 | 643 | 41,1 |
| Знали национальность деда по отцу | 185 | 25,0 | 577 | 36,9 |

К сожалению, информированность об этнической принадлежности родственников у молодежи падает. Лица младшего поколения испытывают больше затруднений, воспроизводя информацию о своих родственниках. Среди мужчин старшего поколения (возраст 36 лет и больше) 7,6% не смогли определиться с собственной национальностью, 16,0% – с национальностью отца и 15,1% – с национальностью матери. Молодые мужчины (моложе 36 лет) оказались менее информированными: 9,4% затруднились отнести себя к определенной национальности, 26,4% не знали национальности своего отца, 17,3% – матери. Та же тенденция и у женщин: 2,1% старших не смогли назвать свою национальность, среди младших таких было 3,3%. Среди старших женщин не знали национальность отца 6,3%, национальность матери 8,7%, в младшем поколении соответственно 10,8 и 11,2%. От половины до трех четвертых анкетированных не знали национальности своих прародителей. В целом и мужчины и женщины лучше были информированы о своих родственниках по материнской линии, чем по отцовской, что может быть связано с тем, что в неполных семьях дети обычно проживают с матерью, а не с отцом.

Анализ данных в зависимости от этнической принадлежности по самоназванию и брачной структуры родительских и прародительских пар показал следующее. Из табл. 6 видно, насколько существенно «выпадение» обследованных из анализа при попытке распределить их по группам для учета возможных эффектов, связанных с этнической эндозогамией. Так, чистых представителей определенной национальности с учетом информации о родителях и прародителях оказалось не более 3 от всех обследованных.

Таблица 6

**Доля пробандов (%), указавших свою национальность, которая совпала с национальностью обоих родителей
(данные 2004–2007 гг.)**

| Поколение | Пол пробанда | Национальность пробанда | % |
|-----------|--------------|-------------------------|------|
| Старшее | Мужчины | Украинцы | 7,6 |
| | | Русские | 16,2 |
| | | Другие | 28,0 |
| | Женщины | Украинки | 20,8 |
| | | Русские | 10,9 |
| | | Другие | 28,6 |
| Младшее | Мужчины | Украинцы | 7,6 |
| | | Русские | 16,2 |
| | | Другие | 28,0 |
| | Женщины | Украинки | 12,2 |
| | | Русские | 13,6 |
| | | Другие | 13,3 |

Наиболее полно информированы о национальности своих родителей представители редких на-

циональностей (табл. 6), что находится в согласии с данными, в которых наибольшая брачная ассортативность по этническому признаку также наблюдается у представителей этнических меньшинств [14, 17, 19]. Результаты исследования свидетельствуют, что в будущем судить об этническом происхождении жителя Украины по самоназванию будет затруднительно. При проведении генетических исследований, учитывающих этническую принадлежность, необходимо увеличить количество анкетированных в несколько раз и принимать во внимание, что представители многочисленных этнических групп хуже воспроизводят генеалогическую информацию, чем представители редких национальностей.

Возможно, эти реалии объясняют слабое развитие на Украине таких научных направлений, как популяционная генетика человека и генетика поведения человека. Эти исследования на первый взгляд кажутся простыми, однако при их реализации перед исследователем возникает множество проблем – от обоснования методологической корректности до огромных затрат времени при сборе материала. Тем не менее эти исследования проводить необходимо, так как они создают базу для корректного применения точных и дорогостоящих методов молекулярной генетики. Без строгого учета генеалогической информации также снижается информационная ценность маркеров, используемых в судебной медицине и медицинской генетике.

Важно отметить, что между уровнем генеалогической культуры и уровнем интеллекта, выраженным в баллах IQ, имеется прямая связь. У мужчин, затруднившихся указать собственную национальность, уровень IQ примерно на 8–9 баллов ниже, чем IQ у мужчин, определившихся со своей этнической принадлежностью (табл. 7). Эти данные свидетельствуют, что для повышения эффективности работы при наборе контингента для генетических исследований целесообразно проводить экспресс-диагностику тестируемых в отношении уровня IQ, хотя это может смещать выборку.

Таблица 7

Уровень IQ у мужчин, указавших и не указавших свою этническую принадлежность (данные 2004–2007 гг.)

| Этническая принадлежность | Абс. | Баллы IQ, \bar{x} | s |
|---------------------------|------|---------------------|------|
| Не указана | 90 | 105,3 | 9,2 |
| Украинцы | 408 | 113,5 | 10,8 |
| Русские | 93 | 114,7 | 11,2 |
| Другие | 28 | 113,8 | 14,2 |

Примечание. \bar{x} – среднее арифметическое, s – стандартное отклонение.

Проведенное исследование выявило в украинском населении две тенденции. Первая касается генеалогической культуры, под которой понимается информированность о родственниках и собственном происхождении. В современном населении Украины эта характеристика проявляет тенденцию к снижению. Вторую особенность можно обозначить термином «этническая консолидация», она проявляется тем, что все большая часть населения идентифицирует себя с титульной национальностью. Социально и политически эта тенденция может оцениваться как позитивная. Однако это будет вызывать известные помехи при решении научных вопросов и в практическом использовании результатов.

Литература

1. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Веремейчик В.М. и др. Особенности генетико-демографических процессов в населении трех мегаполисов // Генетика. 2013. Т. 49, № 4. С. 513–522.
2. Gaines S.O., Agnew C.R. Relationship maintenance in intercultural couples: An interdependence analysis // D.J. Canary (Ed.) and M. Dainton (Ed.). Maintaining relationships through communication: relational, contextual, and cultural variations. NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers. 2003. P. 231–253.
3. Fu X., Tora J., Kendall H. Marital happiness and interracial marriage: A study in a multi-ethnic community in Hawaii // Journal of Comparative Family Studies. 2001. V. 32. P. 47–60.
4. Gil-White F.J. The Study of Ethnicity and Nationalism Needs Better Categories: Clearing up the Confusions that Result from Blurring Analytic and Lay Concepts // Journal of bioeconomics. 2006. V. 7. P. 239–270.
5. Пшеничников А.С., Балановский О.П., Атраментова Л.А. и др. Украинцы, русские и белорусы среди их соседей по Европе: свидетельства мтДНК и Y-хромосомы // VII Конгресс этнографов и антропологов России. М., 2007. С. 275.
6. Balanovsky O., Pshenichnov F., Rootsi S. et al. Intra-ethnic variation of the Y chromosome in European countries: a comparative study // The Fifth ISABS Conference in Forensic Genetics and Molecular Anthropology. Split, Croatia. 2007. P. 121.
7. Pshenichnov A., Balanovska E., Balanovsky O. et al. Variation of paternal, maternal and autosomal genetic markers on intra-ethnic (Ukrainians) and inter-ethnic (Europe) level supports Y chromosomal marker bias // International Society for Applied Biological Sciences, Split. 2007. P. 128.
8. Zhivotovskiy L.A., Veremeichyk V.M., Mikulich A.I. et al. A comprehensive population survey on the distribution of STR frequencies in Belarus // Forensic Science International. 2007. V. 172. P. 156–160.
9. Пшеничников А.С., Балановский О.П., Ищук М.А. и др. Генофонд пяти популяций украинцев по данным о полиморфизме мтДНК и Y-хромосомы // V съезд Российского общества медицинских генетиков. Уфа. Медицинская генетика. 2005 С. 256.
10. Батурич В.А., Царукян А.А., Колодийчук Е.В. Исследование полиморфизма гена СУР2С9 в этнических группах населения Ставропольского края // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2014. Т. 9, № 1. С. 45–48.
11. Salari N.N.R. Evaluation of HLA in Detection of Non-Parentage Among Known False Trios // Journal of Forensic Sciences. 1993. V. 38, Issue 6. P. 1478–1481.
12. Анцупова В.В. Динаміка генетико-демографічної структури луганської популяції та обтяженість вродженою та спадковою патологією: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Київ, 2007. 21 с.
13. Атраментова Л.А., Филиппова О.В. The Genetic Demography of Ukrainian Urban Populations in the 1990s: The Marriage Structure of the Kharkov Population // Genetica (Moscow). 1997. V. 34, № 8. P. 941–946.
14. Атраментова Л.А., Мухин В.Н., Филиппова О.В. Генетико-демографические процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Брачная структура донецкой популяции // Генетика. 2000. Т. 36, № 1. С. 93–99.
15. Атраментова Л.А., Куроедова В.Д., Филиппова О.В. Генетико-демографическая структура полтавской популяции // Вісник проблем біології і медицини. 1998. Вип. 17. С. 6–8.
16. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с.
17. Атраментова Л.А., Филиппова О.В. Генетико-демографические процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Брачная структура харьковской популяции // Генетика. 1998. Т. 34, № 8. С. 1120–1126.
18. Кофиади И.А. Иммуногенотипирование и генодиагностика в биомедицине: фундаментальные и прикладные аспекты: дис. ... д-ра биол. наук. М., 2013. 237 с.
19. Атраментова Л.А., Филиппова О.В. Генетико-демографические процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Брачная структура полтавской популяции // Генетика. 1999. Т. 35, № 12. С. 1699–1705.

АНТРОПОЛОГИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ДРЕВНИХ И СОВРЕМЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ

А.Н. Багашёв

Институт проблем освоения Севера СО РАН, г. Тюмень

Современное аборигенное население Северной Евразии относится к различным этнолингвистическим образованиям, в традиционной культуре представлены разнообразные хозяйственно-культурные типы. В языковом отношении аборигенные племена говорят на различных диалектах северосамодийского (ненцы, энцы, нганасаны) и южносамодийского (селькупы) языков, финно-угорского (коми, ханты и манси), тюркского (сибирские татары, хакасы, северные и южные алтайцы), кетском и палеоазиатском языках. В традиционной материальной культуре это племена, ведущие присваивающее хозяйство, — охотники, рыболовы и собиратели, а также народы, ведущие производящее хозяйство, — скотоводы и

земледельцы. Как велико разнообразие их культур, природно-климатические условия обитания, так велики и антропологические различия между ними, что в целом говорит о различных путях их этногенеза. Конечно, антропология освещает лишь одну из сторон их происхождения — историю формирования физического облика этих племен (в прошлом бесписьменных), но вкупе с данными языкознания, этнографии, археологии, топонимики и других наук реконструкция их этногенеза приобретает более полный и объективный характер.

Палеоантропологические материалы из могильников значительного хронологического диапазона (IV тыс. до н.э. — II тыс. н.э.) с территории северной

части евразийской промежуточной зоны отражают преимущественно физические особенности древнего и близкого к современности населения Западной Сибири, что позволяет проследить основные вехи формирования существовавших и существующих здесь антропологических типов и определить их место в системе расовых типов Северной Евразии.

В эпоху неолита на территории Западной Сибири фиксируется европеоидный антропологический тип, родственному протоевропейскому, широко распространенному в Восточной Европе, Карелии, Прибалтике и Украине. Хотя в расовой структуре Северной Евразии неолитическое население Западной Сибири является частью протоевропейского типа, но с определенными особенностями генезиса и спецификой физического облика, которая во многом обусловлена примесью монголоидных элементов различных линий происхождения. Поэтому он рассматривается в качестве западносибирского варианта протоевропейского типа, состоящего из двух групп популяций – собственно западносибирской и верхнеобской.

Граница между ареалами европеоидных и монголоидных популяций в мезо-неолитическое время соприкасалась, возможно с частичным перекрытием, только на юге Западной Сибири, в частности в Верхнем Приобье. Часть европеоидного населения проникала и далее на восток, о чем свидетельствует европеоидная примесь в составе неолитического населения Восточной Сибири [1–3]. Но и часть монголоидов расселялась в западном и южном направлениях. В результате контактов между ними в Верхнем Приобье формируются популяции, в антропологическом составе которых присутствует монголоидный компонент центральноазиатского происхождения (Усть-Иша, Итукуль, Васьково). Именно через подобные группы, вероятнее всего, монголоидные элементы центральноазиатского типа проникают в состав кельтеминарского населения севера Средней Азии. Контакты с последним, в свою очередь, способствовали проникновению в некоторые западносибирские группы элементов средиземноморского типа. Более отчетливо влияние средиземноморцев прослеживается в Среднем Приуралье. В составе других неолитических групп отмечена помимо вышеназванного компонента примесь монголоидных элементов таежного происхождения (Сопка 2, Протока, Омская стоянка, Лебеди). В составе европеоидных популяций протоевропейского типа подобный компонент проникал и на запад, в частности, морфологически сходная примесь отмечается в составе населения льяловской культуры лесной полосы Восточной Европы [4] и в составе мезо-литического населения Карелии (Южный Олений остров) [5].

В целом культурно- и расогенетические процессы, реконструируемые на основе археологических и антропологических источников, протекавшие в Западной Сибири в неолитическое время, во многом сопряжены. В археологических и антропологических материалах нашло отражение проникновение в Западную Сибирь населения, отличающегося от местного физическим обликом и привносящего ряд новаций в аборигенные культуры [6]. Например, приток южных элементов в западносибирские культуры на ранних этапах их формирования коррелирует с появлением в антропологическом составе местного населения расовых комплексов, генетически связанных со среднеазиатскими группами, в частности,

оставивших могильник Тумек-Кичиджик в Южном Приаралье.

В эпоху бронзы усиливается дифференциация между группами населения, наметившаяся в предшествующий период. В подтаежной полосе Западной Сибири продолжается процесс смешения между европеоидными популяциями, генетически связанными с неолитическим населением и таежными монголоидами. Формируется антропологический тип, характерный для населения кротовской культуры доандроновского времени и черноозерско-томского варианта андроновской культурной общности. В составе последнего, однако, вполне отчетливо прослеживается примесь европеоидного компонента, родственного андроновским (федоровским) племенам. В более южных областях Западной Сибири широко распространяется антропологический тип, непосредственно связанный в генезисе с населением андроновской культуры, особенно федоровского варианта, а алакульского типа, связанного со срубными племенами, весьма незначительно (самусьская культура, Ермак 4). Оба варианта андроновской культуры не имеют генетических корней в неолитическом населении юга Западной Сибири, и данная территория может быть исключена из очагов их формирования. Некоторое сходство между типами неолитического населения Западной Сибири и типом андроновцев (федоровцев) обусловлено, скорее всего, наличием в составе тех и других общего древнего палеоевропеоидного субстрата.

Морфологический тип популяций поздней бронзы – ирменских, еловских и черкаскульских – занимает промежуточное положение между типом неолитических черепов, кротовских и черноозерско-томских, с одной стороны, и типом андроновских (федоровских) серий – с другой. Это может служить указанием на то, что облик населения ряда культур поздней бронзы Западной Сибири сформировался во многом в результате смешения между ними.

Антропологический состав населения Западной Сибири раннего железного века становится еще более сложным. Своеобразие антропологического типа западносибирских популяций определяют несколько основных компонентов, удельный вес которых в локальных группах варьирует.

В составе населения саргатской и гороховской культур основным является европеоидный расовый вариант, обладающий мезо-брахикранной формой мозговой коробки, широким невысоким умеренно профилированным в горизонтальной плоскости лицевым скелетом. Антропологическую специфику кулайской серии (могильник Каменный Мыс) определяет монголоидный компонент, характерными чертами которого являются малая высота уплощенного лицевого скелета, слабое выступание носовых костей при средневысоком переносье. Помимо вышеназванных основных компонентов определенную роль в расогенезе лесостепных популяций сыграл европеоидный комплекс с высоким и узким лицом, а также монголоидный с широким и высоким лицом. В отдельных выборках, в частности в Прииртышье, удалось зафиксировать примесь монголоидного компонента, обладающего долихокранной формой черепа.

Европеоидный мезо-брахикранный компонент с широким и низким (эуриформным) лицом в обоих вариантах генетически связан с населением андроновской (федоровской) культуры эпохи бронзы, особенно

с теми популяциями, в составе которых отмечен компонент, уходящий корнями в эпоху западносибирского неолита. В переходный от бронзы к раннему железному веку период в археологических культурах Западной Сибири, особенно к началу эпохи железа, успевают сформироваться относительно устойчивые традиции, но в антропологическом составе того или иного населения особенности еще недостаточно стабильны, хотя уже и проявляются. Длительная инфильтрация в лесостепь Западной Сибири таежных низколицых монголоидных элементов приводит к тому, что отличительными особенностями местных популяций становятся более брахикранная форма черепа и большая ширина уплощенного по горизонтали лицевого скелета, менее высокое переносье и небольшой угол выступания носовых костей. В Поволжье и Приуралье в переходное от бронзы к железу время, видимо, в результате продолжающегося смешения между андроновскими (федоровскими) и срубно-алакульскими группами и позднее между савроматскими и скифскими для антропологического типа местных популяций характерной становится более удлиненная форма мозговой коробки, чуть более высокий и заметнее более узкий лицевой скелет, хорошо профилированный в горизонтальной плоскости, высокое переносье при большом угле выступания носовых костей.

Генезис антропологического типа, характерного для черепов из кулайских погребений и для низколицего брахикранного компонента, выделенного в составе лесостепного населения раннего железа, может быть непосредственно связан с монголоидным низколицым населением таежных областей Западной Сибири. Его расогенетическое влияние на племена южной части Западной Сибири прослеживается с неолита, а в эпоху бронзы низколицый монголоидный компонент фиксируется уже как существенная примесь в составе населения подтаежной полосы Западной Сибири, а также в составе выборков из могильников окуневской и карасукской культур Минусинской котловины. Существенный отпечаток примесь данного компонента накладывает на антропологический тип населения поздней бронзы, оставившего памятники еловской и ирменской культур. Именно примесь низколицых монголоидов в составе ряда популяций эпохи бронзы и в составе населения раннего железа определяет их морфологическое своеобразие и служит достаточно надежным индикатором степени родственных отношений.

Другой монголоидный компонент антропологической структуры лесостепных популяций (большая высота широкого лицевого скелета и брахикrania) морфологически мало отличается от типа населения серовского и глазковского времени Восточной Сибири. Его генезис связан с монголоидами Центральной Азии, которые медленно и длительно проникали в Западную Сибирь с раннего неолита. В эпоху бронзы центральноазиатские элементы как компонент отмечаются в составе окуневских и карасукских популяций Восточной Сибири, кротовских, андроновских (федоровских), еловских, ирменских групп Западной Сибири, а также в составе населения черкаскульской культуры Приуралья.

Отмечаемая антропологическая близость между популяциями саргатской общности и некоторыми ранними (Сакар-чага, Тагискен, Уйгарак) и поздними (Чирик-рабат) саками Южного и Юго-Восточного

Приуралья обусловлена не только общностью происхождения эуриморфного европеоидного компонента в их составе. Фактором сближения может выступать также однотипная монголоидная примесь, отмечаемая в краниологии тех и других. Имеющиеся в настоящее время краниологические данные свидетельствуют о возможности проникновения монголоидных расовых элементов центральноазиатского происхождения в этническую среду, населявшую некоторые районы Южного и Юго-Восточного Приуралья, Киргизию и Восточный Казахстан. Однако не в чистом виде. Данный монголоидный компонент присутствовал, скорее всего, в составе определенных общностей в целом европеоидного облика. Раннесакские черепа с территории Юго-Восточного Приуралья и Киргизии обнаруживают сходство довольно высокого уровня изо всех известных материалов эпохи бронзы Южной и Восточной Сибири только с карасукскими сериями [8–10], с которыми саргатские черепа также морфологически близки. В период перехода от бронзы к железу на север Средней Азии и в Киргизию имела место миграция группы племен из Восточной Сибири, антропологический тип которых более всего сходен с типом населения карасукской культуры и принявших в первой половине I тыс. до н.э. деятельное участие в расогенезе популяций, оставивших ряд могильников сакского типа.

В Средние века антропологический покров южной части Западной Сибири изменяется по сравнению с предшествующим временем. Основной европеоидный компонент расовой структуры саргатского населения не имеет прямых аналогий в составе средневековых популяций.

В таежной полосе Западной Сибири в Средние века этногенетическая ситуация сохраняет стабильность. Краниологический тип черепов из кулайских погребений, а также аналогичные ему компоненты в составе новочекинской серии и всех саргатских выборок, равно как и родственный им низколицый монголоидный компонент в составе кротовской серии могильника Сопка 2 и серии из могильника Еловка 2 эпохи бронзы, а также компонент антропологической структуры неолитических групп собственно западносибирского типа, во многом аналогичны морфотипу средневековых популяций южно-таежного Прииртышья (усть-ишимская культура) и Нарымского Прииртышья (древние селькупы). Видимо, подобная ситуация имела место и в северной части Западной Сибири, но отсутствие средневековых краниологических материалов, достоверно связанных с современными этносами, позволяет говорить об этом на основании косвенных данных, отражающих расовые особенности уже современных обско-угорских народов.

В близкое к современности время на территории Западной Сибири фиксируется большое разнообразие антропологических типов. В некоторых случаях проявляется этногенетическая связь современных этносов с европеоидным населением раннего железа. Более или менее значимая роль может быть отведена ему лишь в генезисе физического облика отдельных групп тоболо-иртышских татар. Можно говорить также о некотором участии саргатских групп в расогенезе западных манси, потому что анализ антропологического состава западных манси позволил выделить в их составе ряд компонентов, в происхождении одного из которых определенная

роль может быть отведена населению саргатской общности, а через него и племенам андроновской (федоровской) культуры эпохи бронзы [11]. Примечательно, что орнаментальное искусство именно западных манси впитало значительный компонент, связанный с южными иранскими традициями [12], о влиянии на культуру манси южных иранских элементов свидетельствуют и данные археологии [13]. Но в целом наблюдается значительное ослабление, на грани почти полного разрыва, расогенетических связей между племенами саргатской культурной общности и современными популяциями Западной Сибири, хотя по женским материалам данный вывод должен выглядеть менее категоричным. Данная линия генезиса, таким образом, не оказала заметного влияния на формирование антропологического облика современных этносов.

В южно-таежной полосе Западной Сибири этногенетическая связь между различными хронологическими срезами антропологического покрова прослеживается довольно отчетливо. Наблюдается существенное антропологическое сходство между серией черепов из могильника Каменный Мыс и черепами монголоидного типа с эуриформным строением лицевого скелета. Первая выборка отражает расовые особенности населения, оставившего памятники кулайской археологической культуры, вторая, хотя и дисперсно, но, скорее всего, также несет информацию об антропологии людей этой культурной общности. Морфологический облик обеих выборок раннего железа практически аналогичен морфотипу популяций Нарымского Приобья эпохи Средневековья и современных нарымских селькупов. Популяции кулайской культуры, следовательно, с полным основанием могут рассматриваться в качестве основной расовой составляющей генезиса селькупов. Однако и в более ранний период фиксируются носители комплекса антропологических черт, характерных для популяций кулайской общности. Речь идет о расовом компоненте, выявляемом в составе населения черноозерско-томского варианта андроновской культурной общности, кротовской популяции и неолитических западносибирских групп [14].

Монголоидный расовый комплекс, обладающий более долихокранной формой мозговой коробки, выделенный в материалах раннего железа, также имеет аналогии среди западносибирского населения. Наибольшее сходство он обнаруживает с обско-угорскими популяциями. Те угорские выборки, в составе которых фиксируется примесь самодийских элементов, морфологически от него отдалены, но базовый морфотип их антропологической структуры и особенности долихокранного варианта принципиально едины [15].

Современное население Западной Сибири характеризуется рядом антропологических особенностей, в расовом отношении не является однородным, имеет сложный антропологический состав, а территориальная изменчивость расовых особенностей некоторых современных групп иногда довольно велика. Однако в каждом конкретном случае расовые особенности популяций складываются в некие морфологические комплексы, привязанные к определенным территориям.

Североалтайские и южносибирские популяции Южной Сибири, например, морфологически занимают промежуточное положение между монголоидным и европеоидным расовыми стволами, в составе тех и других европеоидный и монголоидный расо-

вые компоненты сходного происхождения, различены лишь их удельный вес. Длительный процесс смешения между представителями этих рас явился доминирующим фактором расообразования современного населения Южной Сибири. Метисный характер формирования южносибирской общности убедительно подтверждается исследованием палеоантропологических материалов [16–25].

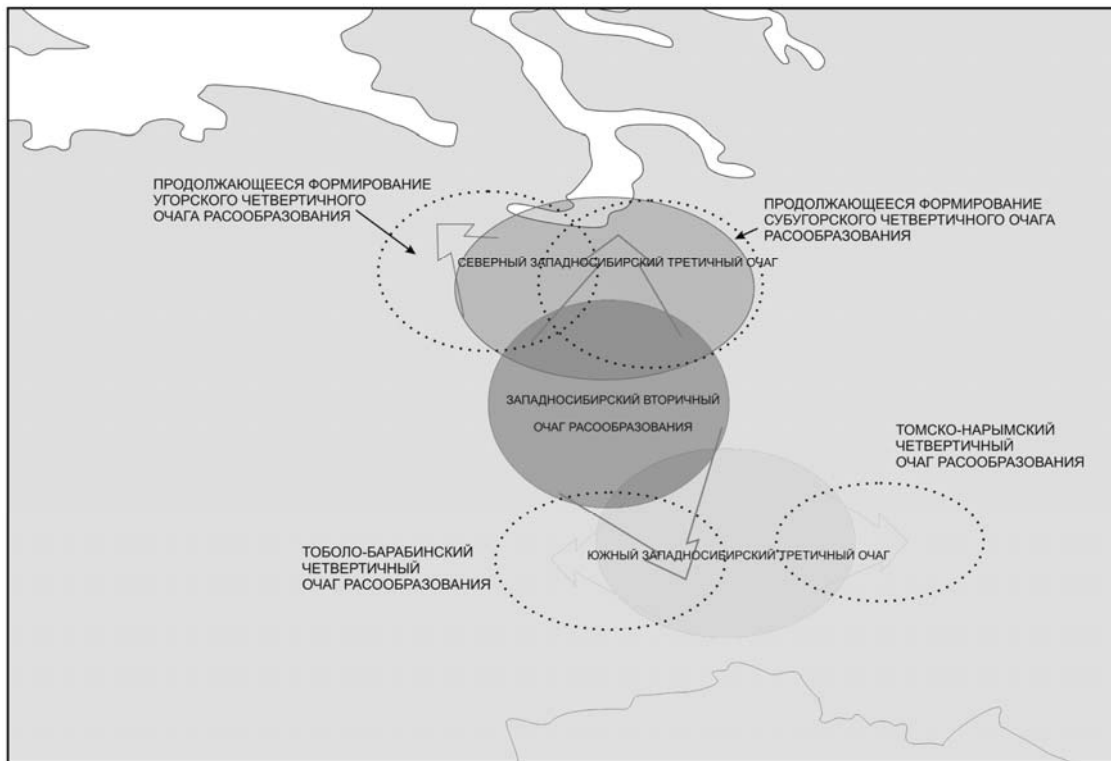
В отличие от Алтая и Хакасии на территории Западной Сибири существовали в древности и существуют в современное время популяции, в антропологическом типе которых фиксируется ряд особенностей, которые определяются не столько присутствием у них в той или иной пропорции примеси монголоидных и (или) европеоидных черт, сколько наличием в их составе специфических сочетаний расовых признаков, в которых нарушена нормальная историческая корреляция, что может указывать на сохранение следов недифференцированности. В итоге именно этим определяется своеобразие древнего и современного населения Западной Сибири.

Народы Западной Сибири и Урала, расположенных между ареалами обитания европеоидных и монголоидных народов, смягчение некоторых монголоидных черт у населения этого региона с неизбежностью приводили исследователей к выводу о метисном характере их формирования. Другая точка зрения на механизм формирования народов Западной Сибири и Урала была высказана В.В. Бунаком, согласно которой оно образовалось не в результате смешения, а в результате сохранения древнего протоморфного типа, лишь частично сходного с монголоидным [26–29], получившая солидную поддержку в результате исследований дискретно варьирующих признаков на черепах уральскоязычных народов [30–32].

Среди западносибирских групп выделяется несколько надпопуляционных общностей, привязанных к определенным территориям. Это тюрки Тоболо-Иртышья и Барабы, тюрки и селькупы Томско-Нарымского Приобья, различия между ними незначительны и обусловлены различным удельным весом южносибирского компонента (популяции обьиртышского антропологического типа).

В составе угорских популяций, ареал которых охватывает обширные районы Среднего и Нижнего Приобья, обнаружено недифференцированных элементов более всего, отсутствует примесь южносибирских и североалтайских элементов, хотя в некоторых группах фиксируется присутствие самодийского компонента. Высокая изменчивость обско-угорских популяций отражает в большей степени территориальное, нежели этническое и антропологическое единство угров, объединяющую роль в антропологии выполняет комплекс недифференцированных элементов (популяции уральского антропологического типа).

Среди населения Западной Сибири, таким образом, распространены два основных антропологических типа, каждый из которых характеризуется достаточно четким своеобразием морфотипа и со своими ареалами. Уральский тип представлен у хантов и манси, ареал распространения охватывает таежную и лесотундровую зоны, т.е. северную часть Западной Сибири. Обь-иртышский антропологический тип представлен у нарымских селькупов и тюрков Западно-Сибирской равнины, ареал распространения – южно-таежная и лесостепная зоны, т.е. средняя и южная части Западной Сибири.



Западносибирский вторичный очаг расообразования и его последующая дифференциация

Расовая специфика и внутреннее сходство популяций уральского и обь-иртышского типов, обусловленные одним расообразующим фактором на единой территории, большое сходство протекавших здесь этногенетических процессов в примерно одинаковых природно-климатических условиях свидетельствуют о существовавшем некогда их единстве. Поэтому они объединены и выделены в самостоятельную западносибирскую расу [33, 34], которая утратила связь с основными расовыми стволами очень давно, еще до того периода, когда сформировались ярко выраженные европеоидные и монголоидные особенности, и представляет собой древнюю протоазиатскую формацию.

Западносибирский очаг расообразования может рассматриваться в иерархическом плане как вторичный, который наряду с азиатским континентальным и азиатским прибрежным входит в состав восточного первичного очага (рисунок). Во вторичном западносибирском очаге расообразования выделяется два дочерних третичных – северный западносибирский (угорская линия генезиса) и южный западносибирский (самодийская линия генезиса). Относительное время формирования западносибирского вторичного очага может быть отнесено к периоду, когда еще существовал генетический мост между монголоидами Азии и Северной Америки, с мезо-неолитического времени можно говорить о дифференциации его на третичные очаги. Скорее всего, именно в это время начинается дивергенция уралоязычного населения Западной Сибири на угорскую и самодийскую ветви. Примечательно, что последние палеогенетические исследования в значительной степени коррелируют с прилагаемой схемой антропологической дифференциации древнего и современного населения Евразии.

Литература

1. Гохман И.И. Происхождение центральноазиатской расы в свете новых антропологических материалов // Сб. Музея антропологии и этнографии. 1980. Т. 36. С. 5–34.
2. Дебец Г.Ф. Палеоантропология СССР // Труды Ин-та этнографии. 1948. Т. 4. 392 с.
3. Мамонова Н.Н. Древнее население Ангары и Лены в серовское время по данным палеоантропологии (к вопросу о межгрупповых различиях в эпоху неолита) // Палеоантропология Сибири. М.: Наука, 1980. С. 64–88.
4. Алексеева Т.И. Неолитическое население лесной полосы Восточной Европы (антропология Сахтышских стоянок). М.: Научный мир, 1997. С. 18–41.
5. Якимов В.П. Антропологические материалы из неолитического могильника на южном Оленьем острове (Онежское озеро) // Сб. Музея антропологии и этнографии. 1960. Т. 19. С. 221–359.
6. Зах В.А., Багашев А.Н. О сопряженности культурогенеза и расообразования в формировании неолитического населения Западной Сибири // Сибирь в панораме тысячелетий. Новосибирск: Изд-во Ин-та археологии и этнографии СО РАН, 1998. Ч. 1. С. 194–202.
7. Яблонский Л.Т. Саки Южного Приаралья. М.: Ин-т археологии РАН, 1996. 185 с.
8. Яблонский Л.Т. Некрополи древнего Хорезма (археология и антропология могильников). М.: Восточная литература, 1999. 326 с.
9. Итина М.А., Яблонский Л.Т. Саки Нижней Сырдарьи (по материалам могильника Южный Тагискен). М.: Российская политическая энциклопедия, 1997. 188 с.
10. Тур С.С. Кочевники Кыргызстана сако-усуньского времени (по материалам палеоантропологического исследования): автореф. дис. ... канд. ист. наук. Барнаул, 1997. 25 с.
11. Багашев А.Н. Краниологический тип пелымских манси // Вестник археологии, антропологии и этнографии. 1999. Вып. 2. С. 69–77.
12. Рындина О.М. Орнамент // Очерки культурогенеза народов Западной Сибири. Т. 3. Изд-во Том. ун-та, 1995. 640 с.

13. Чернецов В.Н. Древняя история Нижнего Приобья // Материалы и исследования по археологии СССР. 1953. Вып. 35. С. 7–71.
14. Багашев А.Н. Хронологическая изменчивость краниологического типа нарымских селькупов // Вестник археологии, антропологии и этнографии. 2001. Вып. 3. С. 159–174.
15. Багашев А.Н. Палеоантропология Западной Сибири: лесостепь в эпоху раннего железа. Новосибирск: Наука, 2000. 374 с.
16. Алексеев В.П. Палеоантропология Алтая эпохи железа // Советская антропология. 1958. № 1. С. 45–49.
17. Алексеев В.П. Поздние кочевники Кузнецкой котловины по данным антропологии // Краткие сообщения Ин-та этнографии. 1960. Вып. 35. С. 98–111.
18. Алексеев В.П. Палеоантропология Алтае-Саянского нагорья в эпохи неолита и бронзы // Труды Ин-та этнографии. 1961. Т. 21. С. 107–206.
19. Багашев А.Н. Антропологический состав средневекового населения Среднего Прииртышья // Палеоантропология и археология Западной и Южной Сибири. Новосибирск: Наука, 1988. С. 22–54.
20. Дремов В.А. Антропологические материалы из могильников Усть-Иша и Итуль (к вопросу о происхождении неолитического населения Верхнего Приобья) // Палеоантропология Сибири. М.: Наука, 1980. С. 19–46.
21. Дремов В.А. Население Верхнего Приобья в эпоху бронзы (антропологический очерк). Томск: Изд-во Том. ун-та, 1997. 264 с.
22. Гинзбург В.В., Дебец Г.Ф., Левин М.Г., Чебоксаров Н.Н. Очерки по антропологии Казахстана // Краткие сообщения Ин-та этнографии. 1954. Вып. 16. С. 42–68.
23. Гинзбург В.В., Трофимова Т.А. Палеоантропология Средней Азии. М.: Наука, 1972. 372 с.
24. Исмагулов О. Население Казахстана от эпохи бронзы до современности (палеоантропологическое исследование). Алма-Ата: Наука, 1970. 240 с.
25. Ким А.П. Антропологический состав и вопросы происхождения коренного населения северных предгорий Алтая: автореф. дис. ... канд. ист. наук. М., 1987. 17 с.
26. Бунак В.В. Человеческие расы и пути их образования // Советская этнография. 1956. № 1. С. 86–105.
27. Бунак В.В. Об очередных задачах в изучении расообразования у человека (в связи со статьей Г.Ф. Дебеца «О принципах классификации человеческих рас») // Советская этнография. 1958. № 3. С. 125–135.
28. Бунак В.В. Вопросы расогенеза // Происхождение и этническая история русского народа // Труды Ин-та этнографии. 1965. Т. 88. С. 174–190.
29. Бунак В.В. Род Номо, его возникновение и последующая эволюция. М.: Наука, 1980. 328 с.
30. Козинцев А.Г., Моисеев В.Г. Об антропологическом своеобразии уралоязычных народов: сопоставление данных краниоскопии и краниометрии // Этнографическое обозрение. 1995. № 4. С. 81–88.
31. Моисеев В.Г., Козинцев А.Г. Антропологическое своеобразие уралоязычных народов // Этнографическое обозрение. 1998. № 2. С. 140–150.
32. Моисеев В.Г. Происхождение уралоязычных народов по данным краниологии. СПб.: Наука, 1999. 133 с.
33. Багашев А.Н. Антропологические общности, их систематика и особенности расообразовательных процессов // Очерки культурогенеза народов Западной Сибири. Т. 4. Расогенез коренного населения. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1998. С. 303–327.
34. Багашев А.Н. О расовой систематике народов Северной Евразии // Раса: миф или реальность? М.: Старый сад, 1998. С. 17–19.

ВАРИАбельность X-СЦЕПЛЕННЫХ STR-МАРКЕРОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЕВРАЗИИ

К.В. Вагайцева^{1,2}, В.Н. Харьков^{1,2}, К.В. Черпинская², И.Ю. Хитринская¹, В.А. Степанов^{1,2}

¹ НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

X-хромосома имеет ряд преимуществ в решении задач популяционной генетики. Во многих отношениях она сходна с аутосомами, однако является более стабильной, по крайней мере у плацентарных млекопитающих, поскольку рекомбинирует только у женских особей. За счет особенностей наследования X-хромосома является удобным инструментом для популяционно-генетического анализа, поскольку гемизиготность мужчин по этой хромосоме позволяет легко изучить гаплотипы. Вследствие низкой эффективной численности эта хромосома в большей степени подвержена эффектам генетического дрейфа, что приводит к более высоким показателям межпопуляционного и межгруппового разнообразия [1].

Помимо преимуществ в популяционной генетике данные по маркерам X-хромосомы полезны и для целей криминалистики. X-STR-маркеры особенно необходимы в сложном тестировании родства, когда для анализа доступны только дальние родственники. Также маркеры X-хромосомы способны разрешить вопрос об отцовстве, когда ДНК предполагаемого отца не доступна [2] или же если вопрос об отцовстве стоит между близкими родственниками [3]. В случаях определения родства между отцом и дочерью, бабушкой по отцу и внучкой маркеры X-хромосомы информативнее аутосомных в 2 и 4 раза соответственно. Ключевым моментом в ДНК-идентификации

являются вероятностные расчеты совпадения генотипов, основанные на референтных частотах аллелей в популяции, из которой происходит исследуемый ДНК-профиль. Точность оценки результата зависит от выбранной референтной группы, неправильно подобранная референтная популяция снижает дискриминирующую способность тест-системы. Население России чрезвычайно этнически и генетически гетерогенно, что требует создания баз данных по референтным частотам специально для населения России [4–7]. Кроме того, более интенсивный дрейф генов у малочисленных и изолированных популяций Сибири приводит к снижению гетерозиготности, что также влияет на идентификационный потенциал тест-систем [8, 9]. Для систем маркеров для ДНК-идентификации вплоть до недавнего времени отсутствовали систематические знания о частотах аллелей в популяциях России, которые можно было бы использовать в качестве референтных. Для стандарта аутосомных STR, аналогичного CODIS, применяемого в России, эта проблема начала успешно разрешаться, в том числе и нашими предыдущими работами, для маркеров X-хромосомы она чрезвычайно актуальна [10].

В настоящей работе был проведен анализ генетического разнообразия 10 популяций Евразии по STR-маркерам X-хромосомы с целью оценки иден-

тификационного потенциала тест-системы, основанной на 10 X-STR-маркерах, и определения частот аллелей этих маркеров в популяциях.

Материал и методы

Материалами исследования послужили образцы ДНК мужчин, не состоящих в родстве, без метисации в трех поколениях, принадлежащих к 10 популяционным выборкам Евразии общей численностью 604 человека (табл. 1). Исследованные популяции являются представителями трех расовых типов населения: европеоидного, монголоидного и уральского.

Таблица 1

Характеристика исследованных популяций

| Этнос | Популяция | Объем выборки | Локализация | Расовый тип |
|------------------|------------------|---------------|--------------------|-------------------------|
| Русские | Томск | 68 | Томская область | Европеоидный |
| Тувинцы | Кызыл | 127 | Республика Тыва | Монголоидный |
| Буряты | Агинское | 43 | Читинская область | Монголоидный |
| | Курумканский р-н | 25 | Республика Бурятия | Монголоидный |
| Алтайцы | Бешпельтир | 80 | Республика Алтай | Монголоидный |
| | Кулада | 46 | Республика Алтай | Монголоидный |
| Ханты | Русскинские | 46 | ХМАО | Уральский |
| | Казым | 50 | ХМАО | Уральский |
| Сибирские татары | Томск | 40 | Томская область | Уральский, монголоидный |
| Хакасы | Аскизский р-н | 79 | Республика Хакасия | Уральский |

Для популяционно-генетического анализа были отобраны маркеры, наиболее широко исследованные в мировых популяциях, входящие в состав мультимплекса: *DXS8378*, *GATA172D05*, *DXS7132*, *DXS9898*, *DXS7423*, *DXS8377*, *DXS101*, *DXS6809*, *DXS6789*, *HPRTB* [11].

Тотальная ДНК была выделена методом фенолхлороформной экстракции из венозной крови. Генотипирование осуществлялось с помощью отдельной полимеразной цепной реакции (ПЦР) по каждому локусу с последующим мультимплексным фрагментным анализом методом капиллярного гель-электрофореза на генетическом анализаторе (AbiPrism3130xl, AbiPrism3730xl). Полимеразная цепная реакция проводилась в 20 мкл ПЦР-смеси, в состав которой входили 1–1,5 нг ДНК, 10х ПЦР-буфер, 2,5 ммоль MgCl₂, 0,2 ммоль каждого dNTP, 0,75 единицы Taq ДНК-полимеразы и 0,01–0,02 о.е. каждого праймера. Определение числа повторов было произведено методом секвенирования на генетическом анализаторе AbiPrism3130xl. Структура повторов описана в табл. 2.

Определение частот аллелей и ожидаемой гетерозиготности проведено стандартными биостатистическими методами. Оценка неравновесия по сцеплению (LD), анализ генетического разнообразия и дифференциации (AMOVA) осуществлялись с помощью пакета программ Arlequin 2000 [12]. Поскольку

ку гаметическая фаза образцов ДНК мужчин известна, частоты гаплотипов также получены напрямую, без применения дополнительных статистических алгоритмов. Для определения связи средней ожидаемой гетерозиготности с географическими показателями рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Анализ методом главных компонент проводился в программе Statistica 6.0. Для оценки идентификационного потенциала системы, основанной на маркерах X-хромосомы, были определены стандартные популяционно-статистические показатели, характеризующие идентификационный потенциал системы маркеров. Эти показатели включают вероятность установления различий между двумя неродственными индивидами (power of discrimination (PD)), исключая способность (power of exclusion (PE)), вероятность случайного совпадения генотипов (matching probability (MP)) [13].

Таблица 2

Структура повторов и номенклатура аллелей

| Локус | Структура повтора | Аллель |
|--------------------|---|--------|
| <i>DXS8378</i> | PF-N18-(CTAT)n-N20-PR | |
| | PF-N18-(CTAT)10-N20-PR | 10 |
| <i>GATA 172D05</i> | PF-N5-(TAGA)n-N39-PR | |
| | PF-N5-(TAGA)10-N39-PR | 10 |
| <i>DXS7132</i> | PF-(CTTA)n-N38-PR | |
| | PF-(CTTA)11-N38-PR | 11 |
| <i>DXS9898</i> | PF-N15-(TATC)2-(ATC)-(TATC)n-N58-PR | |
| | PF-N15-(TATC)2-(ATC)-(TATC)10-N58-PR | 10 |
| <i>DXS7423</i> | PF-N52-(TCCA)n-N47-PR | |
| | PF-N52-(TCCA)10-N47-PR | 10 |
| <i>DXS8377</i> | PF-N31-(AGA)n-(GGA-AGA)m-(AGA)2-GGA-(AGA)6-N25 | |
| | PF-N31-(AGA)19-(GGA-AGA)5-(AGA)2-GGA-(AGA)6-N25 | 38 |
| <i>DXS101</i> | PF-N80-(CTT)n-(ATT)m-N14-PR | |
| | PF-N80-(CTT)6-(ATT)9-N14-PR | 15 |
| <i>DXS6809</i> | PF-N47-(CTAT)n-(ATCT)3-N9-(TATC)3-(ATCT)5-N10-(ATCT)m-N14-PR | |
| | PF-N47-(CTAT)8-(ATCT)3-N9-(TATC)3-(ATCT)5-N10-(ATCT)11-N14-PR | 30 |
| <i>DXS6789</i> | PF-N130-(GATA)n-(CATA)m-N23-PR | |
| | PF-N130-(GATA)7-(CATA)7-N23-PR | 14 |
| <i>HPRTB</i> | PF-N107-(TCTA)n-N76-PR | |
| | PF-N107-(TCTA)14-N76-PR | 14 |

Результаты и обсуждение

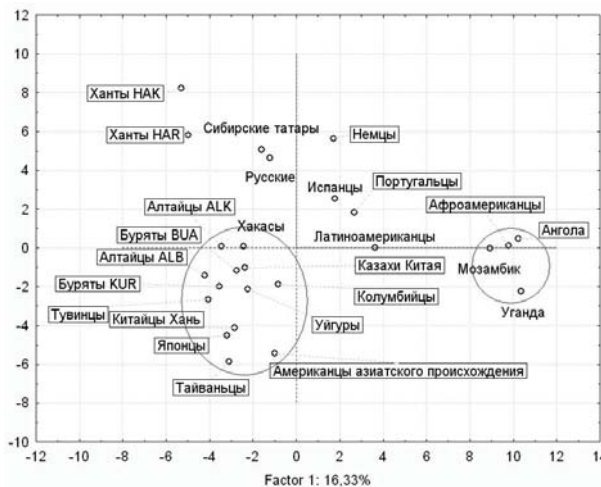
Анализ распределения частот аллелей STR-маркеров показал, что в основном в популяциях разной этнической принадлежности модальные аллели совпадают, однако есть локусы, в которых распределение частот отличается у европеоидов и монголоидов. Идентичных гаплотипов среди индивидов, принадлежащих к 14 популяционным группам, найдено не было. Средний уровень ожидаемой гетерозиготности (H_e) составил 0,73. Из 10 X-STR-маркеров наибольшую вариабельность показали локусы *DXS8377* ($H_e = 0,886284$), *DXS101* ($H_e = 0,813764$), *DXS6809* ($H_e = 0,763759$), *DXS6789* ($H_e = 0,776006$), наименьшую: *DXS7423* ($H_e = 0,613559$), *DXS8378*

($H_e = 0,667146$). Наибольший уровень средней ожидаемой гетерозиготности по десяти исследованным локусам зафиксирован у сибирских татар ($H_e = 0,780707$) и русских ($H_e = 0,774175$), что, видимо, связано с формированием этих народов на базе разнородных по происхождению предковых групп населения. Высокие показатели генетического разнообразия у этих этносов ранее были выявлены и при использовании Y-хромосомных маркеров [14]. Максимальный уровень гетерозиготности среди оставшихся 8 популяций принадлежит бурятам BUA и составляет 0,749868.

Значимой связи средней ожидаемой гетерозиготности по всей системе маркеров с географическими параметрами не обнаружено (H_e /широта 0,214286, $p = 0,644512$; H_e /долгота – 0,142857, $p = 0,759945$).

Общий уровень генетической дифференциации пула из 10 популяций оказался относительно невысоким ($F_{st} = 0,03186$). Наибольший вклад в межпопуляционное разнообразие вносят локусы *GATA172D05* ($F_{st} = 0,06244$; $p = 0,00000$) и *DXS101* ($F_{st} = 0,04529$; $p = 0,00000$), *HPRTB* ($F_{st} = 0,03458$; $p = 0,00000$), *DXS7132* ($F_{st} = 0,03454$; $p = 0,00000$). Остальные показали значения F_{st} ниже среднего, из них минимальные значения принадлежат локусам *DXS8378* ($F_{st} = 0,00725$; $p = 0,12512$), *DXS8377* ($F_{st} = 0,00738$; $p = 0,01173$).

Для выявления интегральных характеристик, обуславливающих изменчивость частот аллелей генов в популяциях, использовали метод главных компонент (рисунок). Для анализа были привлечены данные о частотах в 15 мировых популяциях [11, 15–28].



Расположение популяций в пространстве двух первых главных компонент

Две первые главные компоненты в совокупности объясняют 25% вариабельности аллельных частот в изученных популяциях. В пространстве двух главных компонент четко выделяются два кластера: африканский и монголоидный. Монголоидный кластер расположен в пространстве отрицательных значений главных компонент, в него вошли следующие популяции: алтайцы, буряты, тувинцы, японцы, тайваньцы, хань, казахи, проживающие на территории Китая, уйгуры, американцы азиатского происхождения, хакасы, колумбийцы. Расположение в монголоидном кластере популяции хакасов, принадлежащей к уральскому расовому типу, говорит о большей

монголоидной компоненте в данной популяции. Попадание популяции колумбийцев в этот кластер достаточно логично, поскольку заселение Америки происходило с территории Сибири, причем наибольшее генетическое сходство с современными индейцами Южной Америки демонстрируют популяции коренных этносов южной и центральной Сибири [29]. Африканский кластер расположен в стороне от евроазиатских популяций и содержит четыре популяционные группы: афроамериканцы, Ангола, Мозамбик, Уганда.

При расчете идентификационного потенциала тест-системы необходимо учитывать сцепление локусов. Анализ неравновесия по сцеплению для всех пар локусов в 10 популяционных группах с применением поправки Бонферрони ($p < 0,001$) показал наличие сцепления в 6 популяциях: *DXS7423* и *DXS8377* у хакасов и тувинцев, *GATA172D05* и *DXS8377* у бурят (BUA), *GATA172D05* и *DXS7423*; *DXS8378* и *DXS101* у сибирских татар, *DXS6809* и *DXS6789* у бурят (KUR) и алтайцев (ALK). Однако довольно большое расстояние между локусами *GATA172D05* – *DXS8377*, *GATA172D05* – *DXS7423*, *DXS8378* – *DXS101* и отсутствие сцепления между промежуточными локусами позволяют отнести эти результаты к эффекту выборки.

Для оценки идентификационного потенциала тест-системы, основанной на 10 X-STR, рассчитаны следующие показатели: вероятность дискриминации неродственных индивидов (PD), исключаяющая способность (PE), вероятность случайного совпадения генотипов (MP).

Средняя исключаяющая способность по 10 локусам для 10 популяций составила 0,999097. Максимальное значение PE (0,9999) показано для популяции сибирских татар. Среднее значение вероятности установления различий между двумя неродственными индивидами (PD) составила 0,999999997 для женщин, 0,999998 для мужчин. Значение вероятности случайного совпадения генотипов в популяции русских у двух случайно выбранных неродственных индивидов (MP) среди женщин составляет $0,839 \cdot 10^{-12}$, у мужчин $0,235 \cdot 10^{-7}$. Средние значения MP по 10 популяциям составляет $0,326 \cdot 10^{-10}$ и $0,186 \cdot 10^{-6}$ соответственно.

Заключение

Очевидные различия между популяционными группами свидетельствуют о необходимости выбирать в целях ДНК-идентификации максимально точную референтную группу. Панель 10 микросателлитных маркеров X-хромосомы, содержащая в себе локусы *DXS8378*, *GATA172D05*, *DXS7132*, *DXS9898*, *DXS7423*, *DXS8377*, *DXS101*, *DXS6809*, *DXS6789*, *HPRTB*, обладает высоким идентификационным потенциалом. Собранные данные о частотах аллелей в 10 популяциях позволяют использовать данную панель маркеров в целях ДНК-идентификации, для индивидов этнических групп Евразии.

Работа поддержана федеральной целевой программой «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.». Конкурсный отбор двухлетних прикладных научных исследований, направленных на создание продукции и технологий, по приоритетному направлению

«Науки о жизни» в рамках мероприятия 1.2 программы. Номер соглашения о предоставлении субсидии 14.BVV.21.0066.

Литература

1. Stephen F. Schaffner. The X chromosome in population genetics // Nature reviews genetics. 2004. № 5 (1). С. 43–51.
2. Szibor R., Krawczak M., Hering S. et al. Use of X-linked markers for forensic purposes // Int. J. Legal. Med. 2003. № 117. С. 67–74.
3. Schmidtke J., Kuhnau W., Wand D. et al. Prenatal exclusion without involving the putative fathers of an incestuous father-daughter parenthood // Prenat. Diagn. 2004. № 24 (8). С. 662–664.
4. Степанов В.А. Этногеомика населения Северной Евразии. Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2002. 242 с.
5. Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на русской равнине. М.: Луч, 2007. 413 с.
6. Хуснутдинова Э.К. Молекулярная генетика народов Волго-Уральского региона. Уфа: Гилем, 1999. 238 с.
7. Степанов В.А. Геномы, популяции, болезни: этническая геномика и персонализированная медицина // Acta Naturae. 2010. № 4 (7). С. 18–34.
8. Степанов В.А. Генетическое разнообразие и этногенез тувинцев // Вестн. этнической медицины. 2004. Т. 1, № 1. С. 22–27.
9. Харьков В.Н., Хамина К.В., Медведева О.Ф. и др. Структура генофонда тувинцев по маркерам Y-хромосомы // Генетика. 2013. Т. 49, № 12. С. 1416–1425.
10. Степанов В.А., Балановский О.П., Мельников А.В. и др. Характеристика популяций Российской Федерации по панели пятнадцати локусов, используемых для ДНК-идентификации и в судебно-медицинской экспертизе // Acta naturae. 2011. № 2 (9). С. 59–71.
11. Gomes I., Prinz M., Pereira R. et al. Genetic analysis of three US population groups using an X-chromosomal STR decaplex // Int. J. Legal. Med. 2007. № 121 (3). С. 198–203.
12. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // Evolutionary Bioinformatics Online. 2005. № 1. С. 47–50.
13. Desmarais D., Zhong Y., Chakraborty R. et al. Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA) // J. Forensic Sci. 1998. № 43. С. 1046–1049.
14. Харьков В.Н. Структура и филогенетика генофонда коренного населения Сибири по маркерам Y-хромосомы: автореф. дис. д-ра мед. наук. Томск, 2012. 45 с.
15. Becker D., Rodig H., Augustin C. et al. Population genetic evaluation of eight X-chromosomal short tandem repeat loci using Mentype Argus X-8 PCR amplification kit // Forensic Sci. Int. Genet. 2008. № 2 (1). С. 69–74.
16. Hering S., Szibor R. Development of the X-linked tetrameric microsatellite marker DXS9898 for forensic purposes // J. Forensic Sci. 2000. № 45 (4). С. 929–931.
17. Edelmann J., Deichsel D., Plate I. et al. Validation of the X-chromosomal STR DXS6809 // Int. J. Legal. Med. 2003. № 117 (4). С. 241–244.
18. Tabbada K.A., De Ungria M.C., Faustino L.P. et al. Development of a pentaplex X-chromosomal short tandem repeat typing system and population genetic studies // Forensic Sci. Int. 2005. № 154 (2–3). С. 173–180.
19. Nakamura Y., Minaguchi K. Sixteen X-chromosomal STRs in two octaplex PCRs in Japanese population and development of 15-locus multiplex PCR system // Int. J. Legal. Med. 2010. № 124 (5). С. 405–414.
20. Asamura H., Sakai H., Ota M. et al. Japanese population data for eight X-STR loci using two new quadruplex systems // Int. J. Legal. Med. 2006. № 120 (5). С. 303–309.
21. Qiu-Ling Liu, De-Jian Lu, Li Quan et al. Development of multiplex PCR system with 15 X-STR loci and genetic analysis in three nationality populations from China // Electrophoresis. 2012. № 33 (8). С. 1299–1305.
22. Qiu-Ling Liu, Hu Zhao, Jian-Ding et al. Development and population study of the 12 X-STR loci multiplexes PCR systems // Int. J. Legal. Med. 2012. № 126(4). С. 665–670.
23. Qiu-Ling Liu, De-Jian Lu, Xin-Guo Li et al. Development of the nine X-STR loci typing system and genetic analysis in three nationality populations from China // Int. J. Legal. Med. 2011. № 125 (1). С. 51–58.
24. Pereira R., Gomes I. et al. Genetic diversity of 10 X chromosome STRs in northern Portugal // Int. J. Legal. Med. 2007. № 121 (3). С. 192–197.
25. Hsiao-Lin Hwa, Yih-Yuan Chang, James Chun-I Lee et al. Thirteen X-chromosomal short tandem repeat loci multiplex data from Taiwanese // Int. J. Legal. Med. 2009. № 123 (3). С. 263–269.
26. Gomes I., Alves C., Maxzud K. et al. Analysis of 10 X-STRs in three African populations // Forensic Science International: Genetics. 2007. № 1 (2). С. 208–211.
27. Aler M., Sa'nchez-Diz P., Gomes I. Genetic data of 10 X-STRs in a Spanish population sample // Forensic Science International. 2007. № 173 (2–3). С. 193–196.
28. Pico A., Castillo A., Vargas C. Genetic profile characterization and segregation analysis of 10 X-STRs in a sample from Santander, Colombia // Int. J. Legal. Med. 2008. № 122 (4). С. 347–351.
29. Bortolini M.C., Salzano F.M., Thomas M.G. et al. Y-chromosome evidence for differing ancient demographic histories in the Americas // Am. J. Hum. Genet. 2003. № 73 (3). С. 524–539.

ОТБОР ПО АЛЛЕЛЯМ ARG48HIS ГЕНА АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ADH1B В ПОПУЛЯЦИЯХ АЗИИ

А.Н. Евсюков

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

Вариант His в кодоне 48 гена *ADH1B* (прежнее название *ADH2*) по сравнению с типичным вариантом 48Arg (дикий тип) ведет к более эффективному метаболизму этанола. Именно поэтому предполагается, что полиморфизм вариантов *ADH1B*Arg48His* является одной из генетических составляющих в проблеме алкоголизма.

В ряде публикаций высказывалась обоснованная гипотеза, что аллель *ADH1B*48His* является протективным против алкоголизма из-за обуслов-

ленного им быстрого расщепления алкоголя [1]. Хан и соавт. [2], изучив аллельный полиморфизм в популяциях Восточной Азии по некоторым локусам, связанным с метаболизмом алкоголя, пришли к заключению, что аллель 48His находится либо находился в прошлом под давлением позитивного отбора. Исследование [3] подтвердило это предположение для популяций китайцев хань, корейцев и японцев.

Чтобы провести оценку типа и характеристик отбора по вариантам *ADH1B*Arg48His*, были иссле-

дованы частоты аллелей в четырех различных группах популяций Азии. При этом использовались статистические модели популяционной генетики, а основным инструментом исследования послужило стационарное распределение Райта [4]. Хотя полная стационарность и равновесие аллельных частот выглядят крайне сомнительно, есть основание предполагать квазистационарность в истории микроэволюции популяций. В рамках квазистационарной модели этапы стабильности разделены периодами изменений, вызванными, например, масштабными миграциями или сокращениями численности популяций и соответствующими эффектами «горлышка бутылки». В таких условиях использование стационарного распределения выглядит допустимо.

Материал и методы

Стационарное распределение Райта применялось в том виде, который оно имеет с учетом давления отбора, миграций и случайного генетического дрейфа. Для учета дрейфа генов использована оценка эффективного размера $N = 200$, которая соответствует среднему размеру сельской элементарной популяции с традиционным типом хозяйствования и экономических отношений [5]. Скорость миграций, соответствующая подобной элементарной популяции, взята из средних оценок по ценовым данным второй половины XX в. В среднем она составляет $m = 0,02$ [6–8].

Варианты Arg48His локуса *ADH1B* определяются однонуклеотидным полиморфизмом (SNP) rs1229984 – транзиция G→A ведет к замене Arg на His. Исходные данные об этом полиморфизме взяты из общедоступной базы данных ALFRED [9]. Из всего объема доступных данных были отобраны только те, которые относятся к нативному (коренному) населению. Выборки из профильных медицинских учреждений, как и другие, которые нельзя было считать случайными, были исключены из анализа. Все отобранные данные были разделены на четыре этногеографические группы: центрально-азиатская группа (киргизы, монголы, памирцы, таджики, туркмены, узбеки, дауры, уйгуры, алтайцы и буряты – всего 23 популяции); китайцы хань из восточного и юго-восточного Китая (19 популяций); индокитайская группа (Лаос, Вьетнам, Камбоджа, Таиланд – 39 популяций); Япония и Корея (15 популяций). Итого анализу было подвергнуто 96 популяций.

Результаты и обсуждение

Начальная попытка проанализировать весь совокупный объем данных ведет к слабо достоверным результатам: аппроксимация эмпирического распределения теоретическим имеет $\chi^2(n = 4) = 6,90$ с

уровнем достоверности $Cf = 0,11$. Разделение данных на группы по принципу историко-географической близости популяций дает более правдоподобные результаты. Оценки параметров отбора для всех четырех групп приведены в табл. 1.

В силу особенности метода оценки приспособленностей их значения зависят от эффективного размера популяций N . Эффективный размер для идеальной панмиктической популяции можно оценить из самих данных о генетическом полиморфизме. Наблюдаемый индекс межпопуляционного разнообразия имеет вид $F = \sigma^2/(pq)$, где p, q – частоты аллелей, а σ^2 – дисперсия частот. С другой стороны, теоретически ожидаемый уровень межпопуляционного разнообразия равен $F = 1/(4Nm + 1)$ [10]. И хотя эта модель предполагает селективную нейтральность, грубую оценку эффективного размера можно получить путем решения уравнения $F = \sigma^2/(pq) = 1/(4Nm + 1)$. Проанализировав данные о частотах полиморфизма 48His, были получены значения $N = 73, 251, 132, 589$ соответственно для групп популяций из Центральной Азии, китайцев хань, индокитайцев, японцев и корейцев. Среднее значение составило $N = 261$, что с учетом грубости проведенных оценок приблизительно соответствует значению $N = 200$, полученному из демографических данных, и подтверждает обоснованность выбора именно такого значения N .

Коэффициенты приспособленности отдельных генотипов во всех четырех группах популяций показывают преимущество аллеля 48His над аллелем 48Arg. Тем самым подтверждается позитивный отбор по аллелю 48His, предположение о котором высказано ранее [2].

Относительные приспособленности генотипов в виде $1, 1+hs, 1+s$, где первый коэффициент соответствует предковой форме 48Arg*48Arg, позволяют анализировать гетерозиготный и гомозиготный эффект отбора. Эффект позитивного отбора в пользу 48His для всех четырех групп следует из $s > 0$ для значений в табл. 1.

Более подробно тип и характер отбора можно получить, детально анализируя гетерозиготный эффект h и сравнивая значения приспособленностей w_{ij} для каждой группы с соответствующими приспособленностями для других групп. В Центральной Азии и в Индокитае отрицательные значения h иллюстрируют преимущество гомозигот. Для китайцев хань, японцев и корейцев значения h , напротив, положительны. Это соответствует тому, что w_{12} превосходит w_{11} и еще более превосходит w_{22} для указанных двух групп. Таким образом, в четырех этногеографических группах наблюдаются существенные различия в характере отбора.

Таблица 1

Параметры приспособленности генотипов *ADH1B**Arg48His

| Этногеографический кластер | Коэффициент приспособленности | | | | s | h | $\chi^2(Cf)$ |
|----------------------------|-------------------------------|-------------|-------------|------------------|------|-------|--------------|
| | 48His/48His | 48His/48Arg | 48Arg/48Arg | Среднее значение | | | |
| Центральная Азия | 1,024 | 0,983 | 1,008 | 0,999 | 0,02 | -1,57 | 3,38 (0,34) |
| Китайцы хань | 0,997 | 1,008 | 0,984 | 1,000 | 0,01 | 1,88 | 1,31 (0,73) |
| Индокитайцы | 1,018 | 0,987 | 1,007 | 0,999 | 0,01 | -1,72 | 0,30 (0,96) |
| Японцы и корейцы | 0,984 | 1,049 | 0,878 | 1,001 | 0,12 | 1,61 | 2,19 (0,53) |

П р и м е ч а н и е. s – коэффициент отбора, h – гетерозиготный эффект, Cf – уровень достоверности χ^2 .

Теоретически можно выделить два существенно отличающихся типа положительного отбора. Отбор в пользу гетерозигот, при котором существует не тривиальная точка равновесия частот, называется стабилизирующим, или балансирующим, отбором. Если гетерозиготы менее приспособлены и отбор идет в пользу гомозигот, такой тип отбора называется дизруптивным, или разнообразящим. Полученные результаты говорят о том, что для хань из восточного и юго-восточного Китая, а также для корейцев и японцев отбор имеет стабилизирующий тип, а для популяций из Центральной Азии и Индокитая – дизруптивный тип.

Выборка популяций японцев и корейцев характеризуется экстремально высоким значением коэффициента отбора s , что может указывать на существенный отбор. Конечно, такая оценка должна интерпретироваться с особой осторожностью, так как может являться следствием неверного объединения различных популяций в единый этногеографический кластер.

В работе [3] приведены доводы в пользу положительного отбора в системе *ADH1B* для различных популяций, включая китайцев хань, японцев и корейцев. Популяции Центральной Азии в работе [3] не исследовались, а наблюдаемый полиморфизм аллелей *ADH1B* у индокитайцев, по мнению авторов, вызван, скорее, случайным дрейфом, чем положительным отбором. Строго говоря, эффект случайного дрейфа может показаться проявлением стабилизирующего отбора, если при анализе отбора эффективный размер популяции был недооценен. С другой стороны, случайный дрейф может выглядеть как проявление дизруптивного отбора, если эффективный размер был переоценен. Уточнение генетико-демографических данных могло бы прояснить этот вопрос.

Дополнительные интересные результаты может дать сравнение коэффициентов отбора среди изученных групп популяций с потреблением алкоголя. Потребление алкоголя для различных национальностей и этнических групп, по всей видимости, остается неизученным, однако существуют данные Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) о потреблении в различных странах. В табл. 2 приведены данные о потреблении для тех стран, в которых сосредоточена большая часть популяций из четырех изученных этногеографических групп.

При этом за оценку потребления алкоголя для популяций Центральной Азии принята взвешенная средняя величина потребления в Киргизии, Монголии, Таджикистане, Узбекистане и Туркменистане, причем в качестве весов бралось число популяций из этих стран. Центрально-азиатская группа содержит еще 11 популяций, которые не относятся к перечисленным пяти странам, это 7 популяций из России (алтайцы и буряты), а также 4 популяции из Китая (дауры и уйгуры). Эти 11 популяций не учитывались при расчете потребления для Центральной Азии, что выглядит вполне оправданным, так как национальные алкогольные традиции для всей России и для всего Китая могут существенным образом отличаться от традиций потребления алкоголя в перечисленных локальных популяциях с центрально-азиатскими корнями. Уровень потребления в Китае будет служить хорошей оценкой для потребления у китайцев хань, так как именно они составляют ос-

новную часть населения Китая. Взвешенная средняя для Лоаса, Вьетнама, Камбоджи и Таиланда использована как оценка потребления в группе индокитайской группы, поскольку к этим странам относятся все индокитайские популяции, за исключением популяций хмонг из Китая. Наконец, взвешенная средняя для Кореи и Японии использована для оценки потребления в четвертой группе популяций.

Таблица 2

Потребление алкоголя среди взрослого населения (15+) в среднем за 2003–2005 гг. (в литрах чистого алкоголя) (данные из доклада ВОЗ, http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/)

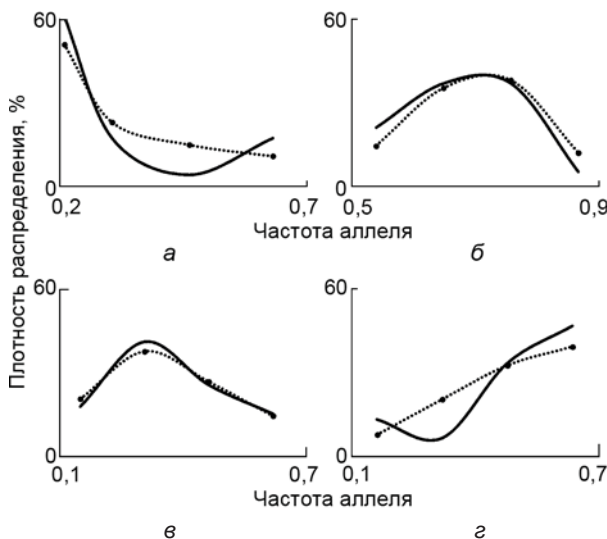
| Страна | Потребление | Потребление для кластеров* |
|-------------|-------------|----------------------------|
| Киргизия | 5,1 | 3,8 |
| Монголия | 3,2 | |
| Таджикистан | 3,4 | |
| Узбекистан | 3,5 | |
| Туркмения | 4,6 | |
| Китай | 5,9 | 5,9 |
| Лаос | 6,7 | 6,6 |
| Вьетнам | 3,8 | |
| Камбоджа | 4,8 | |
| Таиланд | 7,1 | |
| Япония | 8,0 | 10,7 |
| Южная Корея | 14,8 | |

* Потребление для кластеров рассчитано как средневзвешенное на количество популяций.

Конечно, сопоставление данных о потреблении из табл. 2 с приспособленностями генотипов *ADH1B*Arg48His* необходимо проводить с некоторой осторожностью. Четыре рассматриваемые группы могут существенно различаться в традициях и образе жизни. Так, японцы и корейцы проживают в странах с одним из самых высоких уровней жизни в последние десятилетия, что может сказываться на увеличении потребления алкоголя. Некоторые из популяций Центральной Азии являются мусульманскими, где потребление алкоголя запрещено религией. Основной религией в Индокитае является буддизм, а у китайцев хань практикуется буддизм, таоизм и конфуцианство. Все эти обстоятельства очевидным образом влияют на потребление алкоголя. И все же из табл. 1 и 2 видно, что высокий коэффициент отбора для японцев и корейцев может быть связан в том числе и с высоким уровнем потребления алкоголя на фоне остальных этногеографических групп. Такое соответствие полученных оценок отбора и наблюдаемого потребления алкоголя служит дополнительным подтверждением обоснованности использованного статистического подхода и надежности полученных оценок коэффициентов приспособленности.

Средняя приспособленность в табл. 1 отражает степень давления отбора при наблюдаемых аллельных частотах \bar{p} и \bar{q} , ее значение $\bar{W} = w_{11}\bar{p}^2 + 2w_{12}\bar{p}\bar{q} + w_{22}\bar{q}^2$ для всех четырех этногеографических кластеров очень близко к единице, что можно интерпретировать как крайне незначительное влияние отбора по системе *ADH1B* в дарвиновском его смысле, т.е. в отношении влияния отбора на размер популяции.

На рисунке показана аппроксимация эмпирического распределения частот теоретическим распределением. Графики иллюстрируют различные типы отбора в разных регионах. Эмпирическое распределение на этом рисунке соответствует плотности наблюдаемых частот. Плотность теоретического стационарного распределения Райта изображена в полном соответствии с коэффициентами приспособленности w_{ij} из табл. 1. Графики не только схематически показывают тип и характер отбора в каждой группе, но и отражают то, насколько хорошо теоретическая кривая стационарного распределения соответствует теоретическому распределению частот. Обе кривые эмпирического и теоретического распределения на рис. 1, б, в имеют вид вогнутой (выпуклой вверх) функции. Именно такой вид плотности распределения соответствует стабилизирующему типу отбора. Теоретические и эмпирические кривые на рис. 1, а, г имеют вид выпуклой (выпуклой вниз) функции, что соответствует либо дизруптивному, либо направленному типу отбора.



Эмпирическое (сплошная линия) и теоретическое (пунктирная линия) распределение частоты аллеля 48His в четырех этногеографических регионах Азии: а – Центральная Азия; б – китайцы хань; в – индокитайцы; г – японцы и корейцы

С формальной точки зрения значения χ^2 в табл. 1 характеризуют точность аппроксимации эмпирического распределения. Они рассчитаны для четырех интервалов и изменяются в широком диапазоне от 0,3 в Индокитае до 3,4 в Центральной Азии. Эти значения χ^2 соответствуют уровню достоверности $Sf = (1 - P)$ от 0,44 до 0,96. Одним из объяснений низкого уровня достоверности для Центральной Азии может служить то, что эта этногеографическая группа составлена из популяций многих стран достаточно обширного региона. В этом регионе можно наблюдать популяции с самыми различными доминирующими религиями и самыми разными традициями потребления алкоголя. Киргизы, памирцы, таджики, туркмены, узбеки, уйгуры преимущественно исповедуют ислам, который

запрещает употребление алкоголя, в то время как шаманизм, который не запрещает алкоголь, достаточно широко распространен среди монголов, дауров, алтайцев и бурят.

Другая группа с невысоким уровнем достоверности значения χ^2 – это японцы и корейцы. Здесь мог сказаться небольшой объем выборки – всего 15 популяций. Конечно, дальнейшее понижение значений χ^2 с соответствующим увеличением точности оценок коэффициентов приспособленности возможно также и в том случае, если мы будем обладать более точными генетико-демографическими параметрами, использованными в распределении Райта. Несмотря на трудности оценивания генетически эффективного размера популяции, ясно, что эффективный размер имеет значительную географическую изменчивость. Аналогично скорость миграции в разных регионах зависит от разных факторов и также не является постоянной в географическом пространстве. Детальная информация об этих генетико-демографических факторах может повысить точность анализа для каждой из исследованных этногеографических групп.

Итак, различные типы отбора по генотипам алкогольдегидрогеназы *ADH1B*, как дизруптивный, так и стабилизирующий, наблюдаются для различных субрегионов Азии, но абсолютно все проанализированные регионы (этнотерриториальные группы популяций) ясно демонстрируют положительный отбор в пользу варианта 48His.

Литература

1. Tolstrup J.S., Nordestgaard B.G., Rasmussen S. et al. Alcoholism and alcohol drinking habits predicted from alcohol dehydrogenase genes // *Pharmacogenomics J.* 2008. V. 8. P. 220–227. doi: 10.1038/sj.tpj.6500471.
2. Han Y., Gu S., Oota H. et al. Evidence of positive selection on a class I *ADH* locus // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 80. P. 441–456. doi: 10.1086/512485.
3. Li H., Gu S., Cai X. et al. Ethnic related selection for an *ADH* Class I variant within East Asia // *PLoS One.* 2008. V. 3 (4). P. e1881. doi: 10.1371/journal.pone.0001881.
4. Wright S. Adaptation and selection // G.L. Jepsen, G.G. Simpson, E. Mayr (Eds.). *Genetics, paleontology, and evolution.* Princeton, 1949. P. 365–389.
5. Евсюков А.Н., Жукова О.В., Шереметьева В.А. и др. География эффективного размера сельского населения Северной Евразии: I. Эффективный размер и интенсивность случайного дрейфа генов // *Генетика.* 1996. Т. 32, № 10. С. 1396–1405.
6. Евсюков А.Н., Жукова О.В., Палков В.Е. и др. География генетических процессов в народонаселении: генные миграции в Северной Евразии (Европейский регион) // *Генетика.* 1997. Т. 33, № 11. С. 1525–1536.
7. Евсюков А.Н., Жукова О.В., Рычков Ю.Г. География генетических процессов в народонаселении: генные миграции в Северной Евразии (Среднеазиатский регион) // *Генетика.* 1999. Т. 35, № 1. С. 83–94.
8. Евсюков А.Н., Жукова О.В., Рычков Ю.Г., Шереметьева В.А. География генетических процессов в народонаселении: генные миграции в Сибири и на Дальнем Востоке // *Генетика.* 2000. Т. 36, № 2. С. 271–282.
9. Osier M.V., Cheung K.H., Kidd J.R. et al. ALFRED: an allele frequency database for Anthropology // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2002. V. 119. P. 77–83. doi:10.1002/ajpa.10094.
10. Wright S. Isolation by distance // *Genetics.* 1943. V. 28. P. 114–138.

ТЕРРИТОРИАЛЬНАЯ ЭНДОГАМИЯ КАРАЧАЕВЦЕВ**Г.И. Ельчинова, А.В. Иванов, Р.А. Зинченко***Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва*

Эндогамность в популяции может практиковаться по ряду показателей – этническому, территориальному, конфессиональному и пр. [1]. Оценка уровня территориальной эндогамности является составной частью любого полноценного медико-популяционно-генетического обследования и характеризует степень изолированности и, соответственно, миграционной активности населения изучаемого региона. Взаимосвязь уровня эндогамии и распространенности наследственной патологии неоднократно обсуждалась в литературе. В популяциях с высоким уровнем эндогамии (изолятах) различными авторами отмечено накопление различных наследственных заболеваний, а количественные оценки груза наследственной патологии чрезвычайно высоки. Для подсчета индекса эндогамии используются данные о местах рождения супругов, получаемые из брачных записей отделов ЗАГСов, похозяйственных книг, архивов, церковно-приходских списков, анкетных опросов и т.д. через составление миграционных матриц.

В настоящее время сотрудниками лаборатории генетической эпидемиологии ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН (Москва) начато изучение населения Карачаево-Черкессии, проводимое в соответствии с разработанным в лаборатории протоколом, используемым более трех десятилетий, что позволяет сравнивать полученные для различных популяций оценки. Протокол включает в себя обследование больных с подозрением на наследственную патологию выездной бригадой врачей-специалистов, верификацию диагноза молекулярно-генетическими методами, проведение сегрегационного анализа для подтверждения типа наследования (аутосомно-доминантного (АД) и аутосомно-рецессивного (АР)) и определения вероятности регистрации и доли спорадических случаев в выборке, сбор популяционно-генетической информации на основе ДНК-маркеров и параметров, полученных из небологических источников информации (списки избирателей, брачные записи и демографические анкеты, собранные путем опроса женщин пострепродуктивного возраста). Традиционно в наших исследованиях выбираются районы с преобладанием титульной нации. Ранее обследованы Костромская, Кировская, Брянская, Архангельская, Ростовская, Тверская области, Краснодарский край, республики Адыгея, Марий Эл, Чувашия, Удмуртия, Башкортостан и Татарстан. Результаты сравнительного анализа груза наследственной патологии для всех изученных популяций опубликованы [2].

Карачаевцы – тюркоязычный народ на Северном Кавказе, коренное население Карачаево-Черкессии, населяющее в основном ее горные и предгорные районы по долинам рек Кубани, Теберды, Подкумка, Малки, Джегуты, Большого и Малого Зеленчука, Большой Лабы и их притокам. Они относятся к кавкасионскому антропологическому типу балкано-кавказского варианта европеоидной расы. Говорят на карачаево-балкарском языке кыпчакской группы тюркской семьи [3]. В 1828 г. карачаевский

народ присягал на верность России, признавая тем самым себя подданными русского царя [4]. 2 ноября 1943 г. состоялась депортация карачаевцев, по итогам которой в Казахстан и Киргизию были депортированы 69 267 карачаевцев. 16 июля 1956 г. правовые ограничения были сняты с чеченцев, ингушей и карачаевцев (все – без права возвращения на родину). В 1957–1958 гг. были восстановлены национальные автономии калмыков, чеченцев, ингушей, карачаевцев и балкарцев; этим народам было разрешено вернуться на свои исторические территории. Возвращение репрессированных народов осуществлялось не без сложностей, которые и тогда, и впоследствии привели к национальным конфликтам (так, в Грозненской области начались столкновения между возвращавшимися чеченцами и заселенными за время их изгнания русскими; ингушами – в Пригородном районе, заселенном осетинами и переданном Северо-Осетинской АССР) [3]. Карачаевцы старались вернуться в свои родные поселения и при возможности даже выкупить свои дома, что позволяет надеяться на сохранение традиционной популяционной структуры карачаевцев, но в то же время вносит определенные коррективы в подсчет индекса эндогамии.

Карачаевцы компактно проживают в восточной части Карачаево-Черкессии (рис. 1) – Карачаевском, Малокарачаевском, Прикубанском и Усть-Джегутинском районах [5]. В остальных районах республики численность карачаевцев не превышает трети населения, а в Хабезском районе не достигает 1%. В табл. 1 приводится характеристика изученных районов. Общая численность населения четырех районов составляет 192 тыс. человек. Население Малокарачаевского и Прикубанского районов – сельское, райцентров Карачаевского и Усть-Джегутинского районов – Карачаевска и Усть-Джегуты – городское.

Материалом для исследования послужили брачные записи для этих четырех районов Карачаево-Черкессии за 1990–2000 гг. Из анализа традиционно исключались браки, в которых женщина старше 45 лет, и браки жителей других регионов. В анализ вошли 11 280 брачных записей, из которых 7 435 – браки карачаевцев, в том числе 6 577 – моноэтнические, по которым и проводилось вычисление индекса эндогамии (ИЭ) в данной работе.

L.L. Cavalli-Sforza, W.F. Bodmer [6] определяют индекс эндогамии как долю мужей и жен, родившихся в данной популяции. В то же время значительное число карачаевцев, вступивших в брак в указанный временной период, родились в Казахстане и Киргизии вследствие депортации, и формальный учет их как мигрантов приведет к резкому смещению оценок эндогамности в сторону занижения. Поэтому мы оценили индекс эндогамии дважды – сначала формально, а потом исключив репатриантов. В дальнейшем при проведении различного рода сравнений, возможно, удастся выяснить, какой из этих способов подсчета оказался более корректным.



Рис. 1. Расположение изученных районов Карачаево-Черкессии [3]

Таблица 1
Характеристика изученных районов

| Район | Численность населения, тыс. человек | Доля карачаевцев, % |
|-------------------|-------------------------------------|---------------------|
| Карачаевский | 70,0 | 79,5 |
| Малокарачаевский | 43,3 | 87,5 |
| Усть-Джегутинский | 50,6 | 69,3 |
| Прикубанский | 29,3 | 75,7 |

В табл. 2 представлены значения индекса эндогамии для четырех районов, подсчитанные по моноэтническим карачаевским бракам. В числителе – значение ИЭ для района, в знаменателе – для республики. Даже после исключения репатриантов ИЭ для района нельзя назвать высоким, однако уроженцами республики являются 86–98% супружеских пар. Аналогичная картина наблюдалась при изучении автохтонного населения и других республик.

Таблица 2
Индекс эндогамии для четырех районов

| Район | ИЭ (формально) | ИЭ (без репатриантов) |
|-------------------|----------------|-----------------------|
| Карачаевский | 0,45/0,78 | 0,56/0,98 |
| Малокарачаевский | 0,53/0,73 | 0,63/0,86 |
| Усть-Джегутинский | 0,41/0,83 | 0,47/0,95 |
| Прикубанский | 0,29/0,81 | 0,34/0,95 |

Примечание. Первое значение – для района, второе – для республики.

Если рассмотреть отдельно ИЭ для городского населения (Карачаевска и Усть-Джегуты), то выявляется картина, аналогичная наблюдаемой ранее при изучении других регионов. В табл. 3 представлены три значения ИЭ: первый относится к городу, второй к району, третий – к республике. ИЭ в самом городе крайне низок, значительное число городского населения является уроженцами «своего» района, а доля супружеских пар из республики приближается к единице.

Таблица 3
Индекс эндогамии для двух городов

| Район | ИЭ (формально) | ИЭ (без репатриантов) |
|--------------|----------------|-----------------------|
| Карачаевск | 0,10/0,35/0,70 | 0,14/0,48/0,97 |
| Усть-Джегута | 0,07/0,38/0,80 | 0,08/0,45/0,94 |

Примечание. Первое значение – для города, второе – для района, третье – для республики.

Таким образом, Карачаево-Черкессия для карачаевцев является популяцией высшего иерархического уровня (как для городского, так и для сельского населения), а размер элементарной популяции охватывает группу районов, в которых проживают карачаевцы.

Работа выполнена в рамках плановых исследований лаборатории генетической эпидемиологии ФГБУ «МГНЦ» РАМН при финансовой поддержке РФФИ (12-04-00122, 14-04-00525, 14-04-10075).

Литература

1. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю. Генетико-демографические процессы в многонациональных популяциях // Успехи современной генетики. 1996. Вып. 20. С. 38–61.
2. Ельчинова Г.И., Спицын В.А., Зинченко Р.А. Характеристика генетической вариабельности популяций через груз аутосомно-доминантной и аутосомно-рецессивной патологии (на примере ряда сельских регионов России) // Живые и биокосные системы. 2012. № 1. <http://jbks.ru/archive/issue-1/article-4>
3. <http://ru.wikipedia.org/wiki/> (15 июля 2013)
4. Биджиева Ф.И. История возникновения и развития карачаевских фамилий, XVI – конец XX вв.: автореф. дис. ... канд. ист. наук. Карачаевск, 2002. 22 с.
5. http://www.kchr.ru/left_dop_menu/cities_and_regions/ (26 декабря 2013)
6. Cavalli-Sforza L.L., Bodmer W.F. The Genetics of Human populations. San Francisco: Ed. W.H. Freeman and Company, 1971. 965 p.

ОТРАЖЕНИЕ АССИМИЛЯЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В СТРУКТУРЕ ПОПУЛЯЦИЙ КОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ ХАКАСИЯ

М.Б. Лавряшина¹, М.В. Ульянова¹, О.А. Балаганская², Т.А. Толочко¹,
В.Г. Дружинин¹, Е.В. Балановская³

¹ Кемеровский государственный университет, г. Кемерово

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

³ Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва

Современное коренное население Республики Хакасия (РХ) представлено четырьмя группами хакасов: качинцами, койбалами, кызыльцами и сагайцами. По мнению В.Я. Бутанаева, такое деление современных хакасов возникло в начале XVIII в. и базировалось на названиях крупных хакасских сеоков: хаас, хойбал, хызыл, сагай [1, 2]. В.П. Кривоно-

гов [3] указывает, что начальные этапы сложения данных групп уходят своими корнями в период, предшествующий появлению русских на Енисее. При этом качинская группа складывалась из сеоков, ызыр, пюрют, сохы, хасха, кыргыз и других, доминировала в политическом, экономическом отношении и являлась центром консолидационных процессов ха-

касов в XVIII–XIX вв. Кызыльцы сформировались на базе тюркоязычного населения Белого, Черного Июсов и Чулыма примерно в XIX в. Сложение койбалов шло на основе консолидации тюркоязычных племен и ассимиляции ими самодийского и кетоязычного населения правобережья Енисея. Койбалы изначально формировались под влиянием качинцев, однако с 1858 г., после включения территории койбалов в состав Сагайской думы, усилилось их сближение с сагайцами, которые расширяли свою территорию за счет ассимиляции населения, живущего по левым притокам реки Абакана. В XX в. этноним «сагайцы» распространился на бельтыров. Потомки бирюсинцев и шорцев также были вовлечены в процесс формирования сагайской группы [3]. В настоящее время хакасам свойственна значительная консолидация входящих в их состав малых народностей и общая тенденция к утрате этнических самоназваний – качинцы, кызыльцы, койбалы, сагайцы.

Республика Хакасия сегодня – это регион со сложным многонациональным составом населения, что следует рассматривать как результат пережитой в прошлом серии миграционных волн, в значительной степени смешавших коренные народы с массой пришлого, разнообразного по этническому составу, но в основном славянского населения. В большинстве случаев это смешение было настолько глубоким, что приняло, по сути, форму ассимиляции, т.е. процесса последовательного растворения этнического меньшинства в среде доминирующего полиэтнического сообщества. Именно в таком контексте сегодня рассматриваются вопросы о возможной дальнейшей судьбе коренных народов Сибири на уровне научного и этнополитического дискурса, весьма острого в условиях риска утраты коренными народами не только своей культурной самобытности, но и основ этнической и генетической идентичности.

Для качественной оценки реальных масштабов и последствий ассимиляционных процессов, вне всякого сомнения, необходимо научное осмысление их основных механизмов и особенностей развития. Именно этим вызван интерес авторов настоящей работы к исследованию проявлений этнической ассимиляции коренных народов Республики Хакасия в их популяционно-генетической, брачной структуре и в динамике фонда фамилий. При этом в контексте современного генетико-демографического развития, с нашей точки зрения, наиболее важна этническая история указанных этносов с начала 20-го столетия и по настоящее время, так как данный период является временем наиболее интенсивного хозяйственного освоения Сибири и связанного с этим массового заселения ее территорий.

Материал и методы

Материал для исследования процессов ассимиляции хакасов и отражения этих процессов в популяционно-генетической структуре малых народов Хакасии был собран в комплексных экспедициях 2006–2012 гг. кафедры генетики Кемеровского государственного университета и лаборатории популяционной генетики человека Медико-генетического научного центра РАМН (г. Москва). Территориально, обследованием охвачено население Аскизского, Бейского, Орджоникидзевского, Таштыпского и Ширинского районов РХ, в которых расположены основные этнические ареалы хакасов (табл. 1).

Таблица 1
Исследованные сельские поселения в границах этнических ареалов коренных народностей Республики Хакасия

| Народности | Сельские поселения (СП) |
|------------|---|
| Качинцы | Новомарьясовское, Саралинское СП Орджоникидзевского р-на |
| Кызыльцы | Спиринское, Ефремкинское СП Ширинского р-на |
| Койбалы | Куйбышевское СП Бейского р-на |
| Сагайцы | Аскизское, Верх-Аскизское СП Аскизского р-на Таштыпское, Матурское СП Таштыпского р-на |

Источниками информации для исследования послужили записи похозяйственных книг за три временных интервала (1940-е, 1970-е, 2000-е гг.), укладываемых в границы с 1940 по 2010 г. и представляющих три непересекающихся поколения. Суммарно была скопирована информация о 29 202 хакасах и членах их семей. Анализ записей похозяйственных книг позволил составить списки фамилий коренных народов Хакасии (1 374 фамилии суммарно). Данные о распространении фамилий анализировали методом изонимии Дж.Ф. Кроу и А. Манжа [4] с использованием подходов, изложенных в работе Г.И. Ельчиновой и Н.В. Кривенцовой [5]. Были рассчитаны показатель случайной изонимии I_r , индекс миграций v и показатель разнообразия фамилий α . На основе числа общих фамилий рассчитывали коэффициент инбридинга R_i методом изонимии [6].

Структура браков была исследована на основе данных актов ЗАГС о заключении брака. Всего было проанализировано 3 345 браков, заключенных при участии хакасов. Изучали динамику частоты однонациональных и смешанных браков. Характер смешения оценивали через частоту межэтнических браков. Выделяли два типа смешения: тип 1 – браки хакасских народностей с пришлым населением и тип 2 – браки между представителями разных коренных южносибирских этносов. Для оценки динамики структуры браков применяли T -критерий Стьюдента для выборочной доли [7].

Популяционно-генетическая структура качинцев, койбалов, кызыльцев и сагайцев изучалась по данным генетических маркеров и фонда фамилий. Аутосомные ДНК-маркеры: *CCR2 Val64Ile* (SNP-полиморфизм); *CCR5 del32* (инсерционно-делеционный полиморфизм); *ACE1*, *TPA25*, *A25*, *PV92*, *ApoA1*, *B65*, *F13B* (Alu-полиморфизм) были генотипированы в 349 образцах ДНК, а классические генетические маркеры *ABO*, *Rhesus (DCcEe)*, *MN*, *Kell* – у 522 хакасов. На основе частот аллелей рассчитан коэффициент межпопуляционного разнообразия G_{st} . Генетические расстояния d между популяциями по данным фонда фамилий рассчитывали методом М. Нея [8].

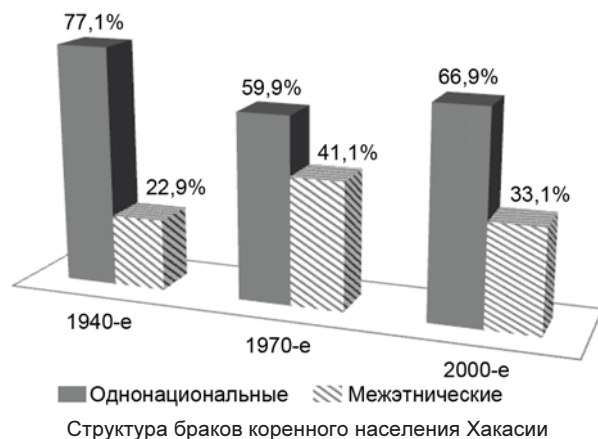
Результаты и обсуждение

Коренное население Республики Хакасия вовлечено в социально-экономические процессы, протекающие в народонаселении данного региона, что, безусловно, оказывает влияние на этнодемографическое развитие хакасов, приближая его к общей логике развития региональных популяций. С другой стороны, коренные народности нередко демонстрируют и свои специфические черты в области демографической структуры населения и тенденций его развития, что

может найти отражение в особенностях генетической структуры коренных хакасских популяций.

Структура браков в популяции является одной из важнейших генетико-демографических характеристик, привлекаемых для анализа причин возникновения различий по частотам генов между популяциями или между поколениями одной и той же популяции. Как уже упоминалось, этнические ареалы коренного населения Хакасии расположены в многонациональном регионе, для которого характерно достаточно интенсивное социально-экономическое развитие. Это оказывает влияние на все стороны жизни коренного населения, стимулирует социальные и этнические процессы, усиливает межэтническое смешение коренных народов, а главное – активизирует контакты коренных этносов с представителями пришлого населения [3].

В целом за исследованный период для хакасов свойственно преобладание доли однонациональных браков с тенденцией к их снижению (на 17,2%) в поколении 1970-х гг. и небольшом росте (на 7%) в 2000-х (рисунок). Различия в частоте однонациональных браков при сравнении в ряду поколений оказались статистически значимыми (T -критерий, $p < 0,05$).



При исследовании структуры межэтнического смешения коренных этносов необходимо учитывать как минимум два типа смешанных браков: тип 1 – браки между коренным и пришлым населением, тип 2 – браки между представителями разных

коренных этносов. Что касается межэтнических браков (тип 2), то их практика в Сибири имеет длительную историю. Сибирские коренные народы и после завершения своего формирования на протяжении всей последующей истории либо обменивались брачными мигрантами с соседними этническими группами, либо ассимилировали их [9]. Поэтому этот тип браков (тип 2) в большей степени отражает этнические процессы, которые в историческом прошлом обуславливали этногенетическое развитие коренного населения Сибири, а сейчас вследствие резкого увеличения миграционного потока генов – приводят к консолидации их генофондов. Браки же с пришлыми народами (тип 1) отражают процессы ассимиляции коренного населения носителями принципиально иного генофонда. Именно такое смешение, по нашему мнению, требует особенно пристального изучения в контексте оценки и прогноза развития и сохранения коренных народов.

Проведенное исследование динамики брачной структуры малых хакасских народов выявило выраженную специфику в распространенности межэтнических браков, их структуре, а также темпах межэтнического смешения (табл. 2).

Отметим, что качинцы, койбалы и кызыльцы по данным исследования структуры браков характеризуются высоким уровнем межэтнических браков, но, как свидетельствуют данные табл. 2, разной структурой смешения. Наиболее глубоки и интенсивны процессы межэтнического смешения у койбалов и кызыльцев. Однако если у койбалов основную долю межэтнических браков составляют браки с другими коренными народами Хакасии (тип 2), то у кызыльцев в настоящее время значительную долю (55%) составляют браки с пришлым населением (тип 1). У качинцев еще в поколении 1940-х гг. частота однонациональных браков была относительно высока (55,14%), но в поколении 2000-х гг. она уже не достигает даже 10% в общей структуре браков. Почти 60% браков у качинцев составляют браки с малыми хакасскими народами (тип 2) и более 30% занимают браки с пришлым, в основном русским, населением (тип 1). Выявленные различия в частоте однонациональных и межэтнических браков у качинцев в ряду поколений (1940-е, 1970-е, 2000-е гг.) носят статистически значимый характер (T -критерий, $p < 0,05$).

Таблица 2

Динамика структуры браков в популяциях малых народностей Республики Хакасия (по данным актов ЗАГС), % ($\bar{M} \pm m$)

| Народность | Годы (поколение) | Однонациональные браки | Межэтнические браки | |
|-------------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | | Тип 1 | Тип 2 |
| Качинцы (309 человек) | 1940-е | 55,14 ± 4,81 ^{2,3} | 18,69 ± 3,77 ² | 26,17 ± 4,25 ³ |
| | 1970-е | 27,43 ± 3,37 ^{1,3} | 37,14 ± 3,65 ¹ | 35,43 ± 3,62 ³ |
| | 2000-е | 7,41 ± 5,04 ^{1,2} | 33,33 ± 9,07 | 59,56 ± 9,46 ^{1,2} |
| Койбалы (128 человек) | 1940-е | 27,29 ± 8,30 | 17,24 ± 7,01 | 55,17 ± 9,23 |
| | 1970-е | 19,04 ± 4,28 | 14,29 ± 3,81 | 66,67 ± 5,14 |
| | 2000-е | 13,33 ± 8,78 | 6,67 ± 6,44 | 80,00 ± 10,33 |
| Кызыльцы (77 человек) | 1940-е | 23,08 ± 8,26 | 38,46 ± 9,54 | 38,46 ± 9,54 |
| | 1970-е | 9,68 ± 5,31 | 35,48 ± 8,59 | 54,84 ± 8,94 |
| | 2000-е | 10,00 ± 6,71 | 55,00 ± 11,12 | 35,00 ± 10,67 |
| Сагайцы (2 821 человек) | 1940-е | 79,84 ± 1,60 ^{2,3} | 14,45 ± 1,40 ^{2,3} | 5,71 ± 0,92 ² |
| | 1970-е | 62,99 ± 1,44 ^{1,3} | 25,09 ± 1,29 ¹ | 11,92 ± 0,97 ^{1,3} |
| | 2000-е | 67,48 ± 1,43 ^{1,2} | 28,02 ± 1,37 ¹ | 4,50 ± 0,63 ² |

Примечание. Индекс показывает наличие статистически значимых (T -критерий, $p < 0,05$) отличий между поколениями (¹ – 1940-е; ² – 1970-е; ³ – 2000-е гг.).

Результаты анализа брачной структуры в коренном населении Республики Хакасия позволяют предположить, что за три поколения высокого уровня межэтнического смешения хакасов и их ассимиляции пришлыми народами можно ожидать изменения их популяционно-генетической структуры. Популяционно-генетические исследования дают возможность определить структуру генофонда, его дифференциацию, степень генетического сходства этносов. Однако генетическая структура популяции чутко реагирует на воздействие внешних и внутренних факторов, причем произошедшие изменения могут иметь как временный, так и необратимый характер.

Основными маркерами при исследовании структуры популяций служат как собственно генетические маркеры разных классов, так и квазигенетические маркеры (фамилии). В настоящем исследовании использованы оба типа маркеров.

Изучение фонда фамилий позволяет решать широкий круг задач, в том числе исследовать генетико-демографические процессы и анализировать подразделенность популяций. Исследование хакасских фамилий показало, что спектр фамилий этнообразующего блока оказался наиболее стабильным у койбалов: такие фамилии, как Алахтаев, Чичинин, Капсаргин и Селегеев, с высокой частотой регистрируются во всех трех поколениях койбалов. Суммарная доля пяти частых фамилий у койбалов в течение всего исследованного периода (1940–2010 гг.) остается стабильной и превышает 50%. При этом показатель разнообразия фамилий α у них самый низкий (11–13%) (табл. 3). Отметим, что за исследованный временной интервал число носителей койбальских фамилий сократилось почти в 2 раза (потомки от смешанных браков редко указывают на свою принадлежность к койбалам). По всей видимости, именно в этом заключается объяснение того, как при 13%-м уровне однонациональных браков пять частых койбальских фамилий продолжают составлять более 50% в койбальском фонде фамилий. Наблюдается также трансформация антропонимикона – редкие койбальские фамилии заменяются фамилиями «чужими» (русскими, сагайскими, качинскими и др.), поэтому в целом число выявленных фамилий остается на прежнем уровне (45–49 фамилий). По мнению авторов, все это может свидетельствовать о завершении процессов этнической ассимиляции койбалов.

У всех остальных народов Республики Хакасия вклад частых фамилий в общую структуру фонда фамилий за изученный период снижается и в 2000-х гг. варьирует в пределах от 17% у сагайцев до 32% у кызыльцев. У качинцев и кызыльцев отмечено по две фамилии, регистрирующиеся с высокой частотой в каждом из исследованных поколений. У качинцев это фамилии Конгаров и Чаптыков, а у кызыльцев – Тайдонов и Янгулов. Укажем, что распространенность этих же двух фамилий у кызыльцев отмечает и Г.А. Аксянова [10]. Достаточно примечательным оказался спектр частых фамилий у сагайцев. Во всех поколениях без исключения самыми распространенными у сагайцев оказались фамилии бельтырских (Асочаков, Сагалаков, Чебодаев, Чучунов) и бирюсинских (Ахпашев, Боргояков, Мойнагашев, Сунчугашев, Толмашев, Топоев, Угдыжекков) родов (классификация фамилий В.Я. Бутанаева [11]). Анализ структуры сагайских фамилий показал, что «бельтырские» фамилии на протяжении всего исследованного временного промежутка (1940–2010 гг.) составляют 22–25%, «бирюсинские» – 58–64%, а на долю собственно «сагайских» фамилий приходится лишь 14–17%. То есть смешанный антропонимикон сагайцев хранит следы ассимиляции бельтыров и бирюсинцев. Это подтверждает мнение Г.А. Аксяновой, что «фамильный состав группы довольно надежно и продолжительно маркирует механическое движение и брачные связи населения» [10].

Далее на основе изучения фамильного состава были проанализированы особенности динамики (1940-е, 1970-е, 2000-е гг.) ряда значимых с позиций популяционной генетики показателей: индекса миграций ν , фамильного разнообразия α и показателя случайной изонимии I_r . Согласно мнению Г.А. Ельчиновой [5], показатель случайной изонимии I_r характеризует уровень инбридинга популяций, показатель разнообразия фамилий α косвенно характеризует генетическое разнообразие популяции, индекс миграции ν отражает генетическое разнообразие популяции на основе потока генов в популяцию и из нее (табл. 3).

На современном этапе минимальные показатели инбридинга по данным показателя случайной изонимии I_r выявлены у более многочисленных народов Хакасии – сагайцев и качинцев, а максимальные – у небольших по численности койбалов и кызыльцев.

Таблица 3

Демографические показатели, характеризующие структуру популяций хакасов (данные фонда фамилий)

| Народность | Поколение (годы) | Генетико-демографические показатели | | | |
|------------|------------------|-------------------------------------|--------|--------|----------|
| | | N/N_{Φ} | I_r | ν | α |
| Качинцы | 1940-е | 1787/111 | 0,0466 | 0,0114 | 20,69 |
| | 1970-е | 3137/190 | 0,0247 | 0,0126 | 39,99 |
| | 2000-е | 2370/226 | 0,0204 | 0,0203 | 49,03 |
| Койбалы | 1940-е | 786/49 | 0,0701 | 0,0166 | 13,23 |
| | 1970-е | 741/48 | 0,0832 | 0,0149 | 11,21 |
| | 2000-е | 400/45 | 0,0805 | 0,0286 | 11,38 |
| Кызыльцы | 1940-е | 354/46 | 0,0543 | 0,0423 | 18,36 |
| | 1970-е | 334/56 | 0,0523 | 0,0544 | 19,22 |
| | 2000-е | 274/62 | 0,0376 | 0,0936 | 28,31 |
| Сагайцы | 1940-е | 4190/271 | 0,0192 | 0,0122 | 51,74 |
| | 1970-е | 5122/292 | 0,0202 | 0,0095 | 48,87 |
| | 2000-е | 6649/439 | 0,0125 | 0,0119 | 79,85 |

Примечание. N – число человек; N_{Φ} – число фамилий.

Этот вывод подтверждает и малое разнообразие фамилий у койбалов ($\alpha = 11,38$), у кызыльцев ($\alpha = 28,31$) (2000-е гг.).

У сагайцев отмечено самое высокое среди исследованных народностей Хакасии разнообразие фамилий с тенденцией к нарастанию ($\alpha = 51,74$ в 1940-е гг. до $\alpha = 79,85$ в 2000-е гг.). Этого следовало ожидать, учитывая, что антропонимикон сагайцев аккумулировал фонд фамилий бельтыров и бирюсинцев. В целом сопоставление в ряду поколений (1940-е, 1970-е, 2000-е гг.) у хакасов коэффициентов случайной изонимии I_r , показателя разнообразия фамилий α и индекса миграций v свидетельствует о снижении в коренных популяциях Республики Хакасия уровня инбридинга при увеличении миграционной активности и межэтнического смешения населения.

В качестве генетических маркеров в данном исследовании использованы как классические генетические маркеры (*ABO*, Rhesus (*DCcEe*), *MN*, *Kell*), так и аутосомные ДНК-маркеры (*CCR2 Val64Ile*, *CCR5 del32*, *ALU: ACE1*, *TPA25*, *A25*, *PV92*, *ApoA1*, *B65*, *F13B*). Коэффициент межпопуляционного разнообразия хакасов составил $G_{ST} = 2,10\%$ (по данным аутосомных ДНК-маркеров) и $G_{ST} = 1,31\%$ (по данным классических генетических маркеров). Таким образом, для хакасов по данным аутосомных ДНК-маркеров характерна в 2 раза более высокая межпопуляционная изменчивость по сравнению с бурятами ($G_{ST} = 1,0\%$), а по данным классических генетических маркеров – сопоставимая с эвенками ($G_{ST} = 1,69\%$) и киргизами ($G_{ST} = 1,82\%$). Это, по мнению авторов, отражает сохраняющееся разнообразие генофондов народностей Хакасии.

Далее по данным о частотах фамилий была построена матрица генетических расстояний d , характеризующая дистанции между поколениями хакасов (табл. 4).

Полученные данные отражают изменение популяционно-генетической структуры коренного населе-

ния Хакасии. Максимальные значения генетических расстояний между поколениями хакасов выявлены у качинцев ($d = 0,463$) и у сагайцев ($d = 0,441$) при сравнении фамильного состава поколений 1940-х и 1970-х гг. В целом анализ матрицы генетических расстояний демонстрирует специфику времени и темпов изменения популяционно-генетической структуры хакасов в период с 1940 по 2010 г. При сравнении поколений у всех коренных народностей Хакасии, кроме койбалов, наиболее отдаленным оказывается поколение 1940-х гг. У койбалов же дальше всего отстоит поколение 2000-х гг. ($d = 0,129$).

Для оценки генетического своеобразие народов используются разные методы, в том числе предложенные С. Wright [12], М. Nei [8], Л.А. Животовским [13] и др. Так как одинаковые фамилии у разных народов Хакасии встречаются крайне редко, для оценки сходства хакасских популяций по данным фамильного состава был применен коэффициент родства по изонимии R_i Г. Ласкера [6]. В целом у народностей Хакасии выявленные значения сходства по изонимии ($0 < R_i < 0,00003863$) оказываются ниже, чем у северных алтайцев и шорцев [14], что так же, как и при исследовании генетических маркеров, свидетельствует о значительной гетерогенности хакасских популяций (табл. 5). Показатель R_i , отражая процессы ассимиляции койбальского этноса качинцами и сагайцами, в течение всего исследованного интервала времени (1940–2010 гг.) характеризуется более высокими значениями при сравнении популяций койбалов – качинцев и койбалов – сагайцев, чем между другими хакасскими народностями.

При сравнении поколений 1940-х и 2000-х гг. во всех исследованных группах хакасов наблюдается рост коэффициента родства по изонимии, что отражает взаимопроникновение фамилий качинцев, койбалов, кызыльцев и сагайцев в фонд фамилий друг друга.

Таблица 4

Генетические расстояния d между тремя поколениями хакасов (фонд фамилий)

| Народность | Качинцы | | | Койбалы | | | Кызыльцы | | | Сагайцы | | |
|------------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|----------|--------|--------|---------|--------|--------|
| | 1940-е | 1970-е | 2000-е | 1940-е | 1970-е | 2000-е | 1940-е | 1970-е | 2000-е | 1940-е | 1970-е | 2000-е |
| 1940-е | – | | | 0 | | | – | | | 0 | | |
| 1970-е | 0,463 | – | | 0,052 | 0 | | 0,312 | – | | 0,441 | – | |
| 2000-е | 0,414 | 0,111 | – | 0,129 | 0,122 | 0 | 0,347 | 0,189 | – | 0,235 | 0,220 | – |

Таблица 5

Динамика числа общих фамилий и коэффициента родства по изонимии R_i у хакасов

| Народность | Годы (поколение) | Хакасы | | | |
|------------|------------------|------------|------------|------------|---------|
| | | Качинцы | Койбалы | Кызыльцы | Сагайцы |
| Качинцы | 1940-е | | 12 | 0 | 14 |
| | 1970-е | | 8 | 9 | 35 |
| | 2000-е | | 10 | 5 | 45 |
| Койбалы | 1940-е | 0,00000426 | | 0 | 18 |
| | 1970-е | 0,00000172 | | 0 | 15 |
| | 2000-е | 0,00000527 | | 1 | 15 |
| Кызыльцы | 1940-е | 0 | 0 | | 2 |
| | 1970-е | 0,00000429 | 0 | | 5 |
| | 2000-е | 0,00000385 | 0,00000456 | | 10 |
| Сагайцы | 1940-е | 0,00000092 | 0,00000270 | 0,00000067 | |
| | 1970-е | 0,00000109 | 0,00000197 | 0,00000146 | |
| | 2000-е | 0,00000143 | 0,00000282 | 0,00000274 | |

Примечание. Над диагональю указано число общих фамилий.

Анализ взаимоотношений коренных хакасских популяций в пределах трех поколений выявляет сохраняющуюся гетерогенность фамильного состава популяций качинцев, кызыльцев и сагайцев, но позволяет говорить об усилении за исследованный временной интервал (1940–2010 гг.) процессов консолидации в коренном населении Республики Хакасия.

Таким образом, проведенное исследование демонстрирует специфические черты современного этнодемографического развития коренного населения Республики Хакасия. Изучение брачной структуры выявляет процессы, направленные, с одной стороны, на консолидацию генофондов за счет межэтнического смешения различных групп хакасов, а с другой – усиление темпов их ассимиляции в результате расширяющейся практики заключения браков с пришлым, в основном славянским, населением. Анализ популяционно-генетической структуры (фонд фамилий, аутомомные ДНК и классические генетические маркеры) свидетельствует о сохраняющемся генетическом своеобразии исследованных групп хакасов, однако межэтническое смешение уже находит свое отражение в структуре популяций: данные исследования фонда фамилий говорят о сближении фамильного состава хакасов за исследованный промежуток времени (1940–2010 гг.).

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 13-06-00821а, 13-06-98014р_Сибирь_а и государственного задания Минобрнауки РФ № 2014/64.

Литература

1. Бутанаев В.Я. Этническая история хакасов XVII–XIX вв. // *Материалы к серии «Народы Советского Союза»*. Вып. 3. Хакасы. М., 1990. С. 15.
2. Бутанаев В.Я. Вопрос о самоназвании хакасов // *Этнографическое обозрение*. 1992. С. 63–69.
3. Кривоногов В.П. Этнические процессы у малочисленных народов Средней Сибири. Красноярск: Изд-во КГПУ, 1998. 320 с.
4. Crow J.F., Mange A.P. Measurement of inbreeding from the frequency of marriages between persons of the same surname // *Eugen. Quarterly*. 1965. V. 12 (4). P. 199–203.
5. Ельчинова Г.И., Зинченко Р.А., Осипова Е.В. Методы обработки популяционно-генетических данных: демографические анкеты // *Мед. генетика*, 2004. Т. 3, № 7. С. 313–320.
6. Lasker G.W. A coefficient of relationship by isonymy: a method for estimating the genetic relationship between populations // *Human. Biol.* 1977. V. 49 (3). P. 489–493.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. школа, 1990. 352 с.
8. Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. Amsterdam, 1975. 278 p.
9. Гольцова Т.В., Осипова Л.П. Генетико-демографическая структура популяций коренных народов Сибири в связи с проблемами микроэволюции // *Вестник ВОГиС*. 2006. Т. 10, № 1. С. 126–154.
10. Аксянова Г.А. амильное и антропологическое разнообразие коренного населения Приуралья и Западной Сибири // *Расы и народы: современные этнические и расовые проблемы: ежегодник / Ин-т этнологии и антропологии им. Н.Н. Миклухо-Маклая РАН*. М.: Наука, 2007. С. 277–330.
11. Бутанаев В.Я. Происхождение хакасских родов и фамилий. Абакан, 1994. 93 с.
12. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating // *Evolution*. 1965. V. 19. P. 395–420.
13. Животовский Л.А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях // *Итоги науки и техники. Серия «Общая генетика»*. Т. 8. Теоретическая популяционная генетика. М.: ВИНТИ АН СССР, 1983. С. 76–104.
14. Лавряшина М.Б. Комплексное исследование динамики демографических процессов и структуры генофонда коренных народов Южной Сибири: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2012. 49 с.

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И ИНБРИДИНГ ТЕЛЕУТОВ ПО РОДОВОМУ СОСТАВУ И МАРКЕРАМ Y-ХРОМОСОМЫ

Ф.А. Лузина¹, О.Е. Лотош¹, В.Н. Харьков^{2, 3}, В.А. Степанов^{2, 3}

¹ НИИ комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний СО РАМН, г. Новокузнецк

² НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

Структура генофонда может быть охарактеризована с помощью квазигенетических маркеров – данных фамильной и родовой принадлежности. Известно, что фамильные и родовые названия являются селективно нейтральными [1], что позволяет их использовать в качестве маркера для изучения генетической структуры популяций. Н. Мортон [2] полагает, что использование фамилий в качестве селективно нейтрального маркера по информационной значимости не уступает лучшей генетической кодоминантной системе. Это было апробировано и подтверждено рядом исследователей [3, 4].

Ю.Г. Рычков и соавт. [5, 6] показали возможность использования фамилий и родовой принадлежности в качестве контроля теоретического и фактического уровня генетической дифференциации. В дальнейшем этот подход был успешно использован в работах учеников Ю.Г. Рычкова [7, 8] и других.

Наиболее широкое применение нашли фамилии в популяционно-генетических исследованиях для

оценки коэффициентов инбридинга и его составляющих. Метод оценки коэффициента инбридинга через изонимию (браки между носителями одной фамилии) был предложен Кроу и Манжи в 1965 г. [9]. В основе этого подхода лежат следующие допущения: монофилетичное происхождение фамилий, наследование и неизменность их в длинном ряду поколений, равное представительство полов. Изонимный метод использовался при изучении инбридинга как в элементарных популяциях, так и в крупных подразделенных у разных народов [1, 3, 5–8].

Особенностью этнического состава народов Саяно-Алтая является наличие родов, где счет родства ведется по мужской линии. Изучение структуры генофонда отдельных родов позволяет раскрыть ряд вопросов, связанных с их этногенезом. Такая родовая структура характерна для различных южносибирских народов – шорцев, хакасов, северных и южных алтайцев, телеутов. Ранее каждый член рода мог называть до семи поколений своих предков по мужской

линии, но в настоящее время эта традиция уходит в прошлое.

У коренных сибирских народов, сохранивших родовое самосознание, в качестве генетических маркеров использовался род (сеок). Обилие сеоков, а также то, что одни и те же родовые названия встречаются у самых разных народов Центральной Азии, Западной и Южной Сибири, Средней Азии, Казахстана во многом объясняется сложной политической историей народов Южной Сибири – это постоянные войны и распады военно-политических объединений. Довершают эти процессы события XVII–XVIII вв., когда в Южной Сибири с особой силой сталкиваются интересы таких политических объединений, как Джунгарское государство, княжества енисейских кыргызов, княжества улусов, телеутов, русского государства, маньчжурской династии Цин [10–12].

В первой половине XVIII в. Южная Сибирь практически обезлюдела, чему способствовал уход джунгарами в начале XVIII в. около 20 тыс. телеутов и в 1703 г. – «полутысячи с три дымов» кыргызов (более 6 тыс. человек) в Джунгарию, наконец, почти полное истребление самих джунгар, телеутов и южных алтайцев цинскими войсками. Осколки некогда многочисленных народов, этнических групп, входивших раньше в племенные и государственные образования, как считает Функ [13], объединяются в своеобразные роды – сеоки и берут в качестве самоназвания этнонимы разгромленных тюркских, монгольских и других племен, народов и даже государств. Таковы, например, названия сеока кыпчак – по имени средневекового государства с центром на Иртыше. «Тёлос» – по имени тюркского народа, упоминаемого еще в древнетюркских рунических надписях. Названия сеоков «чорос» (это племя западных монголов), «тумат» и др. воспроизводят названия разбитых и рассеянных по большой территории монголоязычных племен и народов, остатки которых оказались в телеутской, алтайской, тувинской среде [13].

Основными ограничениями применения квази-генетических маркеров в популяционно-генетических исследованиях являются: полифилетичность происхождения фамилий; невозможность сравнения различных национальных групп. В отношении же использования родовых названий, по крайней мере для народов Алтае-Саянского нагорья, эти ограничения исключены. Наряду со спецификой все коренные народы Алтае-Саян имеют общие этногенетические корни, и их родовая структура представляет собой ключ к решению вопросов этногенеза этих народов, оценке коэффициента инбридинга, взаимного вклада этнических компонентов друг в друга, генетической дифференциации, выяснению степени однородности и гетерогенности.

К настоящему времени сохранность родового самосознания южно-сибирских коренных народов неодинакова: у тувинцев, шорцев оно утрачено, у телеутов сохранилось частично, зато у алтайцев сохранилось практически полностью. В целом родовой институт утратил свою роль традиционной общественной и административно-территориальной единицы, но у некоторых народов продолжает оставаться регулятором брачных отношений. Недавнее исследование демографической структуры бачатских телеутов показало, что в настоящее время на-

блюдается негативная динамика: увеличивается диспропорция в соотношении полов, возрастная структура близка к регрессивному типу, смертность превышает рождаемость, не происходит простого замещения поколений, отмечены сдвиги в перекрытии поколений. Как итог этих негативных демографических процессов происходит депопуляция телеутского этноса. Кроме этого, в популяции бачатских телеутов активно идут процессы метисации, в основном с русским [14].

Материал и методы

Материалы по родовой структуре алтайцев и телеутов получены в ходе экспедиционных работ, которые проводились в 1990-е гг. в Горном Алтае, в 1985, 1998, 2001 г. – у телеутов Беловского района под руководством Е.А. Лотоша.

В настоящее время численность телеутов составляет около 3 500 человек, основное место расселения – Беловский, Гурьевский районы и пос. Телеут в районе г. Новокузнецка Кемеровской области. Родовая принадлежность определена у 2 178 человек.

Результаты и обсуждение

У современных телеутов зафиксировано 24 рода (табл. 1). Наиболее многочисленными являются роды мундус, меркит, ютты и чорос, на их долю приходится 42,4%. Из общего списка видно, что у телеутов имеются общие сеоки с алтайцами: телес, мундус, тодош, найман, очи. Сеок тумат считается в большей степени тувинским, нежели алтайским [15]. Среди тувинцев туматы наиболее многочисленны, но среди телеутов есть и такие роды, которых нет у алтайцев: тогул, меркит, тертас. Разумеется, у телеутов есть сеоки для них явно чужие, представляющие собой осколки групп среднеазиатских и монгольских народов, вошедших в состав телеутов. Таковы сеоки: торо (среднеазиатского происхождения), пурт (переселенцы енисейских кыргызов в Джунгарию), чорос (западно-монгольские ойроты), ютты, чооты (восточно-тувинские роды) [15].

Учитывая вышесказанное, мы имеем основание сделать заключение как об общности происхождения современных телеутов и южных алтайцев, так и об их близком родстве с тувинцами и западными монголами. Это получило полное подтверждение и при исследовании ДНК-маркеров Y-хромосомы у телеутов. Южных алтайцев и телеутов объединяет присутствие специфического кластера гаплогруппы R1a1a [16]. Распределение родов в популяциях телеутов, представленное в таблицах и диаграммах, свидетельствует о том, что популяции отличаются как по набору родов, так и по их частоте. Явное преобладание отдельных родов в каждой популяции телеутов и в целом позволяет предположить наличие таких факторов популяционной динамики, как дрейф генов, эффект родоначальника и, как следствие, межпопуляционный уровень генетического разнообразия.

На основе данных родового и фамильного состава был рассчитан коэффициент инбридинга, генетические расстояния между популяциями внутри этнических групп и между ними, а также получена оценка уровня генетического разнообразия ($F-r$), рассчитанная на основе вариантов (наблюдаемой, выборочной, скорректированной и стандартизированной).

Таблица 1

| Название рода | Населенный пункт | | | | | | | | |
|---------------|------------------|--------|--------|---------|-----------|------------|--------|--------|------------|
| | Белово | Телеут | Шанда | Беково | Челухоево | Верховская | Улус | Черта | Новобочаты |
| Меркит | 0,0710 | 0,1773 | 0,1067 | 0,0675 | 0,1383 | 0,1344 | 0,0268 | 0,0909 | 0,0850 |
| Мундус | 0,0874 | 0,0213 | 0,1644 | 0,0591 | 0,0902 | 0,1774 | 0,2953 | 0,125 | 0,1765 |
| Телес | 0,0656 | 0,0106 | 0,16 | 0,097 | 0,0220 | 0,0054 | 0,0805 | 0,1174 | 0,0196 |
| Тонгул | 0,0820 | 0,0071 | 0,0711 | 0,1097 | 0,1022 | 0,0484 | 0,0537 | 0,0189 | 0,0065 |
| Чалмалу | 0,0055 | 0,1986 | 0,0089 | 0 | 0,0060 | 0 | 0,0067 | 0,0455 | 0,1046 |
| Тодош | 0,0874 | 0,0426 | 0,2178 | 0,1181 | 0,0341 | 0,1398 | 0,1611 | 0,0038 | 0,0392 |
| Теткер | 0 | 0,2128 | 0 | 0 | 0,0040 | 0,0108 | 0 | 0 | 0 |
| Торо | 0,0710 | 0 | 0,0267 | 0,0970 | 0,0281 | 0,0054 | 0,0134 | 0,0227 | 0,0065 |
| Очу | 0,0383 | 0,1418 | 0,04 | 0,0422 | 0,0441 | 0,0108 | 0,0067 | 0,1515 | 0,1307 |
| Мерет | 0,0055 | 0,0142 | 0,0089 | 0 | 0,0120 | 0,0269 | 0 | 0,0038 | 0,0523 |
| Тумат | 0,0437 | 0,0071 | 0,0267 | 0,0422 | 0,0962 | 0,0108 | 0,0067 | 0,0038 | 0 |
| Чорос | 0,1913 | 0,0532 | 0,0311 | 0,101.3 | 0,0882 | 0,1290 | 0,2953 | 0,0530 | 0,0131 |
| Пурут | 0 | 0 | 0,0311 | 0,0042 | 0 | 0,0108 | 0 | 0 | 0 |
| Каатын | 0 | 0 | 0 | 0,0169 | 0,0020 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Найман | 0,0820 | 0,0142 | 0,0133 | 0,0633 | 0,1002 | 0,1075 | 0,0134 | 0,1515 | 0,1307 |
| Тертас | 0,0383 | 0 | 0,0267 | 0,0633 | 0,0541 | 0,0538 | 0 | 0,0492 | 0,0131 |
| Чишан | 0 | 0,0106 | 0 | 0 | 0,0140 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ютты | 0,0820 | 0,0071 | 0,0444 | 0,0802 | 0,1263 | 0,1237 | 0,0403 | 0,1098 | 0,0327 |
| Каннютты | 0,0492 | 0,0071 | 0,0089 | 0,0127 | 0,0180 | 0 | 0 | 0,0038 | 0,1634 |
| Аба | 0 | 0 | 0 | 0,0253 | 0,0140 | 0,0054 | 0 | 0,0076 | 0,0065 |
| Челей | 0 | 0,0461 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Таеш | 0 | 0,0 | 0,0089 | 0 | 0,0060 | 0 | 0 | 0,0379 | 0 |
| Шор | 0 | 0,0284 | 0,0044 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Тюльбер | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,0038 | 0,0065 |
| Теленгит | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,0131 |
| Сумма | 183 | 282 | 225 | 237 | 499 | 186 | 149 | 264 | 153 |

Всего 2 178

Коэффициенты инбридинга в популяции телеутов

Коэффициент инбридинга был определен по современной частоте рода методом изонимии. В популяции телеутов он колеблется в основном от 0,021 до 0,036 и достигает максимума в популяции улус – 0,053. Такой высокий коэффициент инбридинга возможно объяснить тем, что на долю двух сеоков – мундус и чорос – приходится почти 60%. Естественно, это порождает и высокий уровень инбридинга. Коэффициент инбридинга для общей телеутской популяции равен 0,018. Таким образом, открываемый изонимным методом уровень инбридинга в популяции телеутов соответствует четвероуродным сибсам.

Для сравнения аналогичные показатели вычислены по фамильному составу. У телеутов выявлено 84 фамилии (в среднем на каждый род приходится 3,5 фамилии), коэффициент инбридинга 0,008 оказался на порядок ниже соответствующего коэффициента, рассчитанного по роду. Так же как и по частоте рода, наиболее инбредным оказалось с. Улус и наименее – Беково-Челухоево и Шанда. Стандартизованная вариация по частоте фамилий оказалась ниже соответствующей родовой и составила 0,021–0,023. Считаем, что фамильный состав можно использовать в качестве адекватного критерия оценки инбридинга методом изонимии при условии введения соответствующего родового поправочного коэффициента, этот коэффициент должен быть своим для каждой этнической группы.

Среди этнических групп алтайцев наиболее высокие значения коэффициента инбридинга отмечены у теленгитов и северных алтайцев. Эти группы более обособлены и однородны по родовому составу по сравнению с телеутами, алтай-кижи и маймаларами.

Генетические расстояния

Анализ генетических расстояний является частью изучения генетической структуры систем популяций. Генетические расстояния позволяют получить интегральную характеристику по комплексу генетических маркеров, в обозримом виде представить результаты обследованных популяций, легче выявлять закономерности межпопуляционной вариабельности, проводить сравнения с априорными предположениями о факторах, детерминирующих генетическую изменчивость [12, 17, 18].

Для того чтобы количественно определить местоположение популяций относительно друг друга, был использован метод оценки генетических расстояний по Cavalli-Sforza [17] (табл. 2).

Таблица 2

| Обобщенные генетические расстояния между популяциями телеутов по современной частоте рода | | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| Белово | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Телеут | 0,038 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Шанда | 0,01 | 0,037 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Беково | 0,004 | 0,045 | 0,009 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Челухоево | 0,006 | 0,034 | 0,014 | 0,007 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Верховская | 0,01 | 0,037 | 0,013 | 0,012 | 0,008 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Улус | 0,012 | 0,045 | 0,013 | 0,017 | 0,022 | 0,014 | 0 | 0 | 0 |
| Черта | 0,013 | 0,033 | 0,017 | 0,016 | 0,011 | 0,018 | 0,026 | 0 | 0 |
| Новобочаты | 0,02 | 0,029 | 0,024 | 0,028 | 0,021 | 0,024 | 0,034 | 0,014 | 0 |

Наименьшие генетические расстояния выявлены между популяциями Беково, Челухоево и Верховская. Наиболее удаленной оказалась популяция

пос. Телеут Новокузнецкого района, и причина этого, вероятно, в географической удаленности от основного телеутского этнического ядра. Итогом всех генетических процессов, протекающих в популяциях, является уровень их генетической дифференциации.

На следующем этапе работы был оценен уровень генетической дифференциации и инбридинг через F_{st} Райта [19, 20], а также проведено сравнение межпопуляционной вариабельности, вычисленной на основе данных генетических маркеров, родовой структуры и фамильного состава (табл. 3). В расчетах использовались наблюдаемая, выборочная и стандартизованная варианты. F_{st} является структурной компонентой инбридинга, возникшей в силу подразделенности популяций, и в то же время является стандартизованной вариансой частоты гена и в этом случае выступает как мера генетической дифференциации.

Таблица 3

Оценки инбридинга и уровня генетической дифференциации (F_{st} Райта)

| Этническая группа | По данным генетической структуры | По данным родовой структуры | По данным фамилий |
|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| Телеуты | 0,0239 | 0,038–0,039 | 0,021–0,023 |
| Теленгиты | 0,0371 | 0,0389 | – |
| Южные алтайцы | 0,0468 | 0,0577 | – |
| Горный Алтай | 0,0659 | 0,0751 | – |
| Этнические группы алтайцев и телеутов | 0,028 | 0,034 | – |
| Этносы Южной Сибири | 0,0174 | – | – |

Сравнение оценок инбридинга по квазигенетическим и классическим генетическим маркерам показало, что F-статистики по своим значениям являются достаточно близкими, но по роду они в среднем в 2,5 раза выше, чем по фамилиям. На уровне этнических групп межпопуляционная вариабельность по роду составила 0,034, на микропопуляционном уровне она выше. Коэффициент инбридинга на микропопуляционном уровне увеличивается с расширением географического ареала популяций и уменьшается с переходом на более высокий уровень иерархии. Оценки случайного инбридинга, полученные изомимным методом, и F_{st} Райта близки по значениям на всех уровнях подразделенности популяций. Вопрос о том, в какой мере оценивание инбридинга по родам соответствует оценке инбридинга (F_{st}) по классам генетических маркеров, всегда остается открытым. И снять вопрос может лишь прямое сопоставление.

Итак, близкие значения инбридинга и F_{st} указывают на следующее:

- на высокую информативность квазигенетических маркеров, что позволяет широко их использовать для изучения структуры подразделенного генофонда населения;

- уровень случайного инбридинга F_{st} по данным о генетических и квазигенетических маркерах оказался достаточно близким, что позволило дать детальное описание генетической структуры телеутов на основе «неклассических» маркеров, таких как род и фамилии;

- поскольку сбор информации по квазигенетическим маркерам требует меньших материальных

затрат, то целесообразно при планировании исследования проводить вначале широкое исследование географии родов и фамилий, а затем генетические исследования тех популяций, которые наиболее полно отражают особенности данного этноса.

Анализ телеутских родов по гаплотипам Y-хромосомы

Ранее по данным о родовом составе хакасов и генетической характеристике отдельных сеоков обнаружено, что их генофонд, маркируемый высокоспецифичными кластерами YSTR-гаплотипов, структурирован прежде всего по родовому принципу. Оценка генетической дифференциации между отдельными родами показывает огромную долю различий между сравниваемыми единицами (сеоками), достигающими 50%. Именно родовой уровень организации генофонда указанных южно-сибирских этносов наиболее точно характеризует его популяционную структуру [21].

По тому же набору генетических маркеров было проведено и генотипирование телеутов – 36 мужчин, жителей населенных пунктов Беково, Белово, Верховское и Черта Беловского района, Шанда Гурьевского района Кемеровской области. Это основной ареал расселения бачатских телеутов. Чтобы проверить, является ли сеок у телеутов кровнородственным объединением, имеющим одного родоначальника по мужской линии, или осознание такой общности является лишь условностью и сеок является общностью людей, проживающих на одной территории, но не связанных генетическим родством по отцовским генеалогическим линиям.

Были обнаружены следующие сеоки: меркит (5 человек и 4 фамилии), мундус (5 и 3), найман (4 и 1), очу (3 и 3), телес (1 и 1), тогул (4 и 1), тодош (5 и 1), чорос (2 и 1), ютты (5 и 2). Результаты тестирования бачатских телеутов показали следующее. Единственная гаплогруппа у сеока меркит – N1c1, мундус – R1a1a, найман – N1c1, очу – основная R1a1a, телес – R1b1b1, тогул – R1b1b1, тодош – R1a1a, ютты – R1b1b1. Не удалось определить основную гаплогруппу у сеока чорос. Также сеоки найман, тогул представлены одной фамилией, а телес – одним человеком, поэтому связывает эти сеоки с какой-либо гаплогруппой преждевременно. Наиболее показательно родство между всеми представителями сеока меркит. Кроме того, гаплотипы представителей сеока найман (4 человека и 1 фамилия) полностью идентичны с гаплотипами меркитов. Вероятнее всего, это либо неправильное соотнесение фамилии или сеока, либо представители этой фамилии генетически происходят от представителей другого сеока.

Также показательно родство между всеми представителями сеока мундус (5 и 3) – R1a1a. При этом генетически близки им представители сеока тодош. Сеок ютты не относится к телеутским, а к особой этнической группе – аш-кыштым. Все представители этого сеока явные родственники (5 человек и 2 фамилии) – R1b1b1. Генетически близким к сеоку ютты оказался сеок тогул, который также не относят к телеутским. Таким образом, генетическое исследование Y-хромосомы бачатских телеутов, как и у хакасов, доказывает, что сеок является прежде всего объединением родственников по мужской линии.

Литература

1. Ревазов А.А., Парадеева Г.М., Русакова Г.И. Пригодность русских фамилий в качестве «квазигенетического» маркера // Генетика. 1986. Т. 22. № 4. С. 699–703.
2. Morton N.E. Bioassay of kinship // Theoretical Population Biology. 1971. V. 2. P. 507–524.
3. Балановская Е.В., Почешхова Э.А., Балановский О.П., Гинтер Е.К. Геногеографический анализ подразделенной популяции. География случайного инбридинга (по частотам фамилий у адыгов) // Генетика. 2000. Т. 36, № 8. С. 1126–1139.
4. Казаченко Б.Н., Ревазов А.А., Тарлычева Л.В., Лавровский В.А. Использование фамилий для изучения факторов динамики популяционной структуры // Генетика. 1980. Т. 16, № 11. С. 2049–2056.
5. Рычков Ю.Г. Система древних изолятов в Северной Азии в свете проблем стабильности и эволюции популяций. Поиски и решения на путях популяционной генетики // Вопросы антропологии. 1973. Вып. 44. С. 3–22.
6. Рычков Ю.Г., Шереметьева В.А. Генетика циркумполярных популяций Евразии в связи с проблемой адаптации человека // Ресурсы биосферы. Л.: Наука, 1976. Вып. 3. С. 10–41.
7. Воронина В.Г. Антрополого-генетическое изучение коренного населения Приморского края: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1983. 24 с.
8. Лузина Ф.А. Наследственный полиморфизм и генетические процессы в коренном населении Горного Алтая: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1987.
9. Crow J.F., Mange A.P. Measurement of inbreeding from frequency of marriages between person of the same surname // Eug. Quart. 1965. V. 12. P. 199–203.
10. Гурвич И.С. Этногенез народов Севера. М.: Наука, 1980. 278 с.
11. Златкин И.Я. История Джунгарского ханства. М.: Наука, 1983. 300 с.
12. Пасеков В.П. Генетические расстояния // Итоги науки и техники. Т. 8. М., 1983.
13. Функ Д.А. Бачатские телеуты в XVIII – первой четверти XX в.: историко-этнографические исследования // Материалы к серии «Народы и культуры». Вып. 17. Телеуты. Кн. 2. М., 1993.
14. Лузина Ф.А., Колбаско А.В., Лотош О.Е. Демографическая структура и ее динамика у телеутов // Бюл. СО РАМН. 2009. № 3 (121). С. 60–64.
15. Потапов Л.П. Этнический состав и происхождение алтайцев. Л.: Наука, 1969.
16. Харьков В.Н., Медведева О.Ф., Лузина Ф.А. и др. Сравнительная характеристика генофонда телеутов по данным маркеров Y-хромосомы // Генетика. 2009. Т. 45, № 8. С. 1132–1142.
17. Cavalli-Sforza L.L., Bodmer W.F. The genetics of human populations. San-Francisco: Freeman Co, 1971. 962 p.
18. Nei M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations // Ann. Hum. Genet. 1977. V. 41. P. 225–233.
19. Wright S. The genetical structure of populations // Ann. Eugenics. 1951. V. 15. P. 323–354.
20. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating // Evolution. 1965. № 19. P. 395–420.
21. Штыгашева О.В., Агеева Е.С., Харьков В.Н., Степанов В.А. Гены и болезни хакасов. Красноярск: Поликор, 2010. 296 с.

ВИТАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕПРОДУКЦИИ КРЫМСКО-ТАТАРСКИХ ЖЕНЩИН

Л.А. Мустафаева¹, Н.А. Козак²¹ Крымское республиканское учреждение «Медицинский центр по обслуживанию депортированных народов», г. Симферополь² Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, г. Харьков, Украина

Репродуктивное поведение женщин в значительной степени зависит от культурных традиций и различается у представителей разных этносов. В современном мире распространены моногамные браки, их тенденцией является снижение плодовитости и большая заинтересованность в выживании потомства. Такая направленность свойственна многим этническим группам [1], происходит и сейчас [2]. Это объясняется улучшением медицинского обслуживания и применением контрацепции. Информация о генетических процессах в конкретных популяциях играет важную роль в понимании многих социально-демографических и медицинских проблем. Исследования, проведенные в экономически развитых странах, показали, что около половины человеческого генофонда в следующем поколении не воспроизводится из-за гибели эмбрионов, мертворождений, неонатальной смертности и смертности до наступления репродуктивного возраста, безбрачия и бесплодных браков [3]. Многонациональное население Крыма в этом плане исследовано крайне слабо. В настоящее время в Крыму проживают более 250 тыс. крымских татар [4]. При исследовании населения Крыма были отмечены межэтнические особенности репродуктивных характеристик [5], однако целенаправленное изучение крымских татар не проводилось, поэтому целью данной статьи было изучение репродуктивного поведения крымско-татарских женщин, принадлежащих к двум смежным поколениям.

Материал и методы

Данные были собраны в 2013 г. в женской консультации крымского республиканского учреждения «Медицинский центр по обслуживанию депортированных народов» (г. Симферополь). Проведено анонимное анкетирование женщин, находящихся в пострепродуктивном возрасте (от 45 до 90 лет). Анкета включала вопросы о годе рождения женщины, ее национальности, а также национальности ее родителей. Этническую принадлежность, записанную по самоидентификации, сверяли с родословной. Учитывалось количество беременностей и их исходов: медицинские и спонтанные аборт, внематочные беременности, количество мертворождений и живорождений. Всего было анкетировано 262 женщины, среди которых 44 женщины (в возрасте 66–90 лет на момент обследования) были отнесены к первому поколению и 218 (в возрасте 45–65 лет) – ко второму поколению [6]. Сравнение групп проведено с использованием критериев t , χ^2 и F [7].

Результаты и обсуждение

В среднем 5% крымских татарок не внесли вклада в генофонд следующего поколения. У первого поколения татар доля таких женщин была меньше (4,5%), чем у женщин второго поколения (5,5%, $p > 0,05$). За одно поколение число рожавших женщин существенно не изменилось: в первом периоде –

95,5%, во втором – 94,5%. При этом увеличилась доля женщин, прибегнувших к искусственному прерыванию беременности. Если в первом поколении таких было 34%, то во втором в 1,5 раза больше – 45%. Спонтанные аборт отметили около 33% женщин из всей выборки, и только три указали на внематочную беременность, что в первом поколении составило 2,3%, во втором – 0,9%. Почти в 2 раза увеличилось количество женщин, имевших мертворождения: 4,5 и 9,2% ($p > 0,05$). Искусственно прерваны почти пятая часть беременностей женщинами из первого поколения (18,4%) и около четверти (24,3%) – женщинами из второго поколения ($p > 0,05$). Доля реализованных зигот во втором поколении стала меньше, чем в первом (67% против 69%, табл. 1).

Таблица 1
Доля женщин различных поколений с различными исходами беременностей

| Показатель | Поколения | | p |
|---|-----------|------|-------|
| | 1-е | 2-е | |
| Количество женщин не имевших беременностей, % | 44 | 218 | >0,05 |
| нерожавших, % | 4,5 | 5,5 | >0,05 |
| имевших медицинские аборт, % | 34,1 | 45,4 | >0,05 |
| имевших спонтанные аборт, % | 31,8 | 33,5 | >0,05 |
| имевших внематочные беременности, % | 2,3 | 0,9 | >0,05 |
| имевших мертворождения, % | 4,5 | 9,2 | >0,05 |
| Искусственно прерванные беременности, % | 18,4 | 24,3 | >0,05 |
| Реализованные зиготы, % | 68,6 | 66,8 | >0,05 |

Примечание. p – уровень значимости разницы между поколениями.

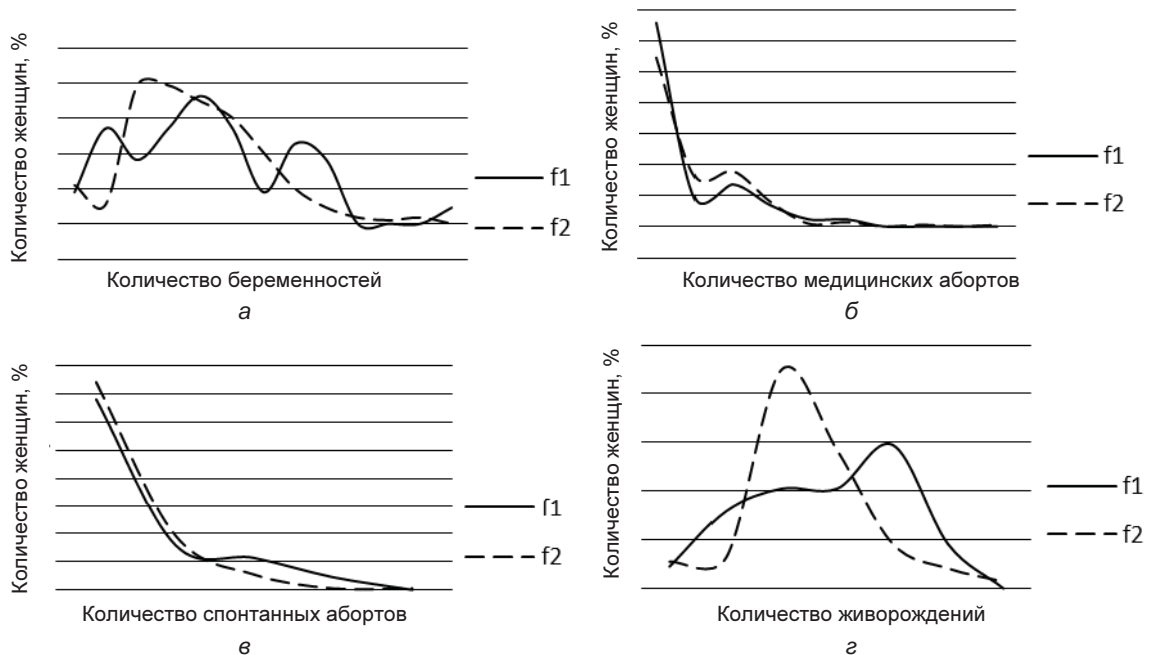
В среднем у крымско-татарской женщины первого поколения за репродуктивный период было 4,2 беременности, у женщин второго поколения этот показатель несколько ниже и составляет 3,8. На одну женщину первого поколения усредненно приходится менее одного медицинского аборта (0,8), во втором

поколении этот показатель увеличился до 0,9. На женщину первого поколения приходится примерно 0,5 самопроизвольного аборта и 0,02 внематочной беременности. Эти показатели у женщин второго поколения уменьшились и составляют соответственно 0,3 и 0,01. У женщины первого поколения число родов в среднем составляет 2,9, во втором поколении этот показатель уменьшился до 2,6. Не все дети рождались живыми. Если в первом поколении среднее число живорожденных детей составляло 2,8, то во втором – 2,5. На долю мертворождений у одной женщины первого поколения (0,07) приходилось 2,4% от общего числа родов. Во втором поколении этот показатель увеличился не только абсолютно (0,09), но и относительно, составив 3,5%. Модальные классы в двух поколениях отличались более чем в 1,5 раза по количеству беременностей (4,0 для первого поколения и 2,5 для второго) и в 2 раза по живорождениям и родам (4,0 и 2,0 для первого и второго поколений соответственно, табл. 2, рисунок).

Таблица 2
Среднее число беременностей и их исходов у женщин первого и второго поколения

| Показатель | Поколение | | | | p |
|--------------------------|---------------------------|-----|---------------------------|-----|-------|
| | 1-е | | 2-е | | |
| | $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ | s | $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ | s | |
| Беременности | 4,2 ± 0,4 | 2,6 | 3,8 ± 0,3 | 2,1 | >0,05 |
| Медицинские аборт | 0,8 ± 0,1 | 1,3 | 0,9 ± 0,06 | 1,4 | >0,05 |
| Спонтанные аборт | 0,5 ± 0,08 | 0,9 | 0,3 ± 0,02 | 0,6 | >0,05 |
| Внематочные беременности | 0,02 ± 0,003 | 0,1 | 0,01 ± 0,001 | 0,1 | >0,05 |
| Роды | 2,9 ± 0,2 | 1,3 | 2,6 ± 0,07 | 1,0 | >0,05 |
| Мертворождения | 0,07 ± 0,01 | 0,3 | 0,09 ± 0,01 | 0,3 | >0,05 |
| Живорождения | 2,8 ± 0,4 | 1,4 | 2,5 ± 0,2 | 1,1 | >0,05 |

Примечание. $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ – среднее арифметическое со статистической ошибкой, s – стандартное отклонение, p – уровень значимости разницы между поколениями.



Распределение числа беременностей и их исходов в двух поколениях. а – беременности; б – медицинские аборт; в – спонтанные аборт; г – живорождения; f1 – первое поколение, f2 – второе поколение

Таблица 3

Число беременностей и живорождений у женщин двух поколений в зависимости от семейного анамнеза

| Поколение | Анамнез | <i>n</i> | Беременности $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ | <i>p</i> | Живорождения $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ | <i>p</i> |
|-----------|-------------|----------|--|----------|--|----------|
| 1-е | Не отягощен | 29 | 3,0 ± 0,4 | <0,001 | 2,4 ± 0,3 | <0,05 |
| | Отягощен | 15 | 6,6 ± 0,5 | | 3,5 ± 0,3 | |
| 2-е | Не отягощен | 150 | 3,2 ± 0,2 | <0,001 | 2,4 ± 0,04 | <0,05 |
| | Отягощен | 68 | 5,1 ± 0,2 | | 2,7 ± 0,1 | |

Примечание. *n* – количество наблюдений.

Все обследованные были разделены на две группы. Одну из них составили женщины, у которых в анамнезе имелись неблагоприятные исходы беременности (спонтанные аборт, внематочные беременности, мертворождения) – отягощенный анамнез. Группой сравнения были женщины с неотягощенным анамнезом. Так, в первом и втором поколении женщин с отягощенным анамнезом была почти треть (34,1 и 31,2% соответственно). У женщин с отягощенным анамнезом число беременностей было в 1,6–2,2 раза больше, чем у женщин с неотягощенным анамнезом. При этом и число живорожденных детей выше в семьях с отягощенным анамнезом. Эти различия больше выражены в первом поколении (2,4 против 3,5), чем во втором (2,4 против 2,7, табл. 3).

Сравнение репродуктивных характеристик крымско-татарских женщин двух смежных поколений показало, что в целом их динамика находится в русле общемировых тенденций, выражающихся в снижении рождаемости за счет искусственного регулирования.

Разные группы населения имеют различия в смертности и плодовитости, что определяет их естественный дифференциальный прирост [8]. При сравнении репродуктивных характеристик женщин славянских национальностей (русских и украинок), проживающих в Крыму [5], с данными, полученными для крымских татарок, выявлен ряд различий. Главное различие заключается в том, что для крымских татар характерен расширенный тип воспроизводства населения, а для русских и украинцев, прожи-

вающих в Крыму – суженный. Эти различия могут повлиять на этнический состав населения Крыма.

Авторы выражают благодарность проф. Л.А. Атраментовой за предложенную тему исследования и помощь в анализе данных.

Литература

1. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Имашева А.Г. Роль миграционных процессов в формировании брачной структуры московской популяции. Сообщение 1. Возраст, место рождения и национальность вступающих в брак // Генетика. 1984. Т. 20, № 3. С. 501–511.
2. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Гургенова Ф.Р., Булаева К.Б. Изменчивость параметров естественного воспроизводства и индекса Кроу в этнических группах Дагестана // Генетика. 2012. Т. 48, № 10. С. 1221–1227.
3. Penrose L.S. Genetical aspects of human infertility // Proc. Roy. Soc. Ser. B. 1963. V. 159, № 974. P. 93.
4. Государственный комитет статистики Украины. Всеукраїнський перепис населення 2001. Русская версия. Результаты. Национальность и родной язык. 2003. Режим доступа: <http://2001.ukrcensus.gov.ua/rus/results/>
5. Атраментова Л.А., Мецереякова И.П., Филипова О.В. Репродуктивные характеристики и индекс Кроу в различных группах населения Евпатории // Генетика. 2013. Т. 49, № 12. С. 1398–1406.
6. Кучер А.Н., Курбатова О.Л. Популяционно-генетическое исследование дифференциальной плодовитости в городском населении // Генетика. 1986. Т. 22, № 2. С. 304–311.
7. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
8. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Ю.П. Алтухова. М.: Наука, 2004. 619 с.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОРТРЕТ ТОБОЛО-ИРТЫШСКИХ СИБИРСКИХ ТАТАР ПО ГАПЛОГРУППАМ Y-ХРОМОСОМЫ

А.Д. Падюкова^{1,2}, М.Б. Лавряшина¹, М.А. Кузнецова^{3,4}, М.К. Жабагин^{4,5}, А.Т. Агджоян⁴, Р.А. Схаляхо^{3,4}, З.А. Тычинских⁶, Е.В. Балановская³

¹ Кемеровский государственный университет, г. Кемерово

² Кемеровская государственная медицинская академия, г. Кемерово

³ Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва

⁴ Институт общей генетики Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

⁵ Центр наук о жизни, Назарбаев университет, г. Астана, Казахстан

⁶ Тобольская государственная социально-педагогическая академия им. Д.И. Менделеева, г. Тобольск

Сибирские татары – коренное население Западной Сибири. Этногенез сибирских татар, как и этногенез большинства коренных народов Сибири, – это растянувшийся во времени процесс смешения населения, говорившего на угорских, самодийских, тюркских и монгольских языках. Основное ядро составили тюркские племена, пришедшие в Западную Сибирь с востока – из Минусинской котловины и с юга – из Средней Азии и Алтая. В XI–XII вв. существенное влияние на формирование сибирско-татарского этноса оказали кыпчаки, а позднее – в XVI–XIX вв. – бухарцы, телеуты, казанские татары, башкиры и казахи [8].

Современный этнический ареал сибирских татар охватывает Кемеровскую, Новосибирскую, Омскую, Томскую и Тюменскую области Российской Федерации. В составе сибирских татар выделяют барабинскую, тоболо-иртышскую и томскую группу. Самой крупной в численном отношении и разнообразной по составу входящих в нее подгрупп является группа тоболо-иртышских сибирских татар. Она объединяет в своем составе тюменско-туринских, тобольских, ясколбинских (заболотных), курдакско-саргатских и тарских татар. Внутри тюменско-туринских, в свою очередь, выделяют собственно тюменских, туринских

и ялуторовских татар. Внутри тобольских – аремзянско-надцинскую (северную), искеро-тобольскую (центрально-тобольскую), бабасанскую и иштякско-токузскую (вагайско-уватскую) подгруппы. Каждая из этих групп татар обладает особой этнической историей и занимает определенный этнический ареал.

Исследование структуры генофондов сибирских татар, установление генетических взаимоотношений между отдельными этническими и субэтническими группами, а также оценка положения генофондов сибирских татар в генетическом пространстве народов Сибири и Северной Азии представляются чрезвычайно актуальными, так как позволяют не только детализировать современные представления об их популяционно-генетической структуре, но и под новым углом взглянуть на отдельные спорные вопросы этнической истории.

Сегодня генофонд сибирских татар исследован крайне фрагментарно: популяции тоболо-иртышских сибирских татар проанализированы на основе классических генетических маркеров [4, 10] и митохондриальной ДНК [3]; генофонд томских сибирских татар изучен по данным аутомомных ДНК-маркеров – ALU-полиморфизма в генах *ACE*, *ApoA1*, *F13B*, *PV92* и *PLAT* [5] и полиморфизма генов *ADH1B* и *ALDH2* [1]. Что касается гаплогрупп Y-хромосомы, то исследование этого класса маркеров ранее было осуществлено только в популяциях томских сибирских татар [5, 9]. В настоящей статье приводятся результаты изучения генофонда пяти групп тоболо-иртышских сибирских татар Тюменской области по гаплогруппам Y-хромосомы.

Материал и методы

Материал для исследования собран в ходе комплексных экспедиций лаборатории популяционной генетики человека Медико-генетического научного центра (МГНЦ) РАМН (г. Москва) и кафедры генетики Кемеровского государственного университета (г. Кемерово) в Вагайский, Тобольский, Тюменский и Ялуторовский районы Тюменской области. К обследованию приглашались мужчины, не состоящие в кровном родстве, все предки которых относились к данной этнической группе на протяжении как минимум трех поколений.

Сбор биологического материала (венозная кровь) осуществлялся с письменного информированного согласия обследуемого, под контролем этической комиссии МГНЦ РАМН. Обследованым были охвачены тоболо-иртышские татары тюменско-туринской (тюменские и ялуторовские), тобольской (иштякско-токузские и искеро-тобольские) и ялуторовской групп. Суммарный объем выборки составил 392 человека.

Для выявления специфических маркеров в популяциях разных этнических и субэтнических групп татар каждый образец был проанализирован по панели 17 микросателлитных (STR) маркеров Y-хромосомы: *DYS389I*, *DYS389II*, *DYS390*, *DYS456*, *DYS19*, *DYS385a*, *DYS385b*, *DYS458*, *DYS437*, *DYS438*, *DYS448*, *GATA_H4*, *DYS391*, *DYS392*, *DYS393*, *DYS439*, *DYS635* – с использованием коммерческого набора Y-filer PCR Amplification Kit (Applied Biosystems). Данные маркеры входят в наиболее широко используемую в мире панель (Y-filer) компании Applied Biosystems.

Результаты и обсуждение

Анализ гаплотипического разнообразия Y-хромосомы в популяциях татар Тюменской области выявил

ряд специфических черт, формирующих особый генетический «портрет» каждой обследованной подгруппы сибирских татар. Всего в пяти популяциях тоболо-иртышских сибирских татар был обнаружен обширный спектр из 19 гаплогрупп Y-хромосомы.

Тюменская подгруппа представлена в исследовании татарами-бухарцами Тюменского района Тюменской области. Бухарцы – это этнословенная группа внутри тюменских, искеро-тобольских и тарских тоболо-иртышских татар. В ее формировании приняли участие выходцы из Самарканда, Ургенча, Бухары и других городов Средней Азии, которые называли себя «бухарлык» или «сарты». Основными районами расселения бухарцев в Сибири были окрестности Тобольска, Тюмени и Тары. В настоящее время бухарцы, проживающие в Тюменской области, подверглись значительной ассимиляции местным сибирско-татарским населением [7].

Исследование спектра гаплогрупп Y-хромосомы в популяции татар-бухарцев показало, что основной вклад в формирование их генофонда вносит гаплогруппа G2a-P15 (39%). Примечательно, что эта гаплогруппа является частой у ряда народов Кавказа: составляет 66% генофонда осетин, варьирует от 24% и более у адыго-абхазских народов, а у тюркоязычных карачаевцев и балкарцев встречается с частотой 31–33% [2, 6]. Отметим также, что гаплогруппа G представлена в современном населении Ближнего Востока: в Израиле (9,8%), Турции (9,2%), Египте (9%), Палестине (8,9%), Ливане (6,0%), Иордании (5,5%), Сирии (4,8%) и Саудовской Аравии (4,5%) (Y-base). Высокий процент гаплогруппы G2a в генофонде тюменских татар и ее отсутствие у других подгрупп сибирских татар, а также нехарактерность для данного региона и тюрков в целом, за исключением Кавказа, говорит о возможности ее привнесения отдельными миграциями с юга и последующего дрейфа, однако данное предположение требует дальнейшего исследования. Еще три гаплогруппы, составляющие генофонд тюменской подгруппы, характерны для коренного населения данного региона. Это гаплогруппы R1a-M198 (14%), N1c-LLY22 (9%), N1b-p43 (9%). В Сибири эти гаплогруппы имеют широкое распространение. Так, например, R1a найдена у многих коренных сибирских народов, но более всего она распространена у алтайцев – до 40%. У якутов и восточных бурят встречаемость гаплогруппы N1c1 достигает 80–90%, около 50% у чукчей, у хантов, манси, ненцев – до 40% (www.genofond.ru).

Ялуторовская подгруппа исследована на основе тюменско-туринских сибирских татар Ялуторовского района. С тюменско-туринскими татарами связано наиболее раннее государственное образование сибирских татар – Тюменское ханство. К приходу русских в Сибирь они занимали территорию бассейнов Туры, Тобола (почти до впадения Тавды), Ниццы, Исети, Пышмы и притоков этих рек [8]. В конце XVI–XVII вв. тюменско-туринские татары интенсивно контактировали с башкирами (или группами, позже вошедшими в состав башкир) Пышминской, Исетской, а также Терсяцкой волостей Тюменского округа. Смешение двух тюркских групп завершалось формированием особой подгруппы, получившей территориальное название ялуторовских татар. Ялуторовские татары сегодня проживают в южной части расселения тюменских татар, в районе города Ялуторовска.

Анализ спектра гаплогрупп Y-хромосомы у ясколбинских сибирских татар выявил наличие мажорной гаплогруппы N1b-r43, которая составляет две трети их генофонда (62%). Известно, что с высокой частотой эта гаплогруппа отмечается у многих народов Западной Сибири – нганасан (92%), энцев (78%) и тундровых ненцев (74%). Достаточно широко она распространена у коми (35%), хакасов (34%), удмуртов (30%), тофаларов (25%), эвенков (25%), тувинцев (18%), вепсов (18%) (www.genofond.ru). Следующими по частоте встречаемости оказались гаплогруппы N1c-LLY22 и N-M231, которые составляют по 10% генофонда ясколбинских сибирских татар. Примечательно отсутствие в их генофонде гаплогруппы R1a-M198, которая отмечена во всех остальных исследованных группах тоболо-иртышских татар Тюменской области.

Таким образом, в целом можно сделать заключение о том, что для генофонда тоболо-иртышских сибирских татар наиболее характерными являются гаплогруппы N1c-LLY22 и R1a-M198: они присутствуют в четырех подгруппах из пяти, но в разном процентном соотношении. Вероятно, это может отражать общие этногенетические корни обследованных групп сибирских татар. Отсутствие гаплогруппы R1a-M198 у ясколбинских сибирских татар может быть связано с эффектами дрейфа генов – на его высокую интенсивность указывает очень высокая частота выявленной в их генофонде мажорной гаплогруппы N1b-r43. Отметим также, что отмеченные спектр и частоты гаплогрупп Y-хромосомы сибирских татар демонстрируют сходство их генофонда с генофондами ряда других тюркских народов Сибири, в частности с такими народами Алтае-Саянского региона, как шорцы, алтайцы и хакасы, чей генофонд также характеризуется преобладанием западно-евразийской гаплогруппы R1a1a и северо-евразийских гаплогрупп N1b, N1c1 и Q. Однако соотношение этих гаплогрупп в каждой подгруппе сибирских татар варьирует. В основе такого разнообразия могут лежать особенности их этногенеза: различный вклад разных по происхождению племен и народов. Для получения аргументированных оценок необходимо продолжение изучения маркеров

Y-хромосомы в исследованных популяциях, а также расширение спектра охваченных популяций и субэтнических групп, что позволит в дальнейшем детализировать представления об особенностях генетической структуры и уточнить пути этногенеза сибирских татар, чей генофонд до настоящего времени практически не исследован.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-06-00272_а.

Литература

1. Borinskaya S., Kal'ina N., Marusin A. et al. Distribution of alcohol dehydrogenase ADH1B*48His allele in Eurasia // *Am. J. Hum. Genet.* 2009. V. 84 (1). P. 89–92.
2. Балановский О.П. Изменчивость генофонда в пространстве и времени: синтез данных о геногеографии митохондриальной ДНК и Y-хромосомы: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2012. С. 15.
3. Наумова О.Ю., Рычков С.Ю., Морозова И.Ю. и др. Разнообразие митохондриальной ДНК у тоболо-иртышских сибирских татар // *Материалы междунар. Конф. «Генетика в России и мире»*. М., 2006. С. 13.
4. Руденко И.Н., Долинина Д.О., Падюкова А.Д. Исследование особенностей генетической структуры субпопуляций тоболо-иртышских сибирских татар // *Материалы с XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014»*. М.: Изд-во МГУ, 2014. С. 97.
5. Степанов В.А. Этногеомика населения Северной Евразии. Томск: Печатная мануфактура, 2002. 244 с.
6. Теучеж И.Э. Генофонд абхазо-адыгских народов, грузин и армян по данным о полиморфизме Y-хромосомы: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2013. С. 13–15.
7. Томилов Н.А. Тюркоязычное население Западно-Сибирской равнины в конце XVI – первой четверти XIX в. Томск: Изд-во ТГУ, 1981. 276 с.
8. Томилов Н.А. Тюрские народы Сибири / отв. ред. Д.А. Функ, Н.А. Томилов. Наука, 2006. 678 с.
9. Харьков В.Н. Структура и филогенетика генофонда коренного населения Сибири по маркерам Y-хромосомы: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Томск, 2012.
10. Шнейдер Ю.В., Грошева А.Н., Евсюков А.Н., Жукова О.В. Полиморфизм иммуногенетических и биохимических маркеров генов у сибирских (тоболо-иртышских татар) // *Генетика*. 2011. Т. 47, № 12. С. 1655–1665.
11. URL: www.genofond.ru (дата последнего обращения 01.07.2014)

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА В РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА И РАЗВИТИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Е.А. Саженова¹, И.Н. Лебедев^{1, 2}

¹ НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

Введение

Соматические клетки диплоидного организма обладают двумя родительскими копиями генов. Это дает отцовским и материнским локусам потенциальную возможность быть в равной степени активными в геноме потомка. Геномный импринтинг – феномен, который нарушает такую биаллельную экспрессию. Его появление в эволюции ставит вопрос о том, почему у диплоидного организма развивается процесс подавления экспрессии некоторых генов на одном из гомологов и, тем самым происходит возврат к гаплоидизации этих аллелей.

Геномный импринтинг описан у некоторых насекомых и высших растений, а также у сумчатых и плацентарных млекопитающих. В генетическом смысле термин «импринтинг» (от англ. Imprint – отпечаток) впервые был применен в 1960 г. Хелен Кроуз для описания селективной элиминации отцовских хромосом у насекомых, а именно у *Sciara* [1]. У листовых комариков и галлиц отцовский набор хромосом полностью разрушается или во время сперматогенеза, или при дроблении [2, 3].

У некоторых высших растений, таких как кукуруза (*Zea mays*) и резуховидка Таля (*Arabidopsis thaliana*) геномный импринтинг обнаружен только в

эндосперме [4]. У *A. thaliana* выявлено четыре импринтированных гена: *PHERES1* – основной ген, участвующий в размножении клеток эндосперма; *FWA* кодирует транскрипционный фактор, который участвует в регуляции экспрессии генов; *FIS2* является фактором транскрипции, координирует развитие зародыша в эндосперме, *MEDEA (MEA)* – ген группы Polycomb, который регулирует экспрессию других генов [5, 6].

У цветковых растений и млекопитающих в развивающемся зародыше формируются ткани, которые обеспечивают поступление питательных веществ от матери: у млекопитающих это внезародышевые ткани (в частности, трофобласт), а у цветковых растений – эндосперм. Примечательно, что трофобласт образуется при дроблении самой зиготы, а эндосперм возникает отдельно от нее, при слиянии двух гаплоидных материнских ядер (m) с ядром второго сперматозоида (p) (2m:1p).

У млекопитающих около 80 – импринтированных [7]. Это в основном белок-кодирующие гены, большинство из которых сгруппированы в кластеры под общим внутренним регуляторным контролем центров импринтинга. В каждом кластере эти центры в *cis*-положении иницируют выключение транскрипции импринтированных генов через продукцию нетранслируемой РНК, а последующее метилирование ДНК закрепляет это состояние.

Гипотезы возникновения геномного импринтинга в эволюции

Геномный импринтинг имеет некоторые особенности: функция регуляции роста, ограничение импринтированных генов плацентарными и сумчатыми млекопитающими и, наконец, необходимость отцовского генома для развития плода. Эти функции могут соответствовать нескольким гипотезам. Одна из них предполагает, что импринтинг развился в качестве защиты от партеногенеза и связанных с ним нарушений развития, чтобы избежать высокой частоты гомозиготизации вредных рецессивных мутаций [8]. Кроме того, согласно гипотезе «замедленной бомбы» геномный импринтинг, возможно, появился, чтобы сохранить ооциты от летальной тератомы яичников, формирующейся при партеногенезе [9]. Еще одна гипотеза – «трофобластная защита» – предполагает, что материнский геном находится в условиях повышенного риска вследствие того, что мать анатомически приспособлена к внутриутробному воспроизведению, и этот риск возникает, если спонтанная активация ооцита приводит к полному эмбриональному развитию. Таким образом, предполагается, что импринтинг либо подавляет экспрессию генов на материнской хромосоме, стимулирующих развитие плаценты, либо активирует гены, лимитирующие этот процесс. Те гены, которые необходимы для формирования плаценты, экспрессировались бы, следовательно, только с отцовского генома, после того как произошло оплодотворение [10].

Несколько других гипотез были предложены для объяснения адаптивного преимущества импринтинга в эволюции плацентарных млекопитающих. Одна из них, «оборонительная», объясняет роль геномного импринтинга с точки зрения защиты генома хозяина от проникновения в него чужеродных генетических элементов. Согласно этой гипотезе им-

принтинг, и в частности метилирование ДНК, – это защитный механизм, обеспечивающий инактивацию паразитических последовательностей ДНК, таких как транспозоны и провирусная ДНК [11]. И, действительно, ген *Peg10*, необходимый для развития плаценты, путем горизонтального переноса был позаимствован сумчатыми млекопитающими у ретротранспозона Sushi-ichi, относящегося к семейству Ty3/gypsy LTR, а делеция этого гена приводит к ранней эмбриолетальности у мыши [12]. Еще один импринтированный ген *Peg11* (также известный как *Rtl1*) – «одомашненный» ретротранспозон семейства Ty3/gypsy LTR. Его гипометилирование приводит к мышечной гипертрофии плода [13].

Однако самой популярной является гипотеза, которая предполагает, что геномный импринтинг развился в ответ на ситуацию «конфликта полов или коадаптацию» – отцовского и материнского геномов в регуляции роста плода [14]. Увеличение плаценты и массы плода может обеспечить преимущественное размножение потомков по линии отца, но при этом истощит ресурсы матери. Однако если рост плаценты и плода находится под контролем со стороны матери, то она сможет обеспечить воспроизводство большего числа потомков по своей линии. Эта ситуация возникает в силу противоположных «интересов» материнского и отцовского геномов. Отсюда можно предполагать, что мать будет импринтировать или выключать гены, способствующие росту плаценты и плода, тогда как отец будет подавлять экспрессию генов, препятствующую этому росту. Поэтому отцовские экспрессируемые аллели стимулируют рост эмбриона, максимизируя конкурентоспособность индивидуального потомка, имеющего конкретный отцовский геном. Материнские экспрессируемые импринтированные гены, наоборот, подавляют рост плода, чтобы распределить материнские ресурсы между как можно большим числом потомков, которые могут иметь разные отцовские геномы. Эта гипотеза успешно объясняет экспрессию генов – стимуляторов роста (например, *IGF2*, *INS*, *PEG1/MEG1* и *KCNQ1OT1*) только на отцовских гомологах и экспрессию только на материнских гомологах ингибиторов роста (например, *IGF2R*, *H19*, *GNAS*, *CDKN1C (P57^{KIP2})*, *KCNQ1 (KVLQT1)* и *GRB10/MEG1*) [2].

Гипотезой «конфликта полов» хорошо объясняется особенность экспрессии импринтированных генов *Igf2* и *Igf2r* у мыши. *Igf2* стимулирует рост эмбриона и экспрессируется только с отцовского аллеля. Он увеличивает поступление питательных веществ от матери эмбриону. Крупные эмбрионы имеют больше шансов на выживание (что удовлетворяет интересы отца), однако для матери крупный эмбрион может оказаться слишком дорог. Поэтому для матери выгодно ограничить поступление питательных веществ конкретному эмбриону, оставив часть своих ресурсов для других эмбрионов, от других отцов. Это объясняет отсутствие экспрессии *Igf2* с материнского аллеля. *Igf2r* подавляет рост эмбриона и экспрессируется только с материнского аллеля. Связывание *Igf2r* с *Igf2* приводит к деградации обоих белков, поэтому *Igf2r* является антагонистом *Igf2*. Таким образом, импринтированные гены *Igf2* и *Igf2r* являются орудиями в войне отцов и матерей за ресурсы, которые мать может предоставить эмбриону.

Геномный импринтинг у млекопитающих

Геномный импринтинг характерен для двух инфраклассов млекопитающих – *Metatherians* (сумчатые, такие как опоссум и валлаби, которые имеют элементарную плаценту) и *Eutherians* (истинные плацентарные млекопитающие) [15]. У *Monotremata* (яйцекладущие млекопитающие, такие как утконос и ехидна) импринтированных генов не обнаружено [16].

Ранние млекопитающие произошли от рептилий около 310 млн лет назад. Яйцекладущие млекопитающие разошлись с плацентарными около 166 млн лет, а разделение на плацентарных млекопитающих и сумчатых произошло 125–148 млн лет назад. Таким образом, геномный импринтинг у млекопитающих возник в эволюции примерно 150 млн лет назад. В отношении репродуктивной стратегии плацентарные и сумчатые млекопитающие отличаются от всех остальных, во-первых, возможностью зародыша непосредственно влиять на объем материнских ресурсов, используемых для его собственного роста. Большинство беспозвоночных и позвоночных используют репродуктивную стратегию, связанную с откладкой яиц. В этом случае эмбрионы не способны прямо

влиять на материнские ресурсы. Во-вторых, наличие экспрессии импринтированных генов у плацентарных и сумчатых млекопитающих делает их полностью зависимыми от полового воспроизведения, запрещая возможность партеногенеза, когда женская гамета развивается в новую диплоидную особь без оплодотворения мужской гаметой, т.е. без отцовского генома нельзя обойтись.

В эволюции первыми импринтированными генами у млекопитающих были *Ins*, *Mest*, *Peg10*, *Igf2* и *H19* [7]. Они обнаружены у валлаби – представителя инфракласса сумчатых млекопитающих. Все они являются консервативными и сохранили свою моноаллельную экспрессию на протяжении всей эволюции, в том числе и у человека. В то же время некоторые импринтированные гены изменили свой эпигенетический статус. Так, шесть генов, импринтированных у мыши, у человека имеют биаллельную экспрессию, а два гена, наоборот, импринтированы только у человека. Функции этих генов разнообразны (табл. 1). Ген *Asb4* (6 A1) импринтирован и экспрессируется исключительно с материнской хромосомы только у мыши, в то время как у коровы, свиньи и человека он активен на обоих родительских гомологах.

Таблица 1

Импринтированные гены с изменяющимся эпигенетическим статусом у человека и мыши

| Локализация человек (мышь) | Ген человек (мышь) | Эпигенетический статус | | Функция* |
|----------------------------|---------------------------------|------------------------|-------------|---|
| | | Человек | Мышь | |
| 2p15 (11 A3) | <i>COMMD1</i> (<i>Commd1</i>) | Не импринт. | Импринт. | Участие в гомеостазе ионов меди |
| 7q21.3 (6 A1) | <i>PON3</i> (<i>Pon3</i>) | Не импринт. | Импринт. | Гидролиз лактонов и ингибирование окисления липопротеинов низкой плотности, замедляя возникновение и прогрессирование атеросклероза |
| | <i>PON2</i> (<i>Pon2</i>) | Не импринт. | Импринт. | Защита клеток от окислительного стресса |
| | <i>ASB4</i> (<i>Asb4</i>) | Не импринт. | Импринт. | Участие в убиквитиноопосредованном распаде белка в протеосомах |
| 11p15 (7 F5) | <i>ASCL2</i> (<i>Ascl2</i>) | Не импринт. | Импринт. | Активация транскрипции, участие в определении нейрональных предшественников в периферической и центральной нервной системе |
| 11p15.4 (7 E3) | <i>AMPD3</i> (<i>Ampd3</i>) | Не импринт. | Импринт. | Катализгидролитическое дезаминирование аденозинмонофосфата в инозинмонофосфат в аденилаткатаболическом пути |
| 11q13.4 (7 F5) | <i>DHCR7</i> (<i>Dhcr7</i>) | Не импринт. | Импринт. | Участие в синтезе холестерина |
| 12q21 (10 C3) | <i>DCN</i> (<i>Dcn</i>) | Не импринт. | Импринт. | Компонент соединительной ткани, связывается с фибриллами коллагена и играет роль в сборке матрикса |
| 18q11 (18A2-B2) | <i>IMPACT</i> (<i>Impact</i>) | Не импринт. | Импринт. | Участие в нейрогенезе |
| Xq13 (X D) | <i>XIST</i> (<i>Xist</i>) | Не импринт. | Импринт. | Ген, кодирует РНК, является главным эффектором инактивации X-хромосомы |
| | <i>TSIX</i> (<i>Tsix</i>) | Не импринт. | Импринт. | Ген, кодирующий РНК, которая является антисмысловой к <i>Xist</i> РНК |
| 13q14 (14 D2) | <i>RB1</i> ** (<i>Rb1</i>) | Импринт. | Не импринт | Опухолевый супрессор, участие в регуляции транскрипции |
| 20q13 (2 H3) | <i>L3MBTL</i> (<i>L3mbtl</i>) | Импринт. | Не импринт. | Белок – регулятор группы Polycomb, участвует в ремоделировании хроматина, тем самым подавляя экспрессию генов |

Примечание. Импринт. – импринтированный ген; не импринт. – не импринтированный ген.

* Информация согласно базе данных GeneCards [17].

** Импринтирован только CpG-островок второго интрона, который является промотором альтернативного сплайсинга.

Неимпринтированный у человека и свиньи ген *ASCL2* (11p15) экспрессируется только с материнского гомолога у мыши. *IMPACT* не импринтирован у человека, в то время как у мыши, крысы и кролика он активен только на отцовском гомологе. Такой меняющийся характер экспрессии импринтированных генов у разных видов плацентарных млекопитающих может свидетельствовать о том, что геномный импринтинг в эволюции не является полностью устоявшимся и находится в процессе развития.

Примерно 50% импринтированных генов кодируют факторы, вовлеченные в эмбриональное и неонатальное развитие, 20% – в нейробиологические процессы, остальные же не имеют какой-либо очевидной биологической функции [18]. Таким образом, геномный импринтинг в эволюции закрепился в двух направлениях: 1) регуляция эмбрионального и неонатального роста; 2) развитие головного мозга.

Роль геномного импринтинга в регуляции эмбрионального роста

В качестве доказательства специфической роли геномного импринтинга в репродукции млекопитающих можно привести эксперименты по трансплантации пронуклеусов у мышей [19]. Результатом этих исследований стал вывод о том, что как гиногенетические (диплоидный геном, содержащий только хромосомы матери), так и андрогенетические (диплоидный геном, содержащий только хромосомы отца) особи не способны к нормальному эмбриональному развитию: в первом случае происходит формирование только эмбриона, который останавливается в своем развитии на стадии 4–5 сомитов, во втором – развиваются исключительно внезародышевые структуры, что приводит к полному пузырному заносу (ППЗ) – разрастанию трофобласта при отсутствии эмбриона. И только эмбрионы, имеющие один отцовский и один материнский пронуклеусы, нормально развиваются и дают жизнеспособное и фертильное потомство. На основании этих экспериментов была выдвинута гипотеза, что материнский геном экспрессирует импринтированные гены, жизненно важные для развития эмбриона, в то время как отцовский – локусы, необходимые для развития внезародышевых структур – питания эмбриона.

Большинство импринтированных генов вовлечено в обеспечение эмбрионального развития сумчатых и плацентарных млекопитающих, в том числе и человека, через контроль клеточной пролиферации и дифференцировки плацентарных тканей, регуляцию метаболизма некоторых гормонов и ростовых факторов [16].

Молекулярные механизмы нарушений импринтинга в первую очередь связаны с аномалиями дифференциального метилирования импринтированных генов (эпимутациями) – гиперметилированием активного аллеля, приводящего к отсутствию экспрессии гена на обоих гомологах и гипометилированием неактивного локуса, формирующего экспрессию двойной дозы гена.

Учитывая важность геномного импринтинга в эмбриогенезе, эпимутации в импринтированных генах, ответственных за развитие эмбриона, должны приводить к остановке его развития. И действительно, гипометилирование материнских аллелей формирует

мирует у человека биродительский полный пузырный занос (БППЗ, MIM 231090). В результате такое эпигенетическое состояние соответствует клинической картине ППЗ, но при наличии нормального биродительского кариотипа зиготы. Функционально такой эпигенетический статус материнского генома эквивалентен наследованию обоих хромосомных наборов от отца как при классическом ППЗ [20].

Также при остановке эмбрионального развития были показаны эпимутации и на уровне отдельных импринтированных генов. Так, нами при исследовании статуса метилирования импринтированных локусов во внезародышевых тканях (цитотрофобласт хориона и внезародышевая мезодерма) при остановке эмбрионального развития было показано наличие эпимутаций одновременно в двух импринтированных аллелях – в центре импринтинга *KCNQ1OT1* и гене *PLAGL1* у 2,3% спонтанных абортусов (CA) [21, 22].

Позднее свидетельства нарушений функционального статуса импринтированных локусов генома у CA были получены и в других исследованиях как при анализе экспрессии, так и при изучении характера метилирования импринтированных генов. Так, Диплас и соавт. [23] при внутриутробной задержке роста плода обнаружили повышенную экспрессию импринтированных генов *PHLDA2*, *ILK2*, *NNAT*, *CCDC86* и *PEG10*, а *PLAGL1*, *DHCR24*, *ZNF331*, *CDKAL1* имели, напротив, сниженную экспрессию. Авторами также показано гипометилирование генов *DLK1*, *H19* и *SNRPN*.

В другом исследовании у CA было обнаружено повышение экспрессии *PHLDA2* и снижение экспрессии *PEG10* по сравнению с контролем в тканях плода в третьем триместре беременности [24]. Еще в одной работе при анализе плодных тканей было обнаружено множественное гиперметилирование импринтированных генов у 4% (2 из 55) спонтанных абортусов и в 18% (10 из 57) случаев мертворождений [25]. Авторы анализировали гены *H19*, *LIT1*, *PEG3* и *SNRPN*, экспрессирующиеся с отцовского гомолога, и два гена – *MEG3* и *NESP55*, экспрессирующиеся в норме с материнской хромосомы. Еще в одной работе авторами в выборке CA было обнаружено гиперметилирование в генах *INS*, *TRPM5*, *PWCR1*, *GABRA5* с отцовской экспрессией и только в одном гене – *H19*, экспрессирующемся с материнского гомолога [26].

Следует подчеркнуть, что все отмеченные исследования были связаны с изучением статуса метилирования ограниченного числа импринтированных генов, выбранных для анализа в соответствии с теми или иными критериями, главным образом с вовлеченностью их в регуляцию эмбрионального развития. Принципиально новая возможность в анализе эпимутаций появилась с применением микрочиповых технологий, позволяющих оценить статус метилирования одновременно большого числа импринтированных генов. Так, нами был проведен анализ 115 CpG-динуклеотидов в промоторных регионах 52 импринтированных генов в плацентарных тканях CA первого триместра беременности с использованием микрочипа GoldenGate Methylation Cancer Panel I (Illumina, США) [27]. Было показано наличие множественных эпимутаций, затрагивающих от 4 до 12 импринтированных генов у каждого из обследованных зародышей. Эпимутации были представлены гипометилированием таких имприн-

тированных генов, как *GRB10*, *CPA4*, *PHLDA2*, *ZNF215*, экспрессирующихся в норме с материнского гомолога, и *PEG10*, *PLAGL1*, *WT1*, *HTR2A*, *DLK1*, *GABRB3*, *KCNQ1*, функционирующих только на отцовской хромосоме.

Приведенные данные являются прямым доказательством участия импринтированных генов в регуляции эмбрионального развития и возможного селективного эффекта нарушений их эпигенетического статуса.

Роль геномного импринтинга в неонатальном росте и развитии мозга

Геномный импринтинг в эволюции шел не только по пути участия в регуляции развития плаценты, но и развития головного мозга под влиянием плаценты и давления отбора, регулирующего материнство [28]. Формирующийся мозг является одним из ключевых объектов для импринтированных генов. Это было впервые показано в исследованиях с андрогенетическими (АГ) и партеногенетическими (ПГ) дисомными химерными клетками мыши в мозге. Первые из них накапливались в базальных отделах переднего мозга (медиальная преоптическая область, перегородка и гипоталамус), в то время как в кортикостриатальной области переднего мозга преимущественно обнаруживались АГ клетки [29]. Итогом развития явилось обратное воздействие на размеры тела: ПГ химерные эмбрионы имели большой мозг, а АГ эмбрионы – маленький мозг, но большую массу тела.

Внимание к эволюционному ремоделированию мозга в связи с геномным импринтингом усилилось после открытия импринтированных генов, связанных с апоптозом [28]. Также интерес представляет факт, что те же самые гены импринтированы как в развивающемся гипоталамусе, так и в плаценте – двух отличающихся структур с различными функциями. Хотя эти структуры различны, они не полностью независимы, как считалось ранее. Детальные исследования у мыши, несущей мутацию в импринтированном гене *Peg3*, предоставили некоторые ответы относительно того, как функционирует гипоталамус, который развивается в утробе матери, а во время беременности вырабатывает плацентарные гормоны, которые определяют материнство [30]. При делеции этого гена в гипоталамусе матери, но не в плаценте или плоде или только в плаценте, многие аспекты фенотипа имели функционально схожие последствия – у матери происходит нарушение заботы о потомстве. Таким образом, по-видимому, действие этого гена совместно адаптировано в гипоталамусе матери и плаценте. Также известно еще о трех импринтированных генах (*Necdin*, *Peg1/Mest* и *Magel2*) со схожей с *Peg3* нейроэндокринной функцией, связанной с успешным материнством [31]. Отсутствие экспрессии одного из этих генов у мыши приводит к снижению уровня окситоцина в нейронах [32], также как при гиперметилировании *Peg3*, так как эти гены в норме производят гормоны, важные для родов и заботы о потомстве [33]. Кроме того, продукты генов *Peg3* и *Necdin* взаимодействуют с *Hif1a* и *Arnt*, последний производит HLN-PAS белок, который связывается с *SIM1*, тем самым участвуя в развитии окситоцинергических нейронов гипоталамуса [34]. *Hif1a* и *Arnt* также играют важную роль в

развитии плаценты, участвуя в дифференцировке гигантских клеток, которые производят плацентарные гормоны, регулирующие материнство. Важно отметить, что гипоталамус плода и плацента развиваются во время, которое является критическим периодом для плацентарного кровоснабжения, тем самым обеспечивая питание плода и выработку плацентарных гормонов, которые регулируют гипоталамус матери. Таким образом, плацента участвует в развитии гипоталамуса плода, а гипоталамус матери предоставляет ресурсы для этого. В этом контексте интересно, что плацентарные стволовые клетки могут дифференцироваться в нейроны [35]. Такая связь коадаптации плаценты и материнского мозга гарантирует, что потомство, которое имело «хорошее» материнское воспитание, будет также хорошо обеспечено и генетически предрасположено к формированию гипоталамуса, который определяет хорошее материнство и в следующем поколении [36].

Мозг млекопитающих претерпел значительный эволюционный рост по сравнению с другими позвоночными, и это продолжается в течение эволюции, достигая пика у больших обезьян и гоминид. Неокортекс (новая кора) – это наиболее развивающаяся в эволюции кора головного мозга, которая у низших млекопитающих только намечена, а у человека составляет основную часть коры. Новая кора располагается в верхнем слое полушарий мозга и отвечает за высшие нервные функции – сенсорное восприятие, выполнение моторных команд, осознанное мышление и, у людей, речь. Неокортекс в первую очередь развивается после рождения, когда все млекопитающие находятся в тесной связи с их матерью и с их социальными группами. Он содержит два основных типа клеток: пирамидальные нейроны (примерно 80%) и гамма-аминомасляная кислота-эргические (ГАМК-эргические) интернейроны коры мозга (приблизительно 20%).

ГАМК-рецепторы – группа клеточных рецепторов гамма-аминомасляной кислоты, основного тормозного медиатора в нервной системе позвоночных. При выбросе ГАМК в синаптическую щель происходит активация ионных каналов, приводящая к ингибированию нервного импульса. Нарушения ГАМК-эргических интернейронов может быть причиной эпилепсии, шизофрении, аутизма, синдрома Ретта, биполярного расстройства, а также нарушения обучения и памяти [34].

Неокортикальные ГАМК-эргические нейроны являются неотъемлемой частью развития неокортикальной citoархитектуры. На ранних стадиях эмбрионального развития они деполаризуют основные нейроны, тем самым увеличивая внутриклеточный кальций, который имеет важное значение для роста нейронов и их дифференцировки [37]. Они также продуцируют рилин – гликопротеин, который регулирует миграцию и позиционирование нервных стволовых клеток в период фетального и раннего послеродового развития, необходимый для нормального формирования коры и других структур головного мозга. Во взрослом мозге рилин регулирует позиционирование нейронов, образуемых в процессе взрослого нейрогенеза, а также вносит вклад в работу механизмов памяти и обучения, модулируя синаптическую пластичность, усиливая и поддерживая долговременную потенциацию, стимулируя развитие дендритов.

MeCP2 (Xq28) – ядерный белок, необходимый для нормальной функции нервных клеток. Он экспрессируется на высоком уровне в ГАМК-эргических нейронах и является важным медиатором сигнала метилирования, связываясь с метил-CpG-доменами и гистоновыми белками, тем самым влияя на экспрессию генов. Мутации в *MECP2* человека ответственны за синдром Ретта, а именно за дисфункцию памяти и нарушение обучения [38].

Импринтированный и экспрессирующийся только на отцовском гомологе ген *Necdin* является супрессором роста постмитотических нейронов. Гипометилирование этого гена у мышей приводит к уменьшению популяции клеток неокортекса (ГАМК-эргических нейронов) и восприимчивости к судорогам.

Ген *UBE3A* импринтирован у мыши и человека и экспрессируется исключительно с материнского аллеля в мозжечковых клетках Пуркинье и нейронах гиппокампа. Гиперметилирование этого гена, приводящее к отсутствию экспрессии, является причиной синдрома Энгельмана и специфических для этого синдрома признаков – задержке психического развития, эпилепсии, атаксии, частым приступам смеха, стереотипным движениям рук, отсутствию речи и аутизму, сопровождаемая глубокой умственной недостаточностью [39]. Продукт этого гена участвует в деградации белков в клетках, тем самым удаляя поврежденные или ненужные белки и помогая поддерживать нормальные функции клеток.

Таким образом, геномный импринтинг в ходе эволюции закрепился у сумчатых и плацентарных млекопитающих. Его собственная эволюция шла в направлении регуляции эмбрионального и неонатального роста, а также развития головного мозга. С первым направлением связано развитие плаценты, а значит, живорождения, которое является потенциально рискованной стратегией, и любые проблемы в развитии представляют угрозу не только для будущего поколения, но и для самой матери. Для этого эволюция выработала жесткий контроль над регуляцией генов через моноаллельную экспрессию, т.е. через геномный импринтинг. Второе направление неотъемлемо связано с развитием неокортекса в коре головного мозга, который ответственен за высшие нервные функции – сенсорное восприятие, выполнение моторных команд, осознанное мышление, а у людей и за речь. Наличие гипоталамо/плацентарной совместной коадаптации и важности импринтированных генов, которые совместно выражены в этих структурах, обеспечивает успешное прохождение беременности, а значит эмбриональное развитие и заботу о потомстве и интеллектуальное развитие ребенка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (государственный контракт № 14-15-00772).

Литература

1. Crouse H.V. The controlling element in sex chromosome behavior in *Sciara* // *Genetics*. 1960. V. 45, № 10. P. 1429–1443.
2. Haig D. Mother's boy or daddy's girl? Sex determination in Hymenoptera // *Trends. Ecol. Evol.* 1998. V. 13, №10. P. 380–381.
3. Murphy S.K., Jirtle R.L. Imprinted genes as potential genetic and epigenetic toxicologic targets // *Environ. Health Perspect.* 2000. V. 108, № 1. P. 5–11.
4. Gehring M. Genomic imprinting: insights from plants // *Annual. Rev. Genet.* 2013. V. 47. P. 187–208.
5. Makarevich G., Villar C., Erilova A., Kehler C. Mechanism of *PHERES1* imprinting in *Arabidopsis* // *Journal of Cell Science*. 2008. V. 121. P. 906–912.
6. Fujimoto R., Kinoshita Y., Kawabe A. et al. Evolution and control of imprinted FWA genes in the genus *Arabidopsis* // *PLoS. Genet.* 2008. V. 4. № 4. P. e1000048.
7. <http://igc.otago.ac.nz>
8. Kono T. Genomic imprinting is a barrier to parthenogenesis in mammals // *Cytogenet Genome Res.* 2006. V. 113. P. 31–35.
9. Weisstein A.E., Feldman M.W., Spencer H.G. Evolutionary genetic models of the ovarian time bomb hypothesis for the evolution of genomic imprinting // *Genetics*. 2002. V. 162. P. 425–439.
10. Vamuza S.I., Mann M. Genomic imprinting-defusing the ovarian time bomb // *Trends. Genet.* 1994. V. 10, № 4. P. 118–123.
11. Barlow D.P. Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation // *Science*. 1993. V. 260. P. 309–310.
12. Ono R.I., Nakamura K., Inoue K. et al. Deletion of *Peg10*, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality // *Nat. Genet.* 2006. V. 38, № 1. P. 101–106.
13. Byrne K.I., Colgrave M.L., Vuocolo T. et al. The imprinted retrotransposon-like gene *PEG11 (RTL1)* is expressed as a full-length protein in skeletal muscle from Callipyge sheep // *PLoS. One*. 2010. V. 8, № 5. P. e0008638.
14. Haig D., Graham C. Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor // *Cell*. 1991. V.64. P.1045–1046.
15. Das R.I., Hampton D.D., Jirtle R.L. Imprinting evolution and human health // *Mamm. Genome*. 2009. V. 20, № 9–10. P. 563–572.
16. Wolf J.B., Brandvain Y. Gene interactions in the evolution of genomic imprinting // *Heredity (Edinb)*. 2014. V. 12, № 10. P. 1038.
17. *GeneCards*. <http://www.genecards.org>
18. Renfree M.B., Hore T.A., Shaw G. et al. Evolution of genomic imprinting: insights from marsupials and monotremes // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2009. V. 10. P. 241–262.
19. MacGrath J., Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes // *Cell*. 1984. V. 37, № 1. P. 179–183.
20. Devriendt K. Hydatidiform mole and triploidy: the role of genomic imprinting in placental development // *Hum. Reprod. Update*. 2005. V. 11. № 2. P. 137–142.
21. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Эпимутации центра импринтинга *KCNQ1OT1* хромосомы 11 при ранней эмбриональной гибели у человека // *Генетика*. 2008. Т. 44, № 12. С. 1609–1616 (Sazhenova E.A., Lebedev I.N. Epimutations of the *KCNQ1OT1* imprinting center of chromosome 11 in early human embryolethality // *Rus. J. Genet.* 2008. V. 44. № 12. P. 1394–1399).
22. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Эпимутации импринтированного гена *PLAGL1* при привычном невынашивании беременности // *Мед. генетика*. 2010. Т. 9, № 11. С. 34–39.
23. Diplas A.I., Lambertini L., Lee M.J. et al. Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas // *Epigenetics*. 2009. V. 4. № 4. P. 235–240.
24. Dória S., Sousa M., Fernandes S. et al. Gene expression pattern of IGF2, PHLDA2, PEG10 and CDKN1C imprinted genes in spontaneous miscarriages or fetal deaths // *Epigenetics*. 2010. V. 5, № 5. P. 444–450.
25. Pliushch G., Schneider E., Weise D. et al. Extreme methylation values of imprinted genes in human abortions and stillbirths // *Am. J. Pathol.* 2010. V. 176, № 3. P. 1084–1090.
26. Zechner U., Pliushch G., Schneider E. et al. Quantitative methylation analysis of developmentally important genes in human pregnancy losses after ART and spontaneous conception // *Mol. Hum. Reprod.* 2010. V. 16, № 9. P. 704–713.
27. Саженова Е.А., Скрябин Н.А., Суханова Н.Н., Лебедев И.Н. Мультилокусные эпимутации импринтома при

- патологии эмбрионального развития человека // Молекулярная биология. 2012. Т. 46, № 2. С. 204–213.
28. *Keverne EB*: Monoallelic gene expression and mammalian evolution // *BioEssays*. 2009. V.31. P. 1318–1326.
 29. *Allen N.D., Logan K., Drage D.J. et al.* Distribution of parthenogenetic cells in the mouse brain and their influence on brain development and behavior // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 10782–10786.
 30. *Keverne and Curley*, 2008.
 31. *Chiavegatto S., Sauce B., Ambar G. et al.* Hypothalamic expression of *Peg3* gene is associated with maternal care differences between SM/J and LG/J mouse strains // *Brain Behav.* 2012. V. 2, № 4. P. 365–376.
 32. *Mercer R.E., Kwolek E.M., Bischof J.M. et al.* Regionally reduced brain volume, altered serotonin neurochemistry, and abnormal behavior in mice null for the circadian rhythm output gene *Magel2* // *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2009. V. 5, № 15. P. 1085–1099.
 33. *Ineson J., Stayner C., Hazlett J., Slobbe L. et al.* Somatic reactivation of expression of the silent maternal *Mest* allele and acquisition of normal reproductive behaviour in a colony of *Peg1/Mest* mutant mice // *J. Reprod.* 2012. V. 58, № 4. P. 490–500.
 34. *Keverne E.B.* Epigenetics and brain evolution // *Epigenomics*. 2011. V. 3, № 2. P. 183–191.
 35. *Portmann-Lanz C.B., Schoeberlein A., Portmann R. et al.* Turning placenta into brain: placental mesenchymal stem cells differentiate into neurons and oligodendrocytes // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2010. V. 202, № 3. P. 294.e1–294.e11.
 36. *Keverne E.B.* Significance of epigenetics for understanding brain development, brain evolution and behavior // *Neuroscience*. 2014. V. 4, № 264. P. 207–217.
 37. *Chen X.Y., Xue Y., Wang H. et al.* Modulation of firing activity by endogenous GABA receptors in the globus pallidus of MPTP-treated parkinsonian mice // *Neurosci. Bull.* 2013. V. 29, № 6. P. 701–707.
 38. *Heckman L.D., Chahrouh M.H., Zoghbi H.Y.* Rett-causing mutations reveal two domains critical for *MeCP2* function and for toxicity in *MECP2* duplication syndrome mice // *Elife*. 2014. V. 26. P.e02676.
 39. *Buiting K.* Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome // *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 2010. V. 15, № 154. P. 365–376.

О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПИСКОВ ТЕЛЕФОННЫХ АБОНЕНТОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СООТНОШЕНИЙ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

И.Н. Сорокина

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород

При проведении популяционно-генетических исследований используются различные типы маркеров: классические генетические, молекулярно-генетические, квазигенетические маркеры. В качестве квазигенетических маркеров выступают фамилии и ряд популяционно-демографических характеристик. Как свидетельствуют результаты работ зарубежных исследователей, одним из эффективных источников информации о фамилиях населения могут являться телефонные справочники [1–3]. Однако возможность использования фамилий телефонных абонентов в популяционно-генетических исследованиях населения России к настоящему времени не изучена. В связи с этим цель работы – провести оценку возможности использования фамилий телефонных абонентов для оценки генетической дифференциации населения Белгородской области. В данной работе в качестве базы информации о фамилиях использовался новый источник – списки телефонных абонентов. Проводился анализ 25 367 фамилий среди 159 842 телефонных абонентов. Оценка генетических расстояний и таксономический анализ проведен на уровне района (элементарная популяция [4]) среди всего населения Белгородской области (20 районов), а также Пристенского района Курской области и Репьевского района Воронежской области.

По частотам фамилий телефонных абонентов был проведен расчет матрицы генетических расстояний. На ее основе с использованием кластерного анализа построена дендрограмма, характеризующая генетические соотношения между 22 исследуемыми элементарными популяциями (районами). Аналогичная процедура была проведена нами ранее на основе частот фамилий избирателей [5]. Матрица генетических расстояний, полученная по фамилиям телефонных абонентов, в значительной степени соответствует аналогичной матрице, рассчитанной на основе частот фамилий избирателей: коэффициент корреляции Спирмена между матрицами составил $\rho = 0,81$

($p < 0,001$). Согласуются между собой и средние генетические расстояния между элементарными популяциями юга Центральной России, оцененные по фамилиям избирателей и телефонных абонентов (коэффициент корреляции Спирмена между средними генетическими расстояниями, полученными по фамилиям телефонных абонентов и избирателей по 20 районам, составил $\rho = 0,78$; $p < 0,001$). В соответствии с данными кластерного анализа построена схема генетического ландшафта всех анализируемых популяций (рис. 1). Эквидистантные линии были проведены через 0,5 единицы генетического расстояния. Пространственное расположение результатов кластерного анализа (рис. 1) показало наличие на территории Белгородской области определенной системы группировки элементарных популяций на четыре кластера. Районные популяции, располагающиеся на севере и юго-востоке Белгородской области, последовательно образуют две самые крупные группы. Параллельно с этим идет объединение других подсистем, располагающихся на западе и востоке области. Следует отметить, что построенные по результатам кластерного анализа 22 районов эквидистантные фигуры не пересекаются и описывают реальное географическое положение изученных районных популяций. При сравнительном анализе «генетического ландшафта», полученного по фамилиям телефонных абонентов (рис. 1) и избирателей (рис. 2) [5], установлено, что «генетический ландшафт» белгородской популяции, выявленный на основе фамилий телефонных абонентов, в значительной степени соответствует аналогичным результатам, полученным по фамилиям избирателей. Некоторые различия между этими двумя схемами заключаются в смещении границы между центральным и юго-восточным кластерами популяций к юго-востоку. По фамилиям телефонных абонентов Шебекинский район входит в юго-восточный кластер (рис. 1), а по фамилиям избирателей – в центральный кластер (рис. 2) [5].



Рис. 1. Схема генетических соотношений районных популяций Белгородской области, Пристенского района Курской области, Репьевского района Воронежской области (построена по частотам фамилий телефонных абонентов)



Рис. 2. Схема генетических взаимоотношений районных популяций Белгородской области (по данным о распределении всех фамилий избирателей)

Построенные по фамилиям телефонных абонентов эквидистантные фигуры описывают реальное географическое положение изученных 22 районных популяций (коэффициент корреляции между матрицей генетических расстояний по фамилиям телефонных абонентов, с одной стороны, и матрицей географических расстояний между районными популяциями – с другой; $r = 0,36$; $p < 0,001$). Эти результаты соответствуют аналогичным данным, полученным с использованием фамилий избирателей (коэффициент корреляции Спирмена между матрицей генетических расстояний, рассчитанных по фамилиям избирателей, и матрицей географических расстояний равняется $r = 0,60$; $p < 0,001$). Другие методы многомерной статистики – факторный анализ и многомерное шкалирование показали результаты, полностью соответствующие данным кластерного анализа, проведенного по спискам абонентов.

Таким образом, в результате проведенного таксономического анализа районных популяций Белгородской области показано, что фамилии телефонных абонентов могут быть эффективно использованы для описания генетических соотноше-

ний между элементарными популяциями юга Центральной России.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РГНФ № 14-16-31010 «Изучение структуры генофонда населения Белгородской области и его места в системе русского генофонда Центральной России (по данным антропоники)».

Литература

1. Branco C.C., Mota-Vieira L. Population structure of Sao Miguel Island, Azores: a surname study // Hum. Biol. 2003. V. 75. № 6. P. 929–939.
2. Barrai I., Rodriguez-Larralde A., Mamolini E. et al. Elements of the surname structure of Austria // Ann. Hum. Biol. 2000. V. 27, № 6. P. 607–622.
3. Barrai I., Rodriguez-Larralde A., Manni F., Scapoli C. Isonymy and isolation by distance in Netherlands // Ann. Hum. Biol. 2002. V. 74, № 2. P. 263–283.
4. Сорокина И.Н., Чурносос М.И., Балановская Е.В. Генофонд населения Белгородской области. Динамика индекса эндогамии в районных популяциях // Генетика. 2008. Т.4, № 8. С. 1117–1125.
5. Сорокина И.Н., Чурносос М.И., Балановская Е.В. Генофонд населения Белгородской области. Описание «генетического» ландшафта 22 районных популяций // Генетика. 2009. Т. 45, № 5. С. 700–710.

СТРУКТУРА ГАПЛОТИПОВ И ВОЗРАСТ МУТАЦИИ В ГЕНЕ *DMPK* У ЯКУТОВС.К. Степанова¹, М.Г. Сваровская^{2,3}, А.В. Марусин², А.Л. Сухомясова¹,
Н.Р. Максимова^{1,4}, В.А. Степанов^{2,5}¹ Якутский научный центр комплексных медицинских проблем СО РАМН, г. Якутск² НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск³ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск⁴ Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск⁵ Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

Известно, что на территории Республики Саха (Якутия) (РС (Я)) с высокой частотой встречаются так называемые якутские болезни, в число которых входит моногенное нейродегенеративное заболевание миотоническая дистрофия (МД) I типа [1–5]. Механизмом возникновения МД является экспансия три-нуклеотидных повторов. Распространенность МД в разных регионах и этнических группах сильно варьирует. В среднем по миру встречаемость исследуемой патологии составляет 4–5 заболевших на 100 тыс. населения [6]. Максимальная частота МД зафиксирована в Квебеке (Канада) – 189 случаев на 100 тыс. населения [7]. В Юго-Восточной Азии заболевание крайне редко, в Южной и Центральной Африке описан единственный случай в нигерийской семье. В популяции якутов частота МД достигает максимального значения в сравнении с другими популяциями России (21,3 на 100 тыс. человек) [8], что определяет актуальность его изучения в данном регионе.

Миотоническая дистрофия (МД, OMIM:160900) – аутосомно-доминантное многосистемное заболевание, характеризующееся широкой вариабельностью манифестации, клиническим полиморфизмом и тяжестью течения. Главные клинические проявления: мышечная слабость, катаракта, аритмии сердца, облысение со лба, нарушенная толерантность к глюкозе, умственная отсталость. Результаты исследований нормального полиморфизма гена миотонической дистрофии в популяциях РС (Я) косвенно свидетельствуют о том, что накопление данного заболевания обуславливается эффектом основателя. В настоящее время в гене *DMPK* описано более 500 SNP [9], исследования которых проводились в популяциях Тайваня [10], Японии [11], Эфиопии [12], Южной Африки [13], Сербии [14], Ирана [15], Китая [16], Таиланда [17], Кореи [18], Западной Европы [19]. Эти данные демонстрируют значительные межпопуляционные отличия в частотах гаплотипов в локусе *DMPK* и накопление отдельных гаплотипов у больных МД. Результаты исследований нормального полиморфизма гена миотонической дистрофии в популяциях РС (Я) косвенно свидетельствуют о том, что накопление данного заболевания обуславливается эффектом основателя. Возможно также, что происхождение МД у якутов связано с европеоидным компонентом генофонда, так как заболевание встречается преимущественно в европеоидных популяциях [20].

Задачами настоящей работы было оценить генетическое разнообразие локуса *DMPK* у якутов, больных МД, и в территориальных выборках якутских популяций на фоне населения Северной Евразии, выявить спектр связанных с МД гаплотипов у якутов в сравнении с мировыми популяциями, а также определить время распространения мутации, в Якутии.

Материал и методы

В работе использованы образцы ДНК 88 больных МД, проживающих в РС (Я). Сведения о больных были получены из Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии медико-генетической консультации ГБУ РС (Я) РБ № 1-НЦМ, а также в процессе экспедиционными выездами, проводимых совместно с сотрудниками ФГБУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем» СО РАМН (г. Якутск). Популяционная выборка здоровых индивидов представлена коренными жителями Якутии, проживающими в трех этногеографических районах РС (Я): центральном (128 человек), вилюйском (100) и северном (100). Северная Евразия представлена бурятами из г. Улан-Удэ (50 человек) и пос. Хуромша (50) (Бурятия), русскими (100) из Томской области, хантами (100) из д. Рускинская Сургутского района (ХМАО), кетами (38) из пос. Келлог (Туруханский район Красноярского края), южными киргизами из г. Оша (50) и северными киргизами из пос. Кегеты (50) (Республика Кыргызстан). Забор биологического материала (венозной крови) производили после медицинского осмотра с обязательным письменным информированным согласием на проведение исследования. Этническая принадлежность индивида учитывалась до третьего поколения.

Анализ однонуклеотидных полиморфизмов проводился методом ПЦР-ПДРФ. Для этого были подобраны шесть SNP-маркеров, равномерно распределенных по гену *DMPK* (табл. 1). Анализ динуклеотидных маркеров производили на генетическом анализаторе ABI PRIZM 3730 (Perkin-Elmer), используя стандарты длины фрагментов GeneScan-500 TAMRA и GeneScan-500 LIZ. Анализ размера фрагментов и генотипирование проводили с помощью программного обеспечения GeneScan Analysis (Perkin-Elmer).

Таблица 1

Характеристика ПЦР-ПДРФ исследованных однонуклеотидных маркеров локуса *DMPK*

| Ref SNP ID (rs) | Полиморфизм | Локализация в гене | Нуклеотидная позиция | Фермент, используемый при ПЦР-ПДРФ |
|-----------------|-------------|--------------------|----------------------|------------------------------------|
| rs2070736 | G/T | TEL от интрона | 46286714 | Dralll |
| rs572634 | G/T | Инtron 4 | 46282503 | AccB11/HphI |
| rs1799894 | C/T | Инtron 5 | 46281745 | AspLEI/HhaI |
| rs527221 | C/G | Экзон 10 | 46275976 | Bse11/BmPI |
| rs915915 | G/T | Инtron 11 | 46274972 | Fnu4HI |
| rs10415988 | D19S463 | 15kbCEN | 46246704 | TaqI |

Микросателлитные (STR) маркеры были подобраны таким образом, чтобы равномерно с обеих сторон фланкировать тринуклеотидные СТГ-повторы в гене *DMPK*. Физическая и генетическая локализация, генетическое расстояние между соседними маркерами были подобраны с помощью генетической базы данных Marshfield (табл. 2). Общая физическая протяженность фланкируемого региона составила около 8 тыс. кб.

Таблица 2

Микросателлитные маркеры, использованные в исследовании

| Название маркера | Хромосомная локализация на физической карте, сМ | Диапазон длин аллелей, п.н. |
|------------------|---|-----------------------------|
| <i>D19S408</i> | 67,37 | 122–146 |
| <i>D19S903</i> | 69,50 | 132–166 |
| <i>DMPK</i> | 70,14 | 72–129 |
| <i>D19S219</i> | 70,14 | 160–190 |
| <i>D19S412</i> | 70,14 | 89–113 |
| <i>D19S606</i> | 72,72 | 172–190 |
| <i>D19S879</i> | 75,41 | 217–265 |

Проверку распределения генотипов по исследованным полиморфным вариантам на соответствие равновесию Харди–Вайнберга проводили с помощью критерия χ^2 . Частоты гаплотипов определялись с помощью EM-алгоритма. Для анализа ассоциации маркеров исследуемых полиморфных вариантов с заболеванием МД сравнивали частоты аллелей и генотипов в группах больных и здоровых индивидов, используя критерий χ^2 . Уровень генетического разнообразия и межпопуляционной дифференциации вычисляли методом анализа молекулярной вариативности (AMOVA). Генетическое расстояние между популяциями рассчитывали по методу Нея [21], филогенетическое древо популяций строили с помощью алгоритма объединения «ближайших соседей» (neighbor joining), реализованного в пакете программ PHYLIP. Для расчета возраста мутации использовался подход «генетических часов» [22], оценивающий количество поколений g с момента появления мутации в популяции до настоящего времени, исходя из изменения неравновесия по сцеплению полиморфных маркеров с локусом заболевания за этот период времени [23]. Для оценки меры неравновесия по сцеплению для полиморфных маркеров в группе больных использовали показатель σ [24]. Различия двух сравниваемых величин считали достоверным при достижении уровня значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Генетическая вариативность и структура изученных популяций по шести SNP в гене *DMPK*

Практически по всем маркерам во всех популяциях распределение генотипов соответствовало равновесию Харди–Вайнберга (отклонение наблюдалось лишь по rs572634 в популяции якутов). Минимальное значение частоты минорного аллеля (15%) по полиморфному локусу rs2070736 было зафиксировано в популяции кетов, а максимальное (38,1%) – в популяции якутов. При сравнении больных МД с популяционной выборкой якутов наблюдали значимые различия в частотах аллелей по локусам rs1799894 и rs10415988. Отношения шансов (odds ratio (OR)) развития МД у представителей якутской популяции по этим локусам оказались довольно высокими и оценивались как 4,99 (95%-й CI

3,36–7,42) и 5,07 (95%-й CI 3,44–7,48) соответственно. При попарном попарном сравнении популяционных выборок по частотам аллелей наиболее значимые отличия выявлены между популяциями якутов и кетов (по всем шести исследованным локусам). Популяции якуты – ханты, буряты – кеты значимо различались в частотах аллелей по четырем локусам. Самое большое значение гетерозиготности наблюдалось в группе больных якутов по rs1799894 (73,3%) и rs10415988 (77,6%). Наибольший уровень генетического разнообразия по совокупности шести исследованных генетических маркеров наблюдался в популяции кетов (0,43), наименьший – в популяции якутов (0,29). В остальных популяциях этот показатель был в диапазоне от 0,33 до 0,39. Низкий уровень генетического разнообразия внутри якутского этноса, неоднократно показанный разными авторами на разных маркерных системах (мтДНК, Y-хромосома, полиморфизм СТГ-повторов в гене *DMPK*) в популяциях Якутии [25–27], характерен для изолированных этнических групп, происходящих от небольшого количества предков, что может свидетельствовать о наличии эффекта основателя.

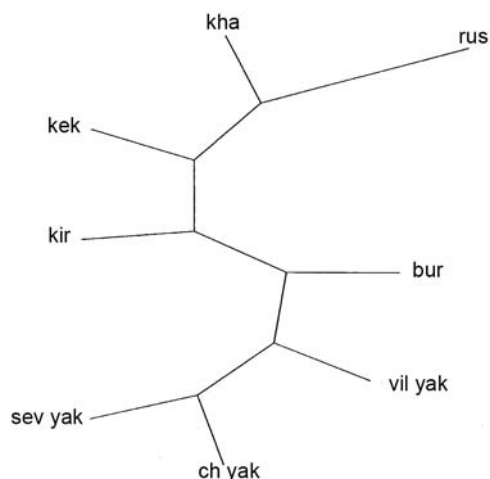
Количественный показатель подразделенности популяций *Fst* определяли среди трех территориальных групп якутов (центральный, северный и виллюйский районы) и шести популяций Северной Евразии (якуты, кеты, русские, киргизы, буряты, ханты). Значение генетической дифференциации популяций по совокупности всех исследуемых SNP-локусов для северо-азиатских выборок составило 9,9%, что на порядок выше, чем для трех якутских популяций (0,97%), что демонстрирует неоднородность населения популяций Северной Евразии по сравнению с популяциями, проживающими на территории Республики Саха.

Анализ генетических взаимоотношений изученных популяций

В работе была проанализирована степень генетической близости между тремя якутскими популяциями, а также между всеми изученными популяциями Северной Евразии по частотам генотипов исследованных шести SNP-вариантов гена *DMPK*. Для построения дендрограммы генетических взаимоотношений использовали массив данных, в который вошли популяции бурят, киргизов, хантов, кетов и русских, а также три якутские популяции, разделенные по районам проживания: центральная, виллюйская, северная. На рисунке приведена консенсусная дендрограмма, отражающая генетические взаимоотношения между восемью популяциями на уровне генотипов, которая наглядно демонстрирует генетическую близость якутских выборок и взаимное расположение пяти других исследованных популяций Северной Евразии.

Структура SNP-гаплотипов в гене *DMPK* у больных МД и в популяционной выборке якутов

В группе больных МД было выявлено 29 SNP-гаплотипов, встречающихся с частотой от 0,1 до 39,9%. Наиболее распространенными оказались гаплотипы TTTCTC (39,9%) и GTCCTT (16,3%). В популяционной выборке якутов было найдено 37 гаплотипов, частота которых варьировала от 0,002 до 0,252. Два гаплотипа наблюдались с максимальной частотой – GTCCGT (24,8%) и TTCCGT (24,8%).



Генетические взаимоотношения между восемью популяциями по исследованным SNP-маркерам: Sev yak – якуты северного улуса; ch yak – якуты центрального улуса; vil yak – якуты вилкойского улуса; bur – буряты; kir – киргизы; kek – кеты; kha – ханты; rus – русские

В табл. 3 дана характеристика общих гаплотипов, обнаруженных у больных МД и в популяционной выборке якутов, а также результаты попарного сравнения частот этих гаплотипов. При сравнении группы больных МД и популяционной выборки якутов было зафиксировано 19 общих гаплотипов. Значимые отличия по частоте встречаемости наблюдались по пяти гаплотипам: ТТТСТС, ГТССТТ, ТТССГТ, ГТТССГТ, ТГССГТ. Все эти гаплотипы являются ассоциированными с митохондрической дистрофией I типа в якутской популяции. Из них в роли предрасполагающих к МД можно рассматривать гаплотипы ТТТСТС (OR = 19,88; 95%-й CI 11,04–36,19), ГТССТТ (OR = 5,94; 95%-й CI 3,09–11,50) и ГТТССГТ (OR = 6,49; 95%-й CI 1,02–51,37), а в качестве протективного – гаплотип ТГССГТ (OR = 0,14; 95%-й CI 0,01–0,98).

Таблица 3

Частоты гаплотипов и результаты попарного сравнения больных МД с популяционной выборкой якутов

| Гаплотип | Частота гаплотипа, % | | χ^2 | p | OR |
|----------|-------------------------|-------------------------|----------|-------|-------|
| | Больные МД (88 человек) | Популяция (280 человек) | | | |
| ТТТСТС* | 39,9 | 3,2 | 166,56 | 0,000 | 19,88 |
| ГТССТТ* | 16,3 | 3,2 | 37,22 | 0,000 | 5,94 |
| ТТССГТ* | 7,7 | 24,8 | 23,79 | 0,000 | 0,24 |
| ТТССТТ | 5,5 | 5,4 | 0,01 | 0,922 | 0,96 |
| ГТТССГТ* | 2,2 | 0,4 | 3,94 | 0,047 | 6,49 |
| ТТТСТТ | 2,1 | 3,7 | 0,50 | 0,480 | 0,60 |
| ТТТГТС | 1,9 | 0,2 | 3,29 | 0,069 | 9,69 |
| ГТССТС | 1,8 | 0,7 | 0,54 | 0,460 | 2,41 |
| ТГССГТТ | 1,7 | 0,9 | 0,24 | 0,625 | 1,92 |
| ТТССГС | 1,6 | 2,5 | 0,11 | 0,745 | 0,68 |
| ТТТССГТ | 0,9 | 2,1 | 0,29 | 0,592 | 0,52 |
| ТТТССГТ | 0,8 | 0,4 | 0,09 | 0,768 | 1,59 |
| ТТТСТС | 0,6 | 0,7 | 0,10 | 0,749 | 0,79 |
| ГГССГТ | 0,6 | 2,7 | 1,90 | 0,168 | 0,21 |
| ГТТССГТ | 0,5 | 0,2 | 0,00 | 0,971 | 3,19 |
| ТТТССГТ | 0,5 | 0,4 | 0,09 | 0,768 | 1,59 |
| ТГССГТ* | 0,5 | 3,9 | 3,95 | 0,047 | 0,14 |
| ТГССТТ | 0,3 | 0,2 | 0,00 | 0,971 | 3,19 |
| ТГССГТ | 0,1 | 1,3 | 0,12 | 0,731 | 0,45 |

* Частоты статистически значимо отличаются при $p \leq 0,05$.

Сравнение полученных гаплотипических данных с мировыми демонстрирует, что мажорный гаплотип ТТТСТС встречается у больных МД в разных странах примерно с такой же частотой, как и в данном исследовании (табл. 4).

Таблица 4

Частоты (%) гаплотипов по шести SNP-локусам гена DMPK у больных МД

| Гаплотип | Канада (Neville, 1994) | Япония (Yamagata, 1998) | Тайвань (Pan, 2001) | Корея (Kwon, 2010) | Якуты (данное исследование) |
|----------|------------------------|-------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------------|
| ТТТСТС | 49 | 30 | 41 | 41,4 | 39,9 |
| ГТССТТ | – | – | – | – | 16,3 |
| ГТССГТ | 27 | – | 11 | 20,4 | 5 |
| ТГССГТ | 16 | 10 | 15 | 10,5 | 1 |
| ТТССГТ | 8 | 53 | 21 | 19,7 | 7,7 |
| ТТССГТ | – | 4,8 | 4 | 6,6 | – |
| ТТССТТ | – | – | – | – | 5,4 |
| ТГТСТС | – | – | – | – | 3,4 |
| ГТТСТС | – | – | – | – | 2,3 |
| ГТТССГТ | – | – | – | – | 2,1 |

Три гаплотипа наблюдаются у больных МД разного этнического происхождения с близкими частотами. Гаплотип ГТССТТ, зафиксированный в нашем исследовании, характерен только для больных якутов.

Анализ STR-гаплотипов в изученных выборках якутов

В результате анализа микросателлитных повторов было зафиксировано 14 аллельных вариантов, встречающихся с частотой от 0,005 до 0,655. Число аллелей по каждому локусу варьировало от 4 до 12. При гаплотипическом анализе больных МД было продемонстрировано 114 гаплотипов, частоты которых варьировали от 0,6 до 8,8%. Подавляющее большинство гаплотипов (76%) наблюдались с минимальной частотой. С максимальной частотой был зафиксирован гаплотип 8-3-6-9-1-2. Результаты гаплотипического анализа позволили выявить наиболее общий, так называемый предковый гаплотип, который и рассматривался в дальнейшем как гаплотип основателя. В популяционной выборке наблюдали 123 гаплотипа, встречающихся с частотой от 0,7 до 2,6%.

Для оценки неравновесия по сцеплению σ было проведено исследование шести STR-маркеров на 80 хромосомах с мутацией и 154 хромосомах здоровых индивидов из якутской популяции. Наибольшие значения показателя неравновесия по сцеплению σ были получены для маркеров, расположенных дистально по отношению к области СТГ-повторов. Ослабление сцепления, соответственно, наблюдается по мере отдаления от области мутации (табл. 5).

Таблица 5

Значения неравновесия по сцеплению (σ) для «предковых» аллелей

| Аллель | σ |
|--------|----------|
| 8 | 0,0605 |
| 3 | 0,1872 |
| 6 | 0,4930 |
| 9 | 0,4241 |
| 1 | 0,25 |
| 2 | 0,0871 |

Оценка возраста мутации в гене *DMPK*
в якутской популяции

В работе был произведен расчет возраста мутации в гене *DMPK* путем анализа рекомбинации между изученными шестью микросателлитными маркерами, фланкирующими мутантную область у якутов, больных МД. Среднее значение числа поколений, прошедших после начала распространения исследуемой мутации в гене *DMPK*, составило 158,95 года. Исходя из продолжительности одного поколения 20 лет, время, за которое произошло накопление мутации, составило 3 179 лет.

Возраст мутации, оцененный в исследовании, исчисляется несколькими тысячелетиями и связан с докурыканским (гуннским) периодом формирования якутов (конец I тысячелетия до н.э.) [28]. Возникновение мутации, по-видимому, произошло намного раньше массового заселения предками якутов территории современной Якутии в XI–XII вв. [29], а время начала распространения мутации, таким образом, произошло в доэтническом периоде. Наши данные демонстрируют очень древнее происхождение изучаемой мутации в гене *DMPK*, связанное, по мнению исследователей якутского этноса, с существованием на территории современной Якутии и, вероятно, за ее пределами нескольких близкородственных племен. История возникновения мутации совпадает с периодом смены раннеолитической исаковской культуры серовской и китойской [30]. Наиболее вероятными кандидатами на эту роль представляются предки современных юкагиров и родственные им палеоазиатские племена. От кого из древних предков унаследована мутация, предполагать на сегодняшний день довольно сложно, поскольку происхождение данной мутации в других этнических группах практически не изучалось.

Оценка возраста, проведенная в данной работе, выявила одну из самых древних мутаций среди известных этноспецифических «якутских болезней», распространенных на территории Республики Саха. Так, в исследованиях мутации в гене *SCA1* спинocerebellarной атаксии 1-го типа расчеты показали, что сменилось 37 поколений после предка, внесшего мутацию, и ее возраст составляет 915–1 110 лет [31]. Подсчитанный возраст двух мутаций 4582insT в гене *CUL7* и G5741→A в гене *NAG* составляет $(1\ 645 \pm 248,25)$ и $(1\ 052 \pm 640,25)$ года соответственно [5]. Наиболее вероятный период начала экспансии гаплотипа основателя с мутацией q.-3179IVS1+1G>A в гене *CJB2*, приводящий к нейросенсорной несиндромальной тугоухости, в популяции якутов оценивается в среднем $(2\ 400 \pm 780)$ лет [32]. Время распространения мутации с.806C>T в гене *CYB5R3* при наследственной энзимопатической метгемоглобинемии в Якутии составило (285 ± 135) лет, период начала распространения мутации соответствует концу XVII – началу XVIII в. $(1\ 715 \pm 135)$ лет [33]. Анализ гаплотипов хромосом, несущих данную мутацию в популяции Якутии наряду с высокой частотой гетерозиготного носительства мутации у больных МД в этом же регионе, позволяет предположить действие эффекта основателя в ее происхождении и распространении.

Таким образом, анализ гаплотипической структуры шести однонуклеотидных полиморфных вариантов гена *DMPK* у больных миотонической дистро-

фией из якутской популяции выявил с высокой частотой (39,9%) гаплотип ТТТСТС, ассоциированный с болезнью, а также ряд гаплотипов, имеющих как предрасполагающую, так и протективную роль в отношении МД. Выявлен уникальный для больных МД якутов гаплотип GTCSTT. Показатель генетической дифференциации трех исследованных якутских популяций оказался на порядок ниже, чем среди населения Северной Евразии (0,97 и 9,9% соответственно). Возраст изучаемой мутации в гене *DMPK*, оцененный в данном исследовании, составил 3 179 лет.

Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП № 2014-14-576-0058-4439.

Литература

1. Ноговицына А.Н. Отягощенность населения Республики Саха (Якутия) наследственной патологией и анализ работы региональной медико-генетической консультации: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2001. С. 24.
2. Тарская Л.А., Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И. и др. Структура и разнообразие наследственной патологии в Республике Саха (Якутия) // Генетика. 2004. Т. 40, № 11. С. 1530–1539.
3. Барашков Н.А. Молекулярно-генетическое изучение наследственной несиндромальной сенсоневральной глухоты в Республике Саха (Якутия): автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2007. 23 с.
4. Максимова Н.Р., Ноговицына А.Н., Николаева И.А. и др. Клиническая характеристика 3-М синдрома у 43 якутских пациентов и подходы к ДНК-диагностике в Республике Саха (Якутия) // Мед. генетика. 2007. № 12. С. 35–38.
5. Максимова Н.Р. Клинико-генеалогическая и молекулярно-генетическая характеристика этноспецифических форм наследственной патологии у якутов: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 2009. 25 с.
6. Harper P.S., Van Engelen B., Eymard B., Wilcox D.E. Myotonic dystrophy: present management, future therapy. New York: Oxford University Press, 2004. P. 251.
7. Mathieu J., De Braekebeer M., Prevost C. Genealogical reconstruction of myotonic dystrophy in the Saguenay-Lac-Saint-Jean area (Quebec, Canada) // Neurology. 1990. V. 40. P. 839–842.
8. Сухомясова А.Л. Аутосомно-доминантная миотоническая дистрофия в Республике Саха (Якутия): автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2005. 22 с.
9. <http://www.genecards.org>
10. Pan H., Lin H., Ku W. et al. Haplotype analysis of the myotonic dystrophy type 1 (*DM1*) locus in Taiwan: implications for low prevalence and founder mutations of Taiwanese myotonic dystrophy type 1 // Eur. J. Hum. Genet. 2001. V. 9. P. 638–641.
11. Yamagata H., Miki T., Nakagawa M. et al. Association of CTG repeats and the 1-kb Alu insertion/deletion polymorphism at the myotonin protein kinase gene in the Japanese population suggests a common Eurasian origin of the myotonic dystrophy mutation // Hum. Genet. 1996. V. 97. P. 145–147.
12. Gennarelli M., Pavoni M., Cruciani F. CTG repeats distribution and Alu insertion polymorphism at myotonic dystrophy (*DM*) gene in Amhara and Oromo populations of Ethiopia // Hum. Genet. 1999. V. 105. P. 165–167.
13. Goldman A., Ramsay M., Jenkins T. New founder haplotypes at the myotonic dystrophy locus in Southern Africa // Am. J. Hum. Genet. 1995. Vol. 56. P. 1373–1378.
14. Krdijja D., Savic D., Mladenovic J. et al. Haplotype analysis of the Serbian population // Acta Neurol Scand. 2005. V. 111. 94. P. 274–277.
15. Shojasaffar B., Moradin N., Kahrizi K. et al. CTG expansion & haplotype analysis in *DM1* gene in healthy Iranian population // Can. J. Neurol. Sci. 2008. V. 35.(2). P. 216–219.
16. Wu Z., Yang J., Cao J. et al. Clinical, familial and hereditary analysis of myotonic dystrophy // J. Cent. South. Univ. (Med. Sci). 2011. V. 36 (6). P. 520–524.

17. Tweerasawat S., Papsing C., Pulkes T. CTG repeat lengths of the gehe in myotonic dystrophy patients compared to healthy controls in Thailand // *J. Clin. Neurosci.* 2011. V. 17 (12). P. 1520–1520.
18. Kwon M.J., Lee S.-T., Kim B.J. et al. Haplotype analysis of the Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1) Locus in the Korean Population // *Annals of Clinical & Laboratory Science.* 2010. V. 40. P. 156–162.
19. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index
20. Федорова С.А. Генетические портреты Республики Саха (Якутия): анализ линий митохондриальной ДНК и Y-хромосомы / отв. ред. М.И. Томский. Якутск: Изд-во ЯНЦ СО РАН, 2008. 235 с.
21. Nei M. *Molecular evolutionary genetics.* N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987.
22. Labuda D., Zietkiewicz E., Labuda M. The genetic clock and age of the found effect in growing populations: a lesson from French Canadians and Ashkenazim // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. V. 61. P. 768–771.
23. Risch N., de Leon D., Ozellus L. et al. Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population // *Nat. Genet.* 1995. V. 9. P. 152–159.
24. Bengtsson B., Thomson G. Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases // *Tissue Antigen.* 1981. V. 18. P. 356–363.
25. Попова С.Н., Сломинский П.А., Тарская Л.А. и др. Анализ аллельного полиморфизма триплетных повторов (CTG)_n и (CAG)_n в генах *DM*, *DRPLA* и *SCA1* в различных популяциях России // *Генетика.* 2002. Т. 38, № 11. С. 1312–1315.
26. Pakendorf B., Novgorodov I., Osakovskij V. et al. Investigating the effects of prehistoric migrators in Siberia: genetic variation and the origins of Yakuts // *Hum. Genet.* 2006. V. 120. P. 334–353.
27. Федорова С.А., Хусаинова Р.И., Кутуев И.А. и др. Полиморфизм (CTG) повторов гена миотонинпротеинкиназы в популяциях Республики Саха (Якутия) и Средней Азии // *Молекул. биология.* 2005. Т. 39, № 3. С. 385–393.
28. Константинов И.В. Происхождение якутского народа и его культуры // Якутия и ее соседи в древности (труды Приленской археологической экспедиции). Якутск: Изд-во ЯФСОАН СССР, 1975. С. 138–140.
29. Гоголев А.И. История Якутии (обзор исторических событий до начала XX в.). Якутск: Изд-во Якутского ун-та, 2000. 201 с.
30. Окладников А.П. История Якутской АССР. М.; Л., 1955. Т. 1. 432 с.
31. Осаковский В.Л., Шатунов А.Ю., Платонов Ф.А., Гольдфарб Л.Г. Оценка возраста мутантной хромосомы по гену *SCA1* в якутской популяции // *Якут. мед. Журнал.* 2004. № 2 (6). С. 63.
32. Барашков Н.А., Федорова С.А., Джемилева Л.У. и др. Реконструкция гаплотипа основателя с мутацией q-3179(ΔVS1+1GΔA) в гене *GJB2*, приводящей к аутосомно-рецессивной глухоте типа 1А, в популяции якутов // *Мед. генетика.* 2010. № 11. С. 11–21
33. Галеева Н.М., Воевода М.И., Спиридонова М.Г. и др. Популяционная частота и возраст мутации с.806С>Т в гене *CYB5R3*, являющейся причиной наследственной метгемоглобинемии первого типа в Якутии // *Генетика.* 2013. Т. 49, № 4. С. 523–530.

ЭВОЛЮЦИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ ЛИНИЙ Y-ХРОМОСОМЫ В ПОПУЛЯЦИЯХ СИБИРИ

В.Н. Харьков^{1,2}, В.А. Степанов^{1,2}

¹НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

Изучение разнообразия генофонда человечества на популяционном, этническом, региональном, расовом и видовом уровнях организации является одним из наиболее важных направлений исследований, стоящих перед современной генетикой человека. В настоящее время множество научных коллективов по всему миру проводят анализ структуры генофондов различных популяций. Активно развиваются и международные проекты по анализу разнообразия популяций человека – Human Genome Diversity Project, HapMap Project, The Genographic Project, The 1000 Genomes Project. Современные молекулярно-генетические подходы дают исследователям множество инструментов для анализа эволюции генофонда человечества, его адаптации к различным климатогеографическим условиям, филогенетических реконструкций, геногеографии различных маркеров. В течение последнего десятилетия произошел настоящий прорыв в исследовании генетической вариативности человеческих популяций как по нейтральным маркерам, так и в области медицинской генетики, где в настоящее время рутинными стали работы по полногеномному поиску ассоциаций различных заболеваний с сотнями тысяч SNP.

Y-хромосома является уникальным инструментом для изучения структуры генофондов и эволюционной истории популяций человека. В связи с тем что значительная часть этой хромосомы не участвует в процессах рекомбинации (NRY), она передается исключительно от отца к сыну. Патрилинейность

обеспечивает последовательное накопление мутаций, в результате чего Y-хромосома представляет собой достаточно простую маркерную систему для исследования генетической структуры популяций, а также для реконструкции эволюционных изменений, миграционных и других демографических процессов в популяциях человека [1–4]. Анализ NRY одинаково эффективно применим как для реконструкции событий генетической истории отдельных популяций, так и для масштабных филогенетических и географических исследований монофилиетических линий Y-хромосомы [5–10]. За два последних десятилетия накоплено огромное количество данных, полученных при анализе нерекombинирующей части Y-хромосомы. Иерархический анализ гаплогрупп, определяемых на основании генотипирования диаллельных маркерных систем и микросателлитных гаплотипов ДНК Y-хромосомы, является одним из наиболее современных и результативных методов изучения популяционно-генетического разнообразия различных популяций человека. Высокая информативность маркеров, значительные межпопуляционные различия по гаплогруппам, развитый аппарат статистического анализа микросателлитного разнообразия монофилиетических кластеров [11–13] обуславливают актуальность этого подхода и его широкое применение практически всеми коллективами, занимающимися проблемами этногенетики [14, 15].

Популяции коренных этносов Сибири представляют значительный интерес для такого рода исследова-

дований в силу специфичности их генофондов, развивавшихся зачастую в условиях длительной генетической изоляции. Уникальный генофонд коренного населения Сибири представляет собой ценный источник генетической информации, важный как для выяснения эволюции генофонда населения Евразии и Америки, так и для анализа молекулярной эволюции многих гаплогрупп Y-хромосомы, что важно для реконструкции генетической истории человека в целом.

Целью настоящего исследования явилась характеристика структуры генофондов коренных этносов Сибири, филогенетической структуры гаплогрупп Y-хромосомы, а также их филогеографический анализ и реконструкция молекулярной эволюции гаплотипов.

Материал и методы

Материал для исследования составили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов крови мужчин, принадлежащих к различным этническим группам населения Сибири, Дальнего Востока, Средней Азии и Восточной Европы. Охарактеризовано более 50 популяционных выборок, принадлежащих к 24 этническим группам. Общая численность суммарной выборки составила 2 729 образцов. В исследование были включены 97 SNP и 36 STR-маркеров (DYS: 19, 385a, 385b, 388, 389I, 389II, 390, 391, 392, 393, 426, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 442, 444, 445, 448, 456, 458, 462, 504, 505, 525, 531, 537, 552, 635, YCAIIa, YCAIIb, GATAH4, YGATAA10, GGATT1B07). Генотипирование STR проводили с помощью капиллярного гель-электрофореза на генетических анализаторах ABI Prism 3130xl и 3730.

Результаты и обсуждение

Общая структура генофонда

Результаты проведенного анализа свидетельствуют о многокомпонентности генофонда коренного населения Сибири, в котором представлены гаплогруппы западно-евразийского и восточно-евразийского происхождения. Состав и частоты гаплогрупп Y-хромосомы являются этноспецифичными. Региональная структурированность суммарного генофонда связана с удельным весом в его составе европеоидного и монголоидного компонентов, а также уральского генетического субстрата, которые маркируются соответствующими гаплогруппами.

Этнические группы Западной и Южной Сибири характеризуются наличием значительной доли западно-евразийской (древнеевропеоидной) генетической компоненты, частота которой снижается с запада на восток [16–18]. В популяциях Восточной Сибири и Дальнего Востока не зарегистрировано западно-евразийских линий и наблюдается доминирование автохтонных восточно-евразийских гаплогрупп [19].

Основными факторами, определяющими генетические взаимоотношения коренных этносов Сибири, являются различное соотношение в их генофондах западно-евразийских (R1a1a, R1b1b1, R1b1b2, J2a, I1, I2a, E, G) и восточно-евразийских (C3*, C3c, C3d, D, O2, O3a*, O3a3c*, O3a3c1) гаплогрупп Y-хромосомы и степень представленности уральско-самодийского компонента (N*, N1b, N1c1) и палеолитического генетического субстрата (Q1a*, Q1a3, Q1a3a1).

Этносы, близкие географически, проявляют и близость по составу и частотам гаплогрупп Y-хромосомы. Западно-сибирская группа этносов (ханты, манси, ненцы, селькупы) характеризуется преобладанием гаплогруппы N1b и практически полным отсутствием восточно-евразийских линий клад C3, O2 и O3. Южно-сибирская группа (северные и южные алтайцы, телеуты, хакасы, шорцы, тувинцы, сибирские татары) отличается присутствием значительной доли западно-евразийских линий, маркирующих европеоидный компонент в составе их генофондов. Наибольшим количеством гаплогрупп представлены популяционные выборки тувинцев. Это может свидетельствовать о наиболее интенсивных миграционных потоках на данной территории. Восточно-сибирские этносы (эвенки, эвены, якуты, чукчи, коряки, нивхи и удэгейцы) характеризуются значительной частотой линий C3 и N1c1 в разном соотношении и практически полным отсутствием европеоидного компонента.

В популяциях Южной Сибири наблюдается снижение суммарной частоты западно-евразийских гаплогрупп в направлении с запада на восток: максимальные значения обнаружены на Алтае (у северных и южных алтайцев и телеутов 66–68%), в саянской группе популяций (хакасы и тувинцы) отмечается уменьшение до 18–30%, в Забайкалье у бурят частота не превышает 5%. Y-хромосомные генофонды западно-сибирских хантов и восточно-сибирских эвенков и якутов также характеризуются значительной частотой западно-евразийских гаплогрупп (15, 30 и 4%, соответственно). В популяциях Северо-Восточной Сибири и Дальнего Востока наблюдается отсутствие западно-евразийского компонента.

В популяциях Восточной Сибири, за исключением якутов, преобладающими вариантами Y-хромосомы являются линии восточно-евразийской клады C (C3* и C3c). Якуты же характеризуются чрезвычайно высокой частотой (около 90%) гаплогруппы N1a1. В популяциях Дальнего Востока наблюдается сочетание высокой частоты C3*, N1c1 и присутствие Y-хромосом, относящихся ккладам O, D и Q. Последняя преобладает у эскимосов, составляя более 80% их Y-хромосомного пула, а также относительно часто (11%) встречается у чукчей.

Дальневосточные чукчи и коряки близки к восточно-сибирским популяциям по наличию этой гаплогруппы (61 и 24% соответственно), а среди исследованных выборок нивхов и удэгейцев эта Y-хромосомная линия встречается с частотой менее 5%. Нивхи наряду с коряками, удэгейцами характеризуются наибольшей среди исследованных популяций частотой гаплогруппы C3* (71%). Две эти гаплогруппы составляют основу восточно-сибирского генофонда. Объединяет коряков, нивхов, чукчей и эвенков и обнаруженная только у них гаплогруппа Q1a* (Q1aхM346).

Данные о частотах гаплогрупп Y-хромосомы в исследованных популяционных выборках были использованы для выяснения филогенетических взаимоотношений между различными сибирскими этносами. Анализ частот гаплогрупп с помощью метода главных компонент показал, что сибирские этносы подразделяются на несколько дифференцированных групп географически близких популяций: 1) алтайско-саянскую (северные и южные алтайцы, телеуты, томские татары, хакасы); 2) восточно-сибирскую

(буряты, эвенки, якуты); 3) чукотско-камчатскую (чукчи и коряки); 4) дальневосточную (нивхи, удэгейцы). Кеты, ханты и алтайские казахи характеризуются специфическими особенностями генофонда и не кластеризуются с другими исследованными этносами (рис. 1).

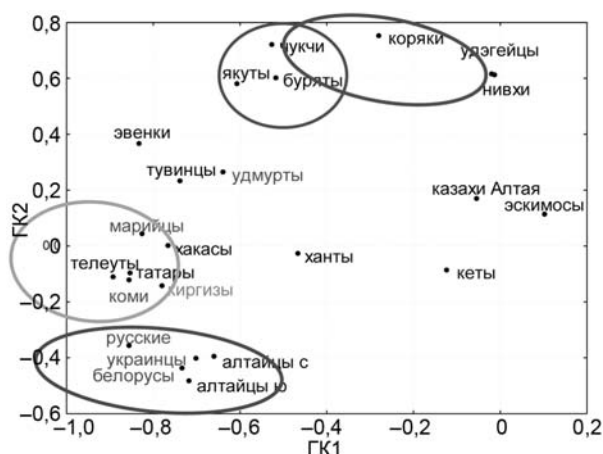


Рис. 1. Положение исследованных этносов в пространстве главных компонент частот гаплогрупп Y-хромосомы

Анализ корреляции матриц генетических, антропологических, лингвистических и географических дистанций всего массива данных с помощью теста Мантеля показал, что, несмотря на отсутствие значимой корреляции генетических расстояний с антропологическими, лингвистическими, географическими дистанциями, матрица генетических расстояний по частотам гаплогрупп коррелирует с географией с уровнем значимости, близким к пороговому ($r = 0,2116$; $p = 0,0728$). Доля генетической вариабельности, объясняемая географией, также в несколько раз превосходит антропологические и лингвистические характеристики. Можно говорить о тенденции к формированию значимых корреляций, что вполне соответствует популяционно-генетической специфике Y-хромосомных линий, связанной с высокой подверженностью эффектам дрейфа и патриликальностью.

На региональном уровне организации популяций значение коэффициента корреляции возросло в несколько раз, причем в популяциях Южной Сибири и Дальнего Востока географический фактор детерминирует генетические различия гораздо значительнее, чем в Восточной Европе. Статистически значимые результаты получены лишь для южно-сибирского региона. Для восточно-европейского и дальневосточного регионов уровень значимости корреляции тем не менее оказался близким к пороговому. Результаты анализа свидетельствуют о более значительном вкладе в картину генетических различий географического фактора и о меньшей роли антропологических и лингвистических характеристик популяций в детерминации их генетической вариабельности.

Генетическое разнообразие

Сибирские популяции характеризуются относительно низким уровнем генетического разнообразия по гаплогруппам Y-хромосомы по сравнению с европейскими, среднеазиатскими и восточно-азиатскими популяциями. Формирование генофондов большин-

ства сибирских этносов происходило на базе небольшого числа генетических компонент. Наибольшее разнообразие гаплогрупп и YSTR-гаплотипов наблюдается у южно-сибирских этносов, что отражает их формирование на гетерогенной основе. Восточно-сибирские и дальневосточные этносы характеризуются значительно меньшим уровнем генетического разнообразия по маркерам Y-хромосомы. Максимальными для Сибири показателями разнообразия как по частотам гаплогрупп, так и YSTR-гаплотипов характеризуются тувинцы ($H = 0,854/0,494$), эвенки ($H = 0,810/0,501$) и томские татары ($H = 0,862/0,549$), что связано с формированием этих народов на основе разнородных по происхождению предковых групп населения. Минимальным генетическим разнообразием отличаются якуты ($H = 0,176/0,206$), для которых это является следствием сильного эффекта основателя, кеты ($H = 0,297/0,338$) и нивхи ($H = 0,486/0,470$), сохранившие исходно небольшое число реликтовых Y-хромосомных линий.

Генетическая дифференциация

Показано, что сибирские популяции выделяются на фоне других евразийских этносов значительно более высоким уровнем межэтнической и межрегиональной генетической дифференциации: общий уровень генетических различий по гаплогруппам Y-хромосомы составляет для Сибири 25,11%. Коренное население различных районов Сибири различается по степени генетической дифференциации: наименее дифференцированы этносы Южной Сибири (15,05%) и Дальнего Востока (21,57%), а наибольшие значения F_{st} выявлены среди популяций Восточной Сибири (43,13%).

Причинами более высокого уровня подразделенности в Сибири, очевидно, являются большая территориальная удаленность различных этносов этого огромного региона и наличие географических барьеров, следствием чего становится изолированность отдельных региональных групп населения, а также небольшой размер эффективной численности коренных популяций. Кроме того, коренные народы Сибири сильно различаются по степени внутриаэтнической генетической дифференциации. Межпопуляционная дифференциация тувинцев и якутов по данным частот гаплогрупп Y-хромосомы довольно низка (2,10 и 0,24% соответственно), у хакасов (19,89%), хантов (28,41%) и бурятов (29,15%) уровень генетической подразделенности значительно выше.

Филогения и филогеография гаплогруппы N1c1

Гаплогруппа N1c1 на территории Сибири является наиболее частой, ее доля в общем генофонде составляет более 30%. Линия N1c1 распространена практически у всех сибирских этносов, но отсутствует среди коренных популяций Нового Света [6, 10], следовательно, ее носители достигли географического источника миграций в Америку – Южной Сибири и Центральной Азии позднее, чем последние мигранты направились в Берингию. Наибольшая частота гаплогруппы N1c1 характерна для якутов (до 90%) и восточных бурят (до 85%). Значительна ее доля также у чукчей (61%), коряков (24%), телеутов (29%), эвенков (34%) и тувинцев (19%) (рис. 2).

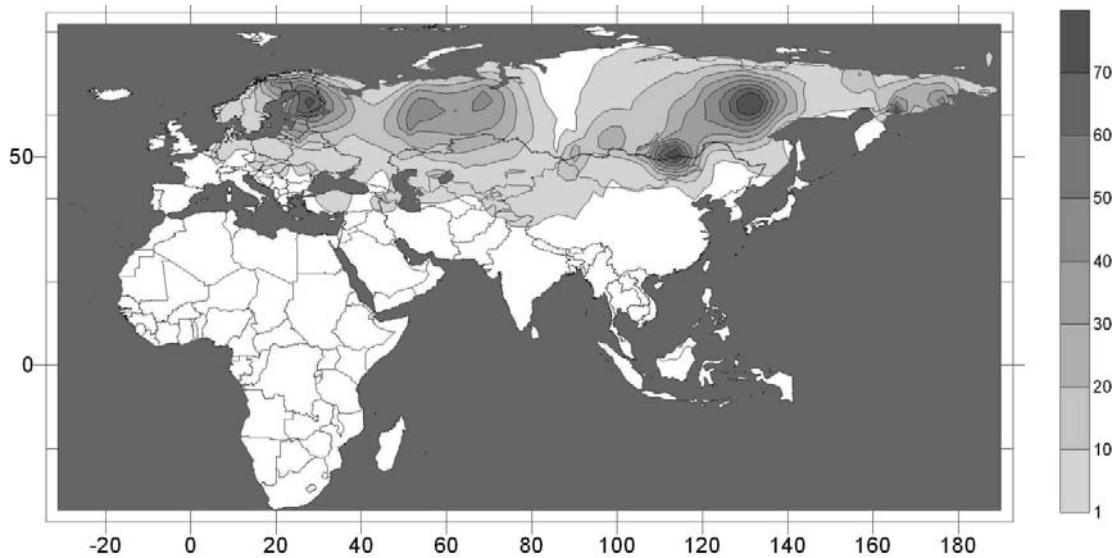


Рис. 2. Филогеография гаплогруппы N1c1 в популяциях Евразии

Показано, что гаплогруппа N1c1 характеризуется наличием нескольких сестринских сублиний, определяемых соответствующими SNP-маркерами. Наиболее древняя ветвь, определяемая маркером M178, в настоящее время имеет очень узкий ареал на территории Южной Сибири и выявлена лишь у тувинцев, хакасов и шорцев. К ее производной, определяемой маркерами L708 и L839, относятся все остальные исследованные образцы гаплогруппы N1c1. Эта основная линия, в свою очередь, представлена несколькими параллельными субгаплогруппами, каждая из которых имеет очень специфичную филогеографию. Все ранние филогенетические ветви N1c1 обнаруживаются практически исключительно среди образцов, принадлежащих коренным популяциям Сибири, что подтверждает гипотезу об азиатском происхождении этой гаплогруппы.

К линии N1c1-F3271-F4205 принадлежат все относящиеся к N1c1 образцы бурятов, большинства тувинцев, томских татар и казахов. Линия N1c1-M1979-M1991 распространена исключительно среди эвенков и якутов. Якутско-эвенкийская линия отличается и очень высокоспецифичным составом гаплотипов, свидетельствующим об очень сильном эффекте основателя. Линии N1c1-L708-L839* и N1c1-L392 распространены и в Сибири, и в Европе. Наиболее интересным оказалось распространение линии N1c1-L392*, которая обнаружена с низкой частотой в европейских популяциях, а также у коряков и чукчей. Причем у сибирских палеоазиатов она явно имеет достаточно древнее происхождение и не связана с метисацией. Остальные европейские образцы, принадлежащие к N1c1-L392, распадаются на две параллельные субгаплогруппы: N1c1-VL29 и N1c1-Z1936. Первая распространена исключительно в Европе, вторая встречается и на территории Западной Сибири, маркируя относительно недавнюю миграцию носителей субклады N1c1-Z1034 из Европы в Сибирь.

Этноспецифичные медианные сети гаплотипов свидетельствуют о решающей роли географической изоляции популяций в формировании современной картины генетического разнообразия по линиям Y-хромосомы на территории Сибири. Это отражает наличие в прошлом различных миграционных волн на территории современного распространения этой

гаплогруппы и локальных разновременных эффектов основателя внутри этой линии. Получена значительная генетическая дифференциация европейских и азиатских выборок. Уровень генетической дифференциации между азиатскими этносами почти в три раза выше, чем между европейскими (59,41 и 18,22% соответственно).

Филогеографический анализ различных линий гаплогруппы N1c1 показывает, что сибирские популяции характеризуются наиболее высоким общим уровнем молекулярного гаплотипического разнообразия. В то же время у большинства сибирских этносов наблюдаются свидетельства сильного эффекта популяционного «горлышка бутылки» в их популяционной истории. Местом происхождения и первичной генерации разнообразия линии N1c1 является территория Южной Сибири или Центральной Азии. Появление этой гаплогруппы в составе генофондов волго-уральских этносов маркирует миграционные потоки из Западной Сибири и территорию Восточной Европы и связано с расселением народов уральской языковой семьи. Эта линия проникла на территорию Восточной Европы относительно недавно, и гаплотипическое разнообразие, представленное на данной территории, является, вероятно, выборкой из пула гаплотипов, представленных среди азиатских этносов.

Филогения и филогеография гаплогруппы N1b

Гаплогруппа N1b сестринская для N1c1, определяемая мутацией маркера P43, делит с гаплогруппой R1a1a второе – третье места по частоте (чуть более 16% суммарной численности сибирских образцов). Среди сибирских этносов наибольшая частота гаплогруппы N1b выявлена в настоящей работе у хантов (57% всех образцов), хакасов (44%) и тувинцев (25%). Доля этой гаплогруппы у других исследованных популяций Сибири значительно ниже. У северных алтайцев она достигает 6% общего числа Y-хромосом, во всех остальных изученных выборках сибирских этносов ее частота не превышает 4%. Восточнее Тувы гаплогруппа N1b обнаружена лишь у якутов (1,3%) (рис. 3). К сожалению, в настоящее время отсутствуют SNP-маркеры, позволяющие выделять дочерние линии и эффективно дифференцировать гаплогруппу N1b.

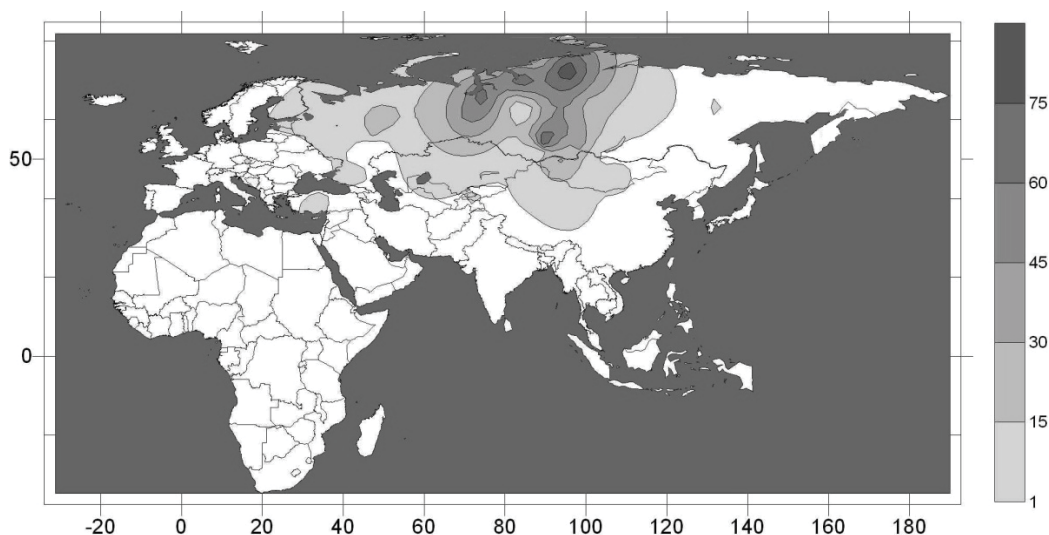


Рис. 3. Филогеография гаплогруппы N1b в популяциях Евразии

Гаплогруппа N1b представляет собой маркер доисторической связи между сибирскими и европейскими популяциями. Вероятно, она маркирует древнюю популяционную общность населения уралоидного антропологического типа, заселявшего территории к востоку и западу от Уральских гор. Наибольшая частота гаплогруппы N1b приходится на территорию Западной Сибири и Алтае-Саянский регион. Именно эта гаплогруппа доминирует у всех этносов, принадлежащих к группе самодийских языков уральской языковой семьи. Значительная частота этой гаплогруппы в Южной Сибири, в частности у хакасов и тувинцев, вероятнее всего, отражает вклад в их современный генофонд самодийских этносов, заселявших эту территорию ранее. Распространение N1b на территории Европы связано с расселением предков современных финноязычных народов, поскольку данная гаплогруппа характерна для финно-угорских народов Урала и Поволжья. Присутствие гаплогруппы N1b в популяциях татар, башкир и русских связано с включением в состав этих народов финно-угорского генетического субстрата.

Совокупность накопленных к настоящему времени данных по структуре N1b также свидетельствует о наличии сильных региональных различий. Медианная сеть N1b-A состоит из нескольких ветвей гаплотипов. Основная ветвь, сформированная вокруг гаплотипа основателя, включает в себя представителей большинства сибирских народов (хантов, хакасов, шорцев, монголов, алтайцев, эвенков, тофаларов) и имеет более древнее происхождение, то есть является предковой и по отношению к остальным. Большинство этнических и региональных генофондов характеризуются преобладанием собственных локальных гаплотипов-основателей, являющихся производными от предкового для всей клады N. В Сибири гаплотипы различных сублиний внутри N1b особенно отчетливо дифференцируются на ряд обособленных кластеров.

Филогенетический анализ гаплогруппы N1b показывает наличие в ней двух четко дифференцированных кластеров гаплотипов: «азиатского», наиболее разнообразного по числу гаплотипов и дисперсии числа STR-повторов, и «европейского». К «азиатскому» кластеру принадлежат гаплотипы всех сибирских и среднеазиатских этносов: хакасов, тувин-

цев, якутов, алтайцев, шорцев, киргизов, монголов, анатолийских турков и удмуртов. В выборках коми и хантов присутствуют гаплотипы как N1b-A, так и N1b-E. Большинство образцов хантов и удмуртов принадлежат к «азиатскому» кластеру, и лишь несколько – к «европейскому». Вариабельность N1b-A максимальна в сибирских популяциях, а N1b-E у русских.

Медианная сеть N1b-E отчетливо подразделяется на три кластера гаплотипов: первый объединяет хантов, манси и удмуртов; второй включает русских, финнов и вепсов; к третьему принадлежат марийцы. У коми обнаружены гаплотипы всех трех кластеров. Судя по всему, это отражает наличие трех основных центров популяционной экспансии носителей N1b-E и наибольшую генетическую близость коми к предковой по N1b-E популяции.

Анализ структуры филогенетического древа гаплотипов кластера N1b-A показал более высокий уровень гаплотипического разнообразия, что согласуется с представлением о том, что азиатский кластер более древний, чем европейский, причем последний является производным первого. Полученные в настоящей работе факты говорят в пользу гипотезы об азиатском происхождении N1b, что подтверждает высказанные ранее предположения [7].

Гаплотипы кластера N1b-A обнаружены и в популяциях коми, удмуртов, русских. Это подчеркивает сложность процессов этногенеза и, возможно, указывает на тот факт, что первичной территорией генерации разнообразия и экспансии численности для данной гаплогруппы была территория Сибири (вероятно, она соответствует ареалу обитания хантов, чей генофонд и представлен гаплотипами, относящимися к обоим субкладам). У хантов и манси также обнаружены гаплотипы, принадлежащие как к европейскому, так и к азиатскому кластеру гаплогруппы N1b. Вероятно, это может быть связано с тесными контактами между различными этносами. Так, например, известны взаимодействия между хантами, манси и коми.

Предположительным местом возникновения гаплогруппы N1b является Западная Сибирь. Вероятно, территория, соответствующая современному ареалу хантов, была первичным очагом генерации разнообразия и экспансии численности предковой

группы носителей гаплогруппы N1b. По мере расселения носителей гаплогруппы сформировались вторичные очаги генерации разнообразия и экспансии численности – на территории Южной Сибири и Восточной Европы. Наличие гаплотипов обоих кластеров в популяционных выборках хантов, коми и русских и, как следствие, высокий уровень разнообразия гаплотипов связаны не с близостью к предковой группе, а являются результатом интенсивных миграционных процессов на территории Западной Сибири и Приуралья, имевших место намного позже времени формирования азиатского и европейского кластеров гаплотипов в пределах гаплогруппы N1b.

Филогения и филогеография гаплогруппы R1a1a

Гаплогруппа R1a1a занимает второе – третье по частоте место в обобщенном сибирском генофонде (16,2%) и является основным маркером европеоидного компонента, широко представленного в популяциях Западной и Южной Сибири. Ареал распространения гаплогруппы R1a1a ограничен территорией Евразии [20]. Внутри ареала отчетливо выделяются три географические области, где частота этой линии достигает наибольших значений (рис. 4). Первая область приходится на территорию Восточной Европы и объединяет популяции восточных славян (русских, украинцев и белорусов). Вторая область максимума частоты гаплогруппы R1a1a – Алтае-Саянский регион. Наиболее частой эта гаплогруппа является здесь у алтайцев, телеутов и хакасов. Меньшая доля R1a1a наблюдается у тувинцев, сибирских татар и хантов. Наличие этой линии на территории Сибири можно с уверенностью связать с древним европеоидным компонентом.

При объединении всех исследованных выборок в одну группу доля различий между ними составила 3,79%. Дифференциация европейских и южно-сибирских популяций более чем в два раза выше (9,33%). Но межэтнические различия среди группы южно-сибирских популяций показывают значение 22,81%, многократно превосходящее оценку для европейских популяций. Результаты проведенного дисперсионного анализа выявляют значительную межэтническую дифференциацию в Южной Сибири.

При этом как европейские, так и азиатские этносы показывают очень небольшую долю генетических различий между разными выборками внутри одного этноса (менее 3%).

Как и гаплогруппа N1c1, R1a1a представлена несколькими субгаплогруппами, имеющими различную филогеографию, филогенетическую структуру и этническую специфику. Южно-сибирская группа этносов (алтайцы, хакасы, телеуты, шорцы, тувинцы, сибирские татары, буряты, эвенки) характеризуется полным преобладанием специфических азиатских вариантов R1a1a. Маркер Z93 определяет в пределах R1a1a азиатскую ветвь, к различным сублиниям которой принадлежат практически все образцы в популяциях Сибири и Средней Азии. Определяемая отсутствием мутации по маркеру Z94 наиболее древняя на территории Сибири предковая линия в настоящее время имеет распространение у тувинцев, хакасов, шорцев, алтайцев, бурятов и хантов.

В ряде сибирских популяций (телесы, тубалары) отмечается присутствие этноспецифических кластеров гаплотипов, отличающихся от основного массива сразу на несколько мутационных шагов только по отдельным YSTR-маркерам. Высокие показатели дисперсии числа tandemных повторов в таких популяциях, скорее всего, не являются следствием длительности накопления генетического разнообразия в пределах изучаемой гаплогруппы, а, вероятно, отражают особенности развития генофондов локальных популяций под влиянием специфического сочетания факторов популяционной динамики: низкой эффективной численности популяций, высокой степени изоляции, экспансии численности отдельных локальных групп населения и выраженного эффекта основателя. На территории Южной Сибири медианная сеть гаплотипов R1a1a-Z93 показывают высокую специфичность внутренней структуры линий для различных групп популяций, значительно превосходящую таковую для европейских популяций, что подчеркивает межэтнические различия по этой гаплогруппе в южно-сибирском генофонде. Медианная сеть R1a1a-Z93 показывает генетическое родство тувинцев, шорцев и хакасов, с одной стороны, и хантов и большинства северных алтайцев – с другой.

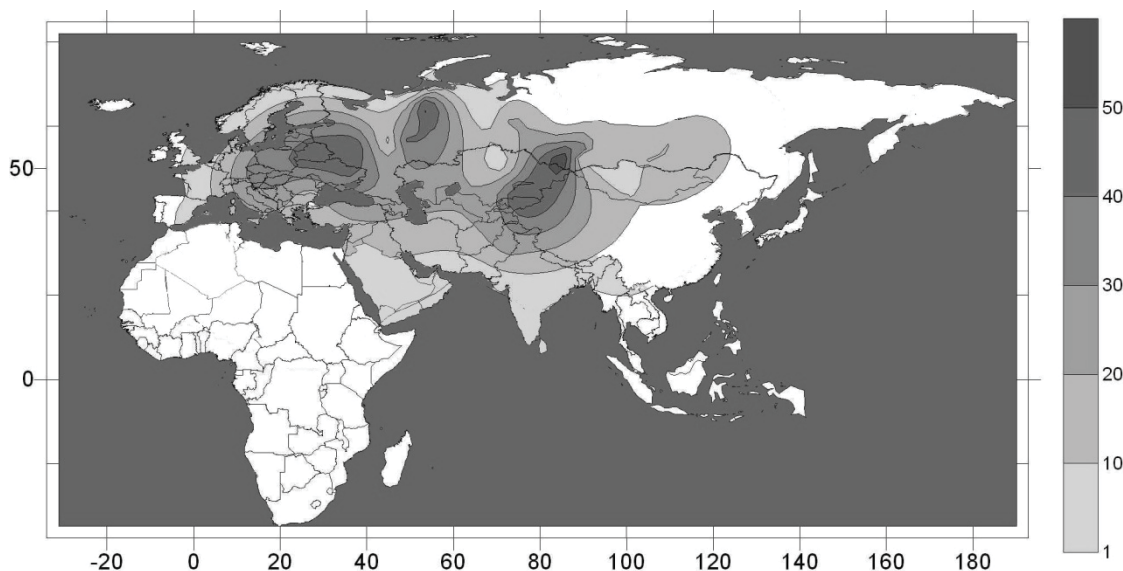


Рис. 4. Филогеография гаплогруппы R1a1a в популяциях Евразии

К производной этой линии, определяемой маркерами Z94 и Z2124, относятся практически все исследованные образцы телеутов, киргизов и большинства южных алтайцев. Самое низкое внутривнутрипопуляционное разнообразие по этой линии обнаружено у киргизов и телеутов ($H = 0,23$). У южных алтайцев, телеутов и киргизов имеет место относительно недавний эффект основателя по данной гаплогруппе, поскольку их медианная сеть имеет характерную звездообразную филогенетическую структуру с преобладанием по частоте модального гаплотипа основателя.

Заключение

Результаты филогенетического и дисперсионного анализа свидетельствуют, что состав и структура микросателлитных гаплотипов Y-хромосомы для всех основных гаплогрупп и уровень генетического разнообразия и внутриэтнической генетической дифференциации сибирских популяций в пределах отдельных линий Y-хромосомы являются высокоспецифичными для каждого этноса. Наблюдается значительная генетическая дифференциация между европейскими и азиатскими популяциями по гаплогруппам R1a1a, N1b и N1c1. Коренные этносы Сибири характеризуются большим уровнем межэтнической генетической дифференциации по сравнению с европейскими.

Показано, что гаплотипы, построенные с помощью генотипирования 36 STR-маркеров Y-хромосомы для всех гаплогрупп, обладают огромной расовой и этнической специфичностью, что позволяет эффективно использовать отработанный набор YSTR-маркеров для целей ДНК-идентификации. Степень детализации зависит практически лишь от количества YSTR, используемых для построения гаплотипа: если для высокоразрешающего анализа индивидов при генеалогических реконструкциях требуется от 30 и более маркеров, то для подробного описания популяционного генофонда достаточно 12–15 YSTR. Анализ структуры медианных сетей гаплотипов показывает, что в пределах большинства гаплогрупп наблюдается разделение не только на этноспецифические группы гаплотипов, но и на более узкие кластеры. В ряде случаев показана возможность установить этнотерриториальное происхождение индивида вплоть до населенного пункта. Большинство этнических и региональных генофондов характеризуются преобладанием собственных локальных групп гаплотипов, являющихся производными от предкового для конкретной популяционной гаплогруппы.

Сибирские популяции выделяются на фоне других этносов значительно более высоким уровнем межэтнической генетической дифференциации как по всем основным гаплогруппам, так и по суммарному генофонду. По данным о родовом составе алтайцев, хакасов, шорцев, хантов и телеутов и генетической характеристике отдельных родов обнаружено, что генофонд этих групп также демонстрирует высокоспецифичные кластеры YSTR-гаплотипов, что позволяет проводить этнотерриториальное определение индивида на уровне субэтноса или рода. Выбранные микросателлитные маркеры являются достаточно высокоинформативными для большинства популяционных выборок. Таким образом, YSTR-маркеры имеют огромный потенциал для использования в этнической идентификации биологических образцов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 12-04-00595а, 13-04-02023а).

Литература

1. Jobling M.A., Tyler-Smith C. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution // *Trends in Genetics*. 1995. V. 11. P. 449–456.
2. Underhill P.A., Shen P., Lin A.A. et al. Y chromosome sequence variation and the history of human populations // *Nature Genet.* 2000. V. 26. P. 358–361.
3. Jobling M.A., Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age // *Nat. Rev. Genet.* 2003. V. 4. P. 598–612.
4. Jobling M.A., Tyler-Smith C. New uses for new haplotypes the human Y chromosome, disease and selection // *Trends in Genetics*. 2000. V. 16. P. 356–362.
5. Cruciani F., Trombetta B., Massaia A. et al. A revised root for the human Y chromosome phylogenetic tree: The origin of patrilineal diversity in Africa // *Am. J. Hum. Genet.* 2011. V. 88. № 6. P. 814–818.
6. Derenko M., Malyarchuk B., Denisova G. et al. Y chromosome haplogroup N dispersals from south Siberia to Europe // *J. Hum. Genet.* 2007. V. 52 (9). P. 763–770.
7. Malyarchuk B., Derenko M., Denisova G. Phylogeography of the Y-chromosome haplogroup C in northern Eurasia // *Ann. Hum. Genet.* 2010. V. 74. P. 539–546.
8. Malyarchuk B., Derenko M., Denisova G. Ancient links between Siberians and Native Americans revealed by subtyping the Y chromosome haplogroup Q1a // *J. Hum. Genet.* 2011. V. 56. P. 583–586.
9. Rootsi S., Magri C., Kivisild T. et al. Phylogeography of Y-Chromosome Haplogroup I Reveals Distinct Domains of Prehistoric Gene Flow in Europe // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 75. P. 128–137.
10. Rootsi S., Zhivotovsky L.A., Baldovic M. et al. A counterclockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe // *Eur. J. Hum. Genet.* 2007. 15. P. 204–211.
11. Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies // *Genetics*. 1995. V. 139. P. 457–462.
12. Michalakis Y., Excoffier L. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci // *Genetics*. 1996. V. 142. P. 1061–1064.
13. Zhivotovsky L.A. Estimating divergence time with the use of microsatellite genetic distances: impacts of population growth and gene flow // *Mol. Biol. Evol.* 2001. № 18. P. 700–709.
14. Степанов В.А., Харьков В.Н., Пузырёв В.П. Эволюция и филогеография линий Y-хромосомы человека // *Вестник ВОГиС*. 2006. Т. 10. № 1. С. 57–73.
15. Степанов В.А. Этногеномика населения Северной Евразии. Томск: Печатная мануфактура, 2002. 244 с.
16. Derenko M., Malyarchuk B., Denisova G. et al. Contrasting patterns of Y-chromosome variation in South Siberian population from Baikal and Altai-Sayan regions // *Hum. Genet.* 2006. V. 118. P. 591–604.
17. Харьков В.Н., Степанов В.А., Медведева О.Ф. и др. Различия структуры генофондов северных и южных алтайцев по гаплогруппам Y-хромосомы // *Генетика*. 2007. Т. 43, № 5. С. 675–687.
18. Харьков В.Н., Медведева О.Ф., Лузина Ф.А. и др. Сравнительная характеристика генофонда телеутов по данным маркеров Y-хромосомы // *Генетика*. 2009. Т. 45, № 8. С. 1132–1142.
19. Харьков В.Н., Степанов В.А., Медведева О.Ф. и др. Происхождение якутов: анализ гаплотипов Y-хромосомы // *Молекулярная биология*. 2008. Т. 42, № 2. С. 226–237.
20. Underhill P.A., Myres N.M., Rootsi S. et al. Separating the post-Glacial coancestry of European and Asian Y chromosomes within haplogroup R1a // *Eur. J. Hum. Genet.* 2010. V. 18. P. 479–484.

КОРРЕЛЯЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА В ПОПУЛЯЦИЯХ ЧЕЛОВЕКА С КЛИМАТИЧЕСКИМИ И ГЕОГРАФИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ

А.А. Чередниченко¹, Е.А. Трифонова^{1,2}, К.В. Вагайцева^{1,2}, А.В. Бочарова¹, В.А. Степанов^{1,2}

¹ НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

Предковые популяции современного человека, обитающие в Африке, находились под давлением долговременной инфекционной нагрузки с преобладанием паразитарных инфекций [1]. Th2-тип иммунного ответа выступает защитным фактором в отношении паразитарных болезней, что в силу направленного действия отбора могло привести к увеличению частот полиморфных вариантов генов, задействованных в данном типе ответа. В процессе расселения человека в регионы умеренного и арктического климата с другим инфекционным фоном, возможно, происходило снижение селективной значимости полиморфных вариантов генов, ассоциированных с Th2-типом, вследствие сдвига иммунного ответа в направлении дифференцировки Th-лимфоцитов, регулирующих иммунные реакции против вирусных инфекций [2]. Поскольку иммунный ответ вовлечен в процесс развития иммунозависимых заболеваний, данный сдвиг баланса мог способствовать распространению аутоиммунных и иммунозависимых болезней в популяциях, расселившихся в зонах умеренного и арктического климата. Так, выявлено, что частота встречаемости аллергических заболеваний у афроамериканцев выше по отношению как к белым американцам, так и к африканским популяциям, предковым по отношению к афроамериканцам [3–5]. Для проверки гипотезы о влиянии сдвига баланса иммунного ответа на частоты аллелей генов иммунного ответа в настоящей работе было исследовано распределение частот аллелей 27 полиморфных вариантов генов иммунного ответа в 57 популяциях, проанализирована взаимосвязь этого распределения с климатогеографическими параметрами.

Материал и методы

В исследование включены 26 популяционных групп (русские, коми, марийцы, якуты, кеты, казахи, узбеки, алтайцы южные, буряты, ханты, киргизы, цезы, тувинцы, гагаузы, хакасы, шорцы, чукчи, нивхи, коряки, удэгейцы, агулы, бежтинцы, украинцы, молдаване, алтайцы северные, эвенки). В выборки включены неродственные и неметисированные индивиды, общая численность выборки составила 1 228 человек. В работе также использованы данные по 31 популяционной группе, полученные из проектов HarMap, 1000 Genomes, HGDP [6–8]. Прогенотипировано 27 полиморфных вариантов генов, ассоциированных с аллергическими, аутоиммунными заболеваниями, регуляцией уровня IgE и цитокинов. Генотипирование проводили на масс-спектрометре MassARRAY Analyzer 4 (Sequenom, США) [9, 10].

Тест на соответствие распределения генотипов равновесию Харди–Вайнберга, тест Юинса–Ватерсона рассчитывали с помощью пакета программ Arlequin 3.11 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>) [11]. Анализ корреляций по Спирмену и анализ частот аллелей методом главных компонент проводили в программном пакете Statistica 7.0. Климатические показатели (среднегодовая температура, средняя

температура наиболее теплого и холодного месяцев, разброс средних температур, среднегодовой уровень осадков, средняя относительная влажность) получали из базы данных Weatherbase (<http://www.weatherbase.com>). В качестве географических показателей использовали широту от экватора и долготу от Гринвича.

Результаты и обсуждение

Частоты аллелей и генотипов исследованных 27 маркеров демонстрируют широкую вариабельность в изученных популяциях. Отклонение распределения генотипов от равновесия Харди–Вайнберга с $p < 0,05$ обнаружено в 28 случаях из 702 распределений, что не превышает ожидаемого числа случайных отклонений от равновесия. Не выявлено накопления отклонений от равновесия Харди–Вайнберга по отдельным популяциям и полиморфным вариантам исследуемых генов. Из 27 исследованных маркеров 8 показали накопление отклонений гомозиготности популяции от ожидаемой при условии селективной нейтральности в большой группе популяций. В табл. 1 показаны уровни значимости теста Юинса–Ватерсона для наиболее отклоняющихся от гипотезы селективной нейтральности маркеров изученных генов. Для других полиморфных вариантов отклонение от нейтральности выявлено лишь в отдельных популяциях (до 11 популяций).

В табл. 2 показаны уровни значимости коэффициента корреляции Спирмена между частотами предковых аллелей изученных генов и климатогеографическими факторами. Со всеми исследованными климатическими и географическими параметрами выявлена корреляция для локуса rs907092 гена *IKZF3*. Для полиморфных вариантов rs3890745, rs485499, rs4986790 выявлена корреляция только с географическими факторами (абсолютной широтой и (или) долготой).

При анализе корреляции средней ожидаемой гетерозиготности по 27 локусам с климатическими и географическими переменными выявлена значимая связь с широтой от экватора, температурой наиболее холодного месяца, разбросом средних температур и со среднегодовым уровнем осадков, где уровень значимости коэффициента корреляции Спирмена составил 0,0082; 0,0038; 0,0001; 0,0004. Значение гетерозиготности по 27 локусам возрастает от экватора к полюсам, с увеличением разброса средних температур и уменьшается с увеличением температуры наиболее холодного месяца и среднегодового уровня осадков в исследованных популяциях (рис. 1).

Согласно методу главных компонент (PC) популяционные группы, проживающие в регионах с умеренным и арктическим климатом, по оси PC2 характеризуются положительными значениями, африканские популяции (пигмеи Биака, масаи, манденка, лухья, йоруба) в пространстве PC1–PC2 располагаются обособленно, в меньшей степени наблюдается кластеризация жителей Америки и Океании. Две

первые главные компоненты объясняют 54,43% общей изменчивости (рис. 2). Можно выделить кластеры коренного населения Африки, Океании, Азии и Евро-

пы. В целом расположение исследованных популяций в пространстве двух первых главных компонент отражает географическое положение популяций.

Таблица 1

Отклонение от селективной нейтральности маркеров генов иммунного ответа в популяциях

| Популяция | Маркер | | | | | | | |
|--------------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|
| | rs1042713 | rs11150610 | rs2070874 | rs2305480 | rs2546890 | rs3890745 | rs907092 | rs9303277 |
| Русские | 0,1351 | 0,0944 | 0,1482 | 0,0460* | 0,0282* | 0,0918 | 0,0349* | 0,0195* |
| Коми | 0,1975 | 0,1096 | 0,2615 | 0,0040* | 0,0325* | 0,0815 | 0,0042* | 0,0140* |
| Марийцы | 0,0725 | 0,0934 | 0,0879 | 0,0210* | 0,0734 | 0,0306* | 0,0039* | 0,0110* |
| Якуты | 0,1266 | 0,2144 | 0,0809 | 0,0149* | 0,1823 | 0,0958 | 0,0568 | 0,0566 |
| Кеты | 0,0273* | 0,2397 | 0,0454* | 0,0622 | 0,0140* | 0,0540 | 0,0799 | 0,2066 |
| Казахи | 0,0318* | 0,0225* | 0,0128* | 0,0249* | 0,0802 | 0,0710 | 0,0447* | 0,0247* |
| Узбеки | 0,1008 | 0,0453* | 0,0952 | 0,0404* | 0,0041* | 0,0429* | 0,0331* | 0,0170* |
| Алтайцы юж. | 0,2028 | 0,1544 | 0,0131* | 0,0191* | 0,0571 | 0,0372* | 0,0210* | 0,0698 |
| Буряты | 0,0194* | 0,0773 | 0,0193* | 0,0482* | 0,0215* | 0,0507 | 0,0122* | 0,0591 |
| Ханты | 0,1018 | 0,0126* | 0,2020 | 0,0137* | 0,0551 | 0,1879 | 0,0587 | 0,0712 |
| Киргизы | 0,0150* | 0,0556 | 0,0396* | 0,0626 | 0,0041* | 0,0345* | 0,0127* | 0,0206* |
| Цезы | 0,1451 | 0,2255 | 0,6914 | 0,0696 | 0,1037 | 0,1480 | 0,1376 | 0,0135* |
| Тувинцы | 0,1882 | 0,2195 | 0,0429* | 0,0458* | 0,0826 | 0,0845 | 0,1069 | 0,1225 |
| Гагаузы | 0,1330 | 0,0140* | 0,3203 | 0,1216 | 0,0605 | 0,3528 | 0,1080 | 0,0973 |
| Хакасы | 0,1174 | 0,1754 | 0,0284* | 0,0625 | 0,0815 | 0,0610 | 0,0540 | 0,0846 |
| Шорцы | 0,0504 | 0,0342* | 0,0320* | 0,0514 | 0,0493* | 0,0496* | 0,0212* | 0,0349* |
| Чукчи | 0,0185* | 0,1128 | 0,2591 | 0,0124* | 0,0044* | 0,1859 | 0,0187* | 0,0118* |
| Нивхи | 0,0671 | 0,0143* | 0,0234* | 0,0734 | 0,1623 | 0,0316* | 0,0616 | 0,0574 |
| Коряки | 0,1128 | 0,1392 | 0,3526 | 0,0924 | 0,1495 | 0,3535 | 0,1149 | 0,1197 |
| Удэгейцы | 0,1025 | 0,2820 | 0,1856 | 0,0705 | 0,0950 | 0,0342* | 0,0454* | 0,0242* |
| Агульцы | 0,0661 | 0,0306* | 0,3749 | 0,0435* | 0,0584 | 0,1159 | 0,0446* | 0,0113* |
| Бежтинцы | 0,1999 | 0,1620 | 0,4419 | 0,1210 | 0,1912 | 0,0690 | 0,1734 | 0,0737 |
| Украинцы | 0,1887 | 0,1636 | 0,2627 | 0,0233* | 0,1049 | 0,1640 | 0,0244* | 0,0653 |
| Молдаване | 0,0279* | 0,1451 | 0,2747 | 0,0062* | 0,0815 | 0,1152 | 0,0170* | 0,0469* |
| Алтайцы сев. | 0,1380 | 0,1457 | 0,0275* | 0,0055* | 0,1291 | 0,0221* | 0,2279 | 0,1709 |
| Эвенки | 0,1340 | 0,1561 | 0,0649 | 0,0362* | 0,0225* | 0,0436* | 0,1516 | 0,1099 |
| Китайцы | 0,0359* | 0,2038 | 0,1891 | 0,0942 | 0,0207* | 0,0048* | 0,0898 | 0,0718 |
| Финны | 0,0696 | 0,1378 | 0,1184 | 0,0051* | 0,0739 | 0,1461 | 0,0161* | 0,0498* |
| Британцы | 0,0522 | 0,0543 | 0,3553 | 0,0105* | 0,0269* | 0,1173 | 0,0015* | 0,0368* |
| Японцы | 0,0406* | 0,1693 | 0,1498 | 0,1289 | 0,0319* | 0,0331* | 0,0653 | 0,0615 |
| Лухья | 0,0051* | 0,4759 | 0,0598 | 0,4337 | 0,1461 | 0,0796 | 0,3761 | 0,1253 |
| Тосканцы | 0,1090 | 0,0492* | 0,3329 | 0,0309* | 0,0656 | 0,1571 | 0,0461* | 0,0056* |
| Йоруба | 0,0220* | 0,5948 | 0,0055* | 0,4851 | 0,1442 | 0,0583 | 0,4677 | 0,0493* |
| Масаи | 0,0287* | 0,2388 | 0,1062 | 0,2921 | 0,0874 | 0,0651 | 0,3720 | 0,0584 |
| Индийцы | 0,0460* | 0,2972 | 0,3673 | 0,1277 | 0,0639 | 0,0768 | 0,1242 | 0,0962 |
| Белуджи | 0,0658 | 0,1961 | 0,2755 | 0,1377 | 0,2215 | 0,2429 | 0,1237 | 0,0628 |
| Бедуины | 0,1065 | 0,0769 | 0,2816 | 0,1621 | 0,1017 | 0,1111 | 0,2209 | 0,0622 |
| Пигмеи Биака | 0,1460 | 1,0000 | 0,2651 | 0,2348 | 0,1532 | 0,1008 | 0,4632 | 0,2105 |
| Брахуи | 0,1592 | 0,0267* | 0,4246 | 0,0632 | 0,2415 | 0,0805 | 0,0621 | 0,0449* |
| Бурушо | 0,0231* | 0,0651 | 0,3448 | 0,0971 | 0,1428 | 0,1565 | 0,1163 | 0,1209 |
| Друзы | 0,0461* | 0,1202 | 0,3902 | 0,1058 | 0,0210* | 0,1114 | 0,1363 | 0,0950 |
| Французы | 0,0826 | 0,0243* | 0,4864 | 0,0073* | 0,1126 | 0,2361 | 0,0068* | 0,0569 |
| Баски | 0,1041 | 0,0081* | 0,4600 | 0,0243* | 0,0663 | 0,1662 | 0,0292* | 0,0480* |
| Хазарейцы | 0,1272 | 0,0866 | 0,0652 | 0,0080* | 0,0468* | 0,1622 | 0,0689 | 0,0088* |
| Калашы | 0,0427* | 0,2951 | 0,5154 | 0,0463* | 0,4224 | 0,1541 | 0,0991 | 0,0990 |
| Каритиана | 0,3091 | 0,4616 | 0,1082 | 0,3104 | 0,5701 | 0,4241 | 0,1379 | 0,1501 |
| Манденка | 0,0500 | 0,3747 | 0,0290* | 0,6551 | 0,1258 | 0,0489* | 0,4568 | 0,0118* |
| Майя | 0,0096* | 0,1554 | 0,2669 | 0,2021 | 0,2464 | 0,0610 | 0,2003 | 0,1942 |
| Мозабиты | 0,1612 | 0,0214* | 0,3854 | 0,2619 | 0,1128 | 0,1415 | 0,2384 | 0,1024 |
| Меланезийцы | 0,6386 | 0,2617 | 0,0099* | 0,2271 | 0,0127* | 0,2628 | 0,2276 | 0,1418 |
| Палестинцы | 0,0269* | 0,0585 | 0,4388 | 0,1622 | 0,0332* | 0,1594 | 0,1836 | 0,0888 |
| Папуасы | 0,3418 | 0,4595 | 0,1643 | 0,4002 | 0,3013 | 0,6208 | 0,4070 | 0,2320 |
| Патаны | 0,0714 | 0,2494 | 0,3679 | 0,0668 | 0,1538 | 0,0702 | 0,0450* | 0,1304 |
| Пима | 0,1981 | 0,1190 | 0,0290* | 0,0809 | 0,1308 | 0,0821 | 0,0829 | 0,0802 |
| Сардинцы | 0,1973 | 0,1593 | 0,5989 | 0,1162 | 0,1340 | 0,2597 | 0,1159 | 0,1014 |
| Синдхи | 0,0623 | 0,1999 | 0,4697 | 0,1170 | 0,1445 | 0,0620 | 0,1218 | 0,0829 |
| Суруи | 0,3470 | 1,0000 | 0,4962 | 0,1475 | 1,0000 | 0,1504 | 0,1497 | 0,1458 |

Примечание. Уровень значимости теста Юинса–Ваттерсона: * – $p < 0,05$.

Таблица 2

Корреляция частот аллелей исследованных генов иммунного ответа и средней ожидаемой гетерозиготности с климатическими и географическими переменными

| Аллель | Широта от экватора | Долгота от Гринвича | Среднегодовая температура | Температура наиболее холодного месяца | Температура наиболее теплого месяца | Разброс температур | Среднегодовой уровень осадков | Средняя относительная влажность |
|------------|--------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| rs1042713 | 0,0009* | 0,0303** | 0,0096** | 0,0032** | 0,0253** | 0,0165** | 0,2285 | 0,7088 |
| rs11150610 | 0,0000* | 0,0193** | 0,0000* | 0,0000* | 0,0417** | 0,0000* | 0,0010* | 0,5862 |
| rs13277113 | 0,3236 | 0,0000* | 0,0369** | 0,0245** | 0,3433 | 0,0156** | 0,6334 | 0,0777 |
| rs1335532 | 0,8875 | 0,0000* | 0,0987 | 0,0944 | 0,7692 | 0,0053** | 0,9209 | 0,5603 |
| rs1800896 | 0,7091 | 0,0000* | 0,7656 | 0,2842 | 0,3420 | 0,0215** | 0,5455 | 0,9190 |
| rs1801275 | 0,0004* | 0,3301 | 0,0011** | 0,0007* | 0,0314** | 0,0025** | 0,4183 | 0,0071** |
| rs1805015 | 0,0030** | 0,0000* | 0,0002* | 0,0001* | 0,0142** | 0,0002* | 0,6011 | 0,0046** |
| rs1837253 | 0,1601 | 0,0009* | 0,0270** | 0,0049** | 0,1927 | 0,0039** | 0,4867 | 0,7345 |
| rs20541 | 0,1480 | 0,0000* | 0,0929 | 0,0592 | 0,3866 | 0,0079** | 0,6461 | 0,1135 |
| rs2056626 | 0,1605 | 0,0002* | 0,2805 | 0,3916 | 0,5810 | 0,8503 | 0,0126** | 0,4769 |
| rs2070874 | 0,2199 | 0,0000* | 0,0279** | 0,0213** | 0,3876 | 0,0006* | 0,4708 | 0,1564 |
| rs2305480 | 0,0000* | 0,1035 | 0,0000* | 0,0000* | 0,0000* | 0,0031** | 0,0001* | 0,0316** |
| rs231735 | 0,0000* | 0,0242** | 0,0000* | 0,0000* | 0,0000* | 0,0000* | 0,7200 | 0,0072** |
| rs2476601 | 0,0001* | 0,0067** | 0,0058** | 0,0066** | 0,0044** | 0,0799 | 0,7075 | 0,0879 |
| rs2546890 | 0,3415 | 0,0535 | 0,6180 | 0,8592 | 0,3591 | 0,5023 | 0,0163** | 0,0738 |
| rs2736340 | 0,2532 | 0,0000* | 0,0372** | 0,0212** | 0,3778 | 0,0081** | 0,7478 | 0,0738 |
| rs324015 | 0,0015** | 0,0000* | 0,0056** | 0,0002* | 0,1663 | 0,0000* | 0,1725 | 0,4587 |
| rs3790567 | 0,0001* | 0,0228** | 0,0004** | 0,0003* | 0,0136** | 0,0024** | 0,4040 | 0,0660 |
| rs3821236 | 0,6947 | 0,0000* | 0,0675 | 0,0656 | 0,4270 | 0,0227** | 0,4531 | 0,1192 |
| rs3890745 | 0,5030 | 0,0000* | 0,9731 | 0,8566 | 0,8587 | 0,5561 | 0,4749 | 0,4475 |
| rs485499 | 0,0221** | 0,0000* | 0,1752 | 0,2005 | 0,0753 | 0,9160 | 0,4670 | 0,4565 |
| rs4986790 | 0,9052 | 0,0000* | 0,2375 | 0,3224 | 0,6232 | 0,3933 | 0,1406 | 0,1643 |
| rs6441286 | 0,0000* | 0,0021** | 0,0000* | 0,0000* | 0,0064** | 0,0000* | 0,1799 | 0,3456 |
| rs7574865 | 0,5026 | 0,0000* | 0,0460** | 0,0290** | 0,3692 | 0,0311** | 0,6392 | 0,2003 |
| rs907092 | 0,0000* | 0,0215** | 0,0000* | 0,0000* | 0,0006* | 0,0000* | 0,0215** | 0,0451** |
| rs9303277 | 0,1160 | 0,4035 | 0,0034** | 0,0385** | 0,0019** | 0,1327 | 0,2685 | 0,0074** |
| rs9888739 | 0,0016** | 0,0000* | 0,0005* | 0,0001* | 0,0894 | 0,0000* | 0,8094 | 0,0603 |
| He 27 | 0,0082** | 0,0660 | 0,0701 | 0,0038** | 0,7820 | 0,0001* | 0,0004* | 0,0875 |

Примечание. Уровень значимости коэффициента корреляции Спирмена; значимые корреляции: ** – $p < 0,05$, * – $p < 0,001$; He 27 – средняя ожидаемая гетерозиготность по 27 локусам.

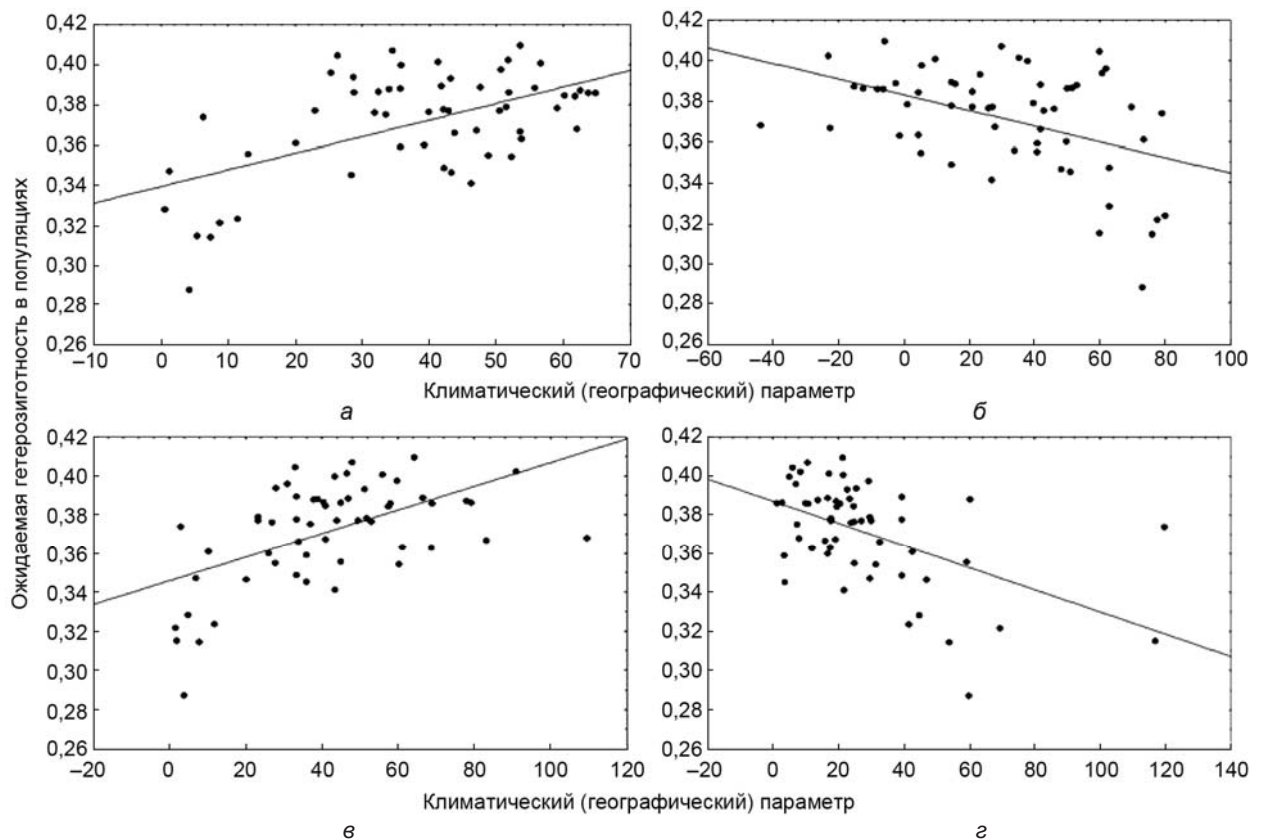


Рис. 1. Связь средней ожидаемой гетерозиготности с климатогеографическими факторами: а – корреляция с широтой от экватора; б – корреляция с температурой наиболее холодного месяца; в – корреляция с разбросом средних температур; г – корреляция со среднегодовым уровнем осадков

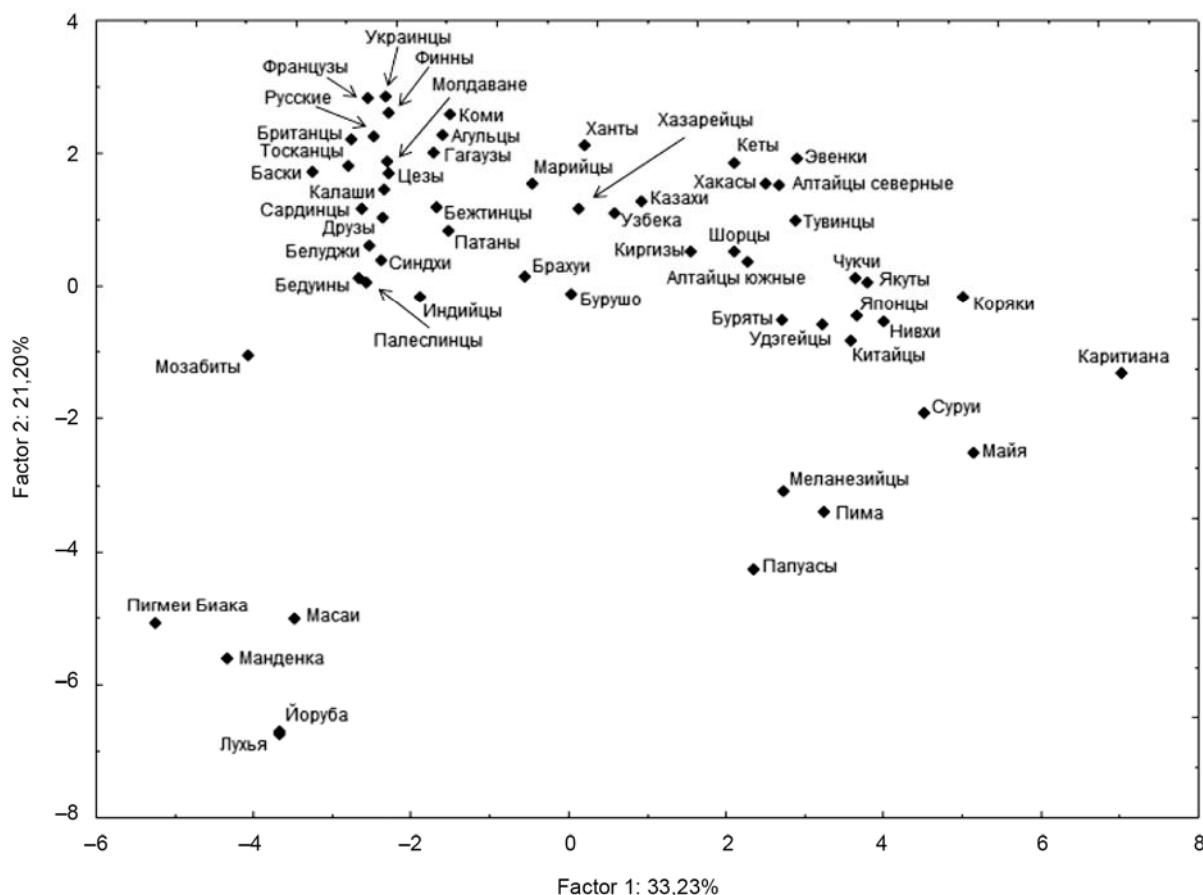


Рис. 2. Расположение популяционных групп по частотам предковых аллелей в пространстве главных компонент

В данной работе проанализирована вариабельность 27 полиморфных вариантов генов иммунного ответа в 57 мировых популяциях и взаимосвязь этого распределения с климатогеографическими параметрами. Маркеры генов были выбраны исходя из их ассоциации с аутоиммунными и аллергическими заболеваниями и связанными с ними эндотипами. Показано, что часть генетической вариабельности изученной системы маркеров значимо коррелирует с ключевыми показателями климата, характеризуется накоплением в популяциях сигналов естественного отбора. Изменение уровня генетического разнообразия и частоты аллелей исследованных маркеров может быть опосредовано сдвигом баланса типов иммунного ответа в ходе расселения человека.

Литература

1. Mendelson M., Han P.V., Vincent P. et al. Regional variation in travel-related illness acquired in Africa, March 1997–May 2011 // *Emerg. Infect. Dis.* 2014. V. 20, № 4. P. 532–541.
2. Le Souef P.N., Goldblatt J., Lynch N.R. Evolutionary adaptation of inflammatory immune responses in human beings // *Lancet.* 2000. V. 356, № 9225. P. 242–244.
3. Crater D.D., Heise S., Perzanowski M. et al. Asthma hospitalization trends in Charleston, South Carolina, 1956 to 1997: twenty-fold increase among black children during a 30-year period // *Pediatrics.* 2001. V. 108, № 6. P. E97.
4. Silvers S.K., Lang D.M. Asthma in African Americans: what can we do about the higher rates of disease? // *Cleve. Clin. J. Med.* 2012. V. 79, № 3. P. 193–201.
5. Lester L.A., Rich S.S., Blumenthal M.N. et al. Ethnic differences in asthma and associated phenotypes: collaborative study on the genetics of asthma // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001. V. 108, № 3. P. 357–362.
6. Frazer K.A., Ballinger D.G., Cox D.R. et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs // *Nature.* 2007. V. 449, № 7164. P. 851–861.
7. Abecasis G.R., Altshuler D., Auton A. et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing // *Nature.* 2010. V. 467, № 7319. P. 1061–1073.
8. Cann H.M., de Toma C., Cazes L. et al. A human genome diversity cell line panel // *Science.* 2002. V. 296, № 5566. P. 261–262.
9. Степанов В.А., Трифонова Е.А. Мультиплексное генотипирование однонуклеотидных полиморфных маркеров методом масс-спектрометрии MALDI-TOF: частоты 56 SNP в генах иммунного ответа в популяциях человека // *Молекул. биология.* 2013. Т. 47, № 6. С. 976–986.
10. Степанов В.А., Трифонова Е.А., Симонова К.В. и др. Вариабельность генов интерлейкина 4 и его рецептора в популяциях коренных народов Сибири // *Мед. генетика.* 2013. Т. 12, № 4. С. 38–40.
11. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis // *Evol. Bioinform. Online.* 2007. V. 1. P. 47–50.

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ В ИЗУЧЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ ЕВРАЗИИ

С.С. Литвинов^{1, 2, 3}, Н.В. Трофимова¹, Б.Б. Юнусбаев^{1, 3}, Р.И. Хусаинова^{1, 2}, В.Л. Ахметова¹,
И.М. Хидиятова¹, Р. Виллемс³, Э.К. Хуснутдинова^{1, 2}

¹ *Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа*

² *Башкирский государственный университет, г. Уфа*

³ *Эстонский биоцентр, Тартуский университет, г. Тарту, Эстония*

Изучение полногеномных (genome-wide) аутомных данных на сегодняшний день наряду с использованием однородительских маркеров является одним из важнейших способов получения информации о генетической структуре народов мира. Был проведен анализ популяций Евразии (Волго-Уральского региона, Кавказа, Сибири, Центральной Азии) с использованием 650 тыс. аутомных SNP-маркеров на платформе Illumina. Были изучены как отдельные аутомные SNPs, так и гаплотипы, полученные на их основе. Обнаружено, что популяции Волго-Уральского региона группируются преимущественно вместе по данным как отдельных SNPs, так и гаплотипов. Исключением являются популяции мордвы и башкир, при этом мордва демонстрирует большую близость к популяциям Восточной Европы, в то время как башкиры генетически ближе к популяциям Сибири.

Анализ методом кластеризации на основе подходов Байеса в программе Admixture позволяет оценить долю различных генетических компонент в

популяции, что было использовано для сопоставления с результатами анализа гаплотипов в программе fineSTRUCTURE. Показано, что башкиры в целом демонстрируют повышенное содержание не только сибирского компонента, представленного в наибольшей степени у якутов, но и восточно-азиатского, характерного в первую очередь для китайцев. Сравнивая методы анализа, следует отметить, что при анализе гаплотипов более четко видна географическая подразделенность популяций Кавказа, которая в меньшей степени видна при анализе отдельных SNPs методом главных компонент. Популяция кубанских ногайцев при этом группируется с популяциями Центральной Азии, хотя при анализе общих гаплотипов обнаруживается сигнал, указывающий на наличие гаплотипов, общих у ногайцев и других популяций Кавказа. Таким образом, различные методы анализа полногеномных данных позволяют оценивать полученные результаты с разной стороны и получать более информативную картину относительно генетической структуры изученных популяций.

Раздел 3

ГЕНЕТИКА МНОГОФАКТОРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ И СЛОЖНОНАСЛЕДУЕМЫХ СОСТОЯНИЙ

АНАЛИЗ НЕСЛУЧАЙНОСТИ СОЧЕТАНИЯ ГЕНОТИПОВ ПО ПОЛИМОРФНЫМ ВАРИАНТАМ ГЕНОВ ПОДВЕРЖЕННОСТИ МНОГОФАКТОРНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ

Н.П. Бабушкина, А.Н. Кучер

НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

Ассоциативные исследования с использованием метода «случай – контроль», направленные на установление генетических основ формирования сложного наследуемых признаков, в том числе и заболеваний многофакторной природы, зачастую приводят к противоречивым результатам. Такая ситуация может быть следствием многих причин. Не последнее место среди них занимает факт нахождения в неравновесии по сцеплению маркеров, привлеченных для подобного рода анализа, с другими функционально значимыми нуклеотидными заменами, эффекты которых могут быть более выражены, чем эффекты изучаемых локусов. Исследования, касающиеся гаплотипспецифической регуляции функционирования конечного продукта гена, в настоящее время проводятся достаточно активно [1–6]. Однако немалую роль могут играть и мультилокусные индивидуальные генотипы по совокупности полиморфных вариантов, локализованных в несцепленных генах-кандидатах, продукты которых функционируют совместно.

Получение новой информации о гено-фенотипических отношениях, ассоциациях между сцепленными маркерами (как и между маркерами, локализованными в разных группах сцепления), а также об их вовлеченности в формирование патологии представляется перспективным в контексте генетической архитектуры многофакторных болезней. В исследовании D.R. Blair и соавт. [7] показано наличие неслучайных ассоциаций многофакторных и наследственных заболеваний у одних и тех же пациентов. Авторы данной публикации предлагают концепцию существования «менделевского кода» – ассоциации каждого многофакторного фенотипа с уникальным сочетанием менделевских болезней (локусов). Эта гипотеза фактически является логическим продолжением идеи синтропии, предложенной еще в 1920-х гг. (Pfaundler, Sent, 1921), современное определение которой сформулировано следующим образом: «Синтропия – это природно-видовое явление сочетания двух и более патологических состояний (нозологий или синдромов) у индивидуума и его ближайших родственников, неслучайное и имеющее эволюционно-генетическую основу» [8]. Набор генов, функционально взаимодействующих, корегулируемых и вовлеченных в общий для синтропии биохимический и физиологический путь, назван синтропными генами [8, 9]. К таким генам могут быть отнесены и генные кластеры – группы физически сцепленных генов, но в большей степени это относится к взаимодейст-

вующим генам, распределенным во всем пространстве генома человека. По сути, речь идет о блоках гаплотипов – хромосомных сегментах с дискретными границами, наследующихся консервативно [10].

Анализ генотипических комбинаций по полиморфным вариантам генов, локализованным в различных группах сцепления, может оказаться полезным в поиске биохимических путей, определяющих то или иное состояние организма. Целью настоящего исследования была оценка межгенных взаимодействий через выявление комбинаций генотипов, отличающихся от случайного распределения (находящихся в гаметическом неравновесии), при различных функциональных состояниях организма.

Материал и методы

Материал для исследования был взят из базы данных лаборатории популяционной генетики ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН (г. Томск). Для анализа использованы результаты генотипирования 27 полиморфных вариантов 17 генов: *ADRB2* (rs1042713, rs1042714), *NOS3* (rs2070744, rs61722009 (VNTR), rs1799983), *ACE* (rs4291, rs4343), *AGTR1* (rs5186, T-713G), *GNB3* (rs5442, rs5443), *PPP3R1* (rs11126176), *GATA4* (rs804271), *LTA* (rs909253), *TNF* (rs1800629), *TNFRSF1B* (rs1061622, rs5746026), *IL4* (rs2243291), *IL4R* (rs1801275, rs2074570), *IL12A* (rs568408), *IL12B* (rs3212227, rs3212220), *IL12RB1* (rs3746190, rs11575926), *IFNG* (rs2069705), *IFNGR2* (rs17880053). Всего были привлечены сведения о генотипах более 1 тыс. образцов ДНК. Использованы данные анализа четырех этнических групп: якуты (Я), тувинцы (Т), буряты (Б), в каждой выборке по 96 образцов ДНК – включены индивиды из соответствующих республик. Русские (около 900 образцов) представлены несколькими выборками, характеризующимися различными функциональными состояниями организма: больные ишемической болезнью сердца (ИБС) (141 человек), бронхиальной астмой (БА) (150), туберкулезом легких (ТБ) (140), вирусным гепатитом С (ВГС, VGC) (173), а также популяционная выборка г. Томска (96), выборки долгожителей (98) и спонтанно абортированных (СА) эмбрионов с нормальным кариотипом (96 эмбрионов).

Привлеченные к исследованию выборки различались по числу изученных маркеров: наиболее полно (по 27 вариантам) обследованы четыре популяционные выборки, для остальных групп число маркеров было несколько меньше. Поэтому для корректного анализа данных был сформулирован

следующий алгоритм исследования: неравновесие по сцеплению анализировали в трех блоках – в популяционных выборках (27 маркеров); в группах, относящихся к разным стадиям онтогенеза (19 маркеров); в норме и при патологиях (23 маркера). Популяционная выборка русских привлекалась к анализу каждого блока: в качестве этнической выборки – в популяционном исследовании, в качестве группы среднего возраста – в онтогенетическом блоке, в качестве контроля – при изучении патологий.

Неслучайность сочетания генотипов оценивали на основании величины неравновесия по сцеплению между парами локусов, расчет которого проводили с помощью теста отношения правдоподобия в пакете программ Arlequin [11]. Тест использует цепи Маркова; при анализе задавались такие параметры, как длина цепи (Chain length: 1000) и число шагов для определения случайного начального положения в цепи Маркова (Dememorization: 1000) [11]. Построение генных сетей и анализ возможных межгенных взаимодействий проводили с помощью онлайн-ресурса GeneMania [12].

Результаты и обсуждение

Были проведены расчеты неслучайности сочетания генотипов между привлеченными к исследованию полиморфными вариантами, локализованными в различных генах. В ряде случаев сочетания генотипов по различным полиморфным вариантам генов статистически значимо ($p < 0,05$) отличались от случайного (находились в гаметическом неравновесии). Наиболее широко были обследованы популяционные выборки, анализ неравновесия по сцеплению для них проведен по 27 маркерам. Из 351 возможного сочетания генотипов 84 (23,9%) находились в гаметическом неравновесии во всех обследованных популяциях; для 43 (12,3%) – неравновесие не зарегистрировано ни в одной популяционной выборке. Из остальных неслучайных комбинаций 93 определялись только для монголоидных популяций, по 30 сочетаниям гаметическое неравновесие наблюдалось только у русских, по 15 – только у тувинцев, по восьми – только у якутов и по шести – только у бурят (рис. 1).

Группы, привлеченные для анализа в «онтогенетическом» блоке, были охарактеризованы по 19 локусам. Из всех возможных сочетаний генотипов (171) в гаметическом неравновесии во всех группах находились 77 (45,0%), по 13 (7,6%) сочетаниям неравновесие не наблюдалось ни в одной из групп, 26 сочетаний встречались только в одной из групп: 13 – у абортусов, 5 – у долгожителей, 8 – в популяционной выборке (рис. 2).

Из 253 возможных сочетаний генотипов при исследовании патологических состояний (анализировали данные по 23 полиморфизмам) в неравновесии «по сцеплению» во всех группах оказались 127 (50,2%), не выявлено неравновесия ни в одной из исследованных групп только для одного (0,04%) сочетания генотипов. Восемь сочетаний генотипов можно рассматривать как уникальные, так как регистрировались лишь при одном из исследованных состояний: по одному при ишемической болезни сердца, бронхиальной астме, вирусном гепатите С, в популяционной выборке, а также 4 – при туберкулезе легких (рис. 3).

Анализируя данные, полученные при расчетах неравновесия по сцеплению в совокупности по трем блокам, можно заключить следующее: нахождение в гаметическом неравновесии полиморфных вариантов, расположенных в разных генах и на различных хромосомах, – это не частный случай, а, скорее, общее свойство совместно функционирующих генов. Несмотря на то что при детальном рассмотрении каждого блока настоящего исследования выявлялись некие специфические сочетания, наложение результатов выявило наличие только одного уникального сочетания генотипов, характерного лишь для группы с вирусным гепатитом С, и лишь одно сочетание, для которого гаметическое неравновесие не было установлено ни в одной группе (при условии наличия информации по сочетаниям более чем в половине обследованных индивидов).

Насколько полученные данные отражают действительный уровень гаметического неравновесия исследованных полиморфных вариантов? Из всех обследованных сочетаний генотипов 11 представляют собой внутригенные сочетания и одно – сочетание генотипов SNP двух кластерно расположенных генов. В популяционных выборках оценка уровня сцепления, проведенная по методу Хилла, по этим же данным, достаточно подробно описана ранее [13], что позволяет в настоящем исследовании провести сравнительный анализ не только между исследованными блоками, но и между методами оценки (табл. 1). Интересно, что из 12 возможных внутригенных сочетаний только для пяти выявляется сцепление обоими методами и во всех блоках анализа: по SNP в генах *ACE* (изучено только в популяциях), *IL12B*, *IL4RA* и в генах *LTA/TNF*, а также для сочетания rs2070744/VNTR в гене *NOS3*; и для одного внутригенного сочетания генотипов показатели неравновесия не достигали уровня статистической значимости (в гене *GNB3*, анализировали только в популяциях). Сцепление вариантов VNTR/rs1799983 в гене *NOS3* носит этноспецифический характер: у русских сцепление определяется во всех блоках анализа, в то время как в монголоидных популяциях – неравновесие по сцеплению не достигает статистически значимого уровня, причем при разных методах оценки (кроме выборки бурят, при оценке по Хиллу). В гене *TNFRSF1B* (анализировалось только в популяциях) неравновесие не регистрируется только в популяции бурят (при оценке по Хиллу); в гене *IL12RB1*, напротив, показатели неравновесия достигают значимого уровня только в популяциях бурят и русских (при оценке по Хиллу). Наибольшее число различий наблюдается по сочетаниям генотипов трех пар полиморфных вариантов: в гене *AGTR1* (не анализировали при патологиях) неравновесие определяется только в группе бурят (по Хиллу), в популяционной выборке русских и у спонтанных абортусов (в пакете программ Arlequin); по сочетанию rs2070744/rs1799983 в гене *NOS3* варианты находятся в неравновесии у русских и якутов (согласно оценке по Хиллу), у бурят, спонтанных абортусов, больных БА и ВГС (согласно расчетам по Arlequin); в гене *ADRB2* во всех исследованных популяциях сцепление есть при расчете по Хиллу, но не определяется при расчете в пакете программ Arlequin (при таком анализе неравновесие достигается в группе больных ТБ и на грани статистической значимости – у долгожителей) (табл. 1).

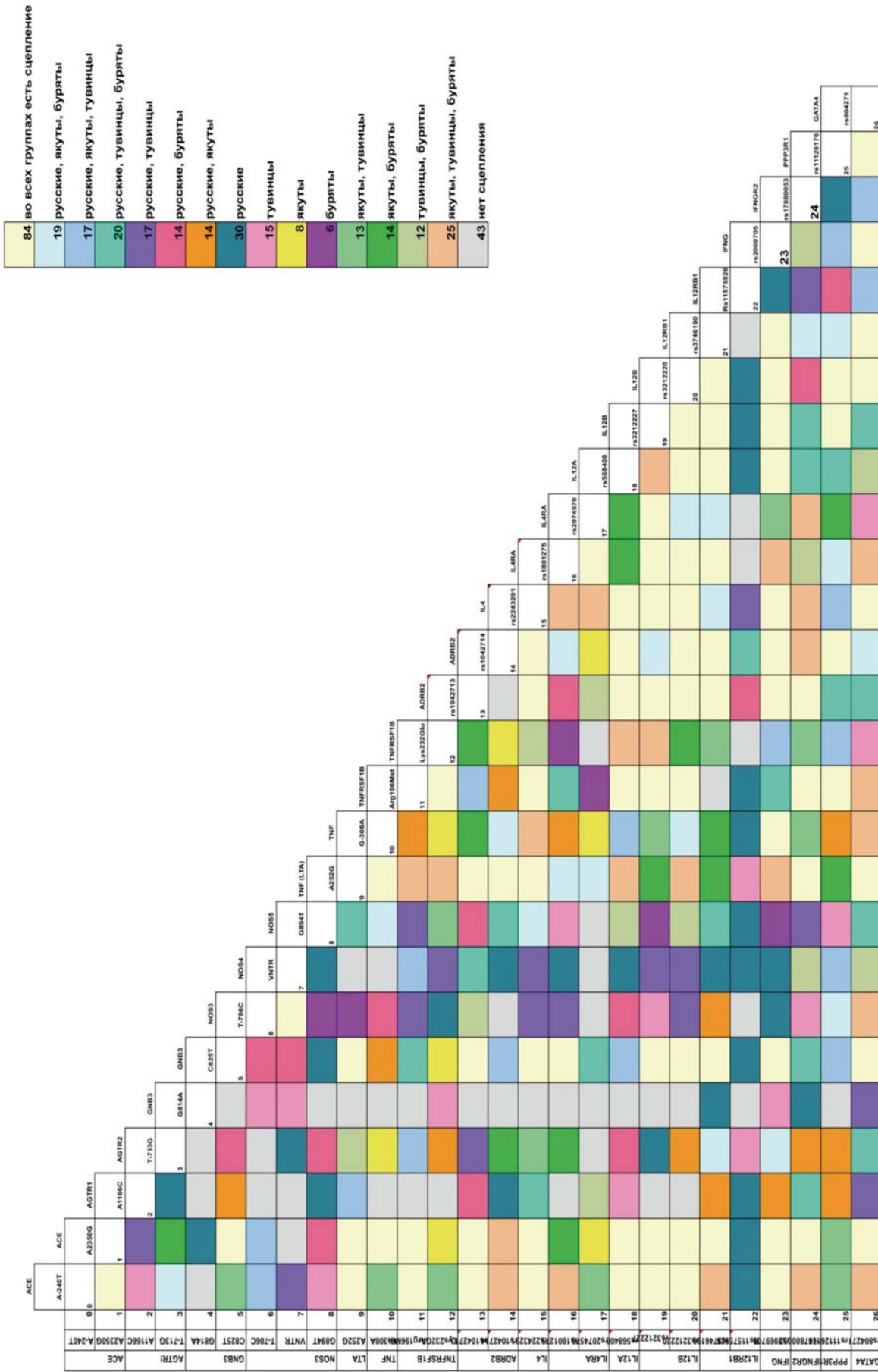


Рис. 1. Неслучайные сочетания генотипов в популяционных выборках

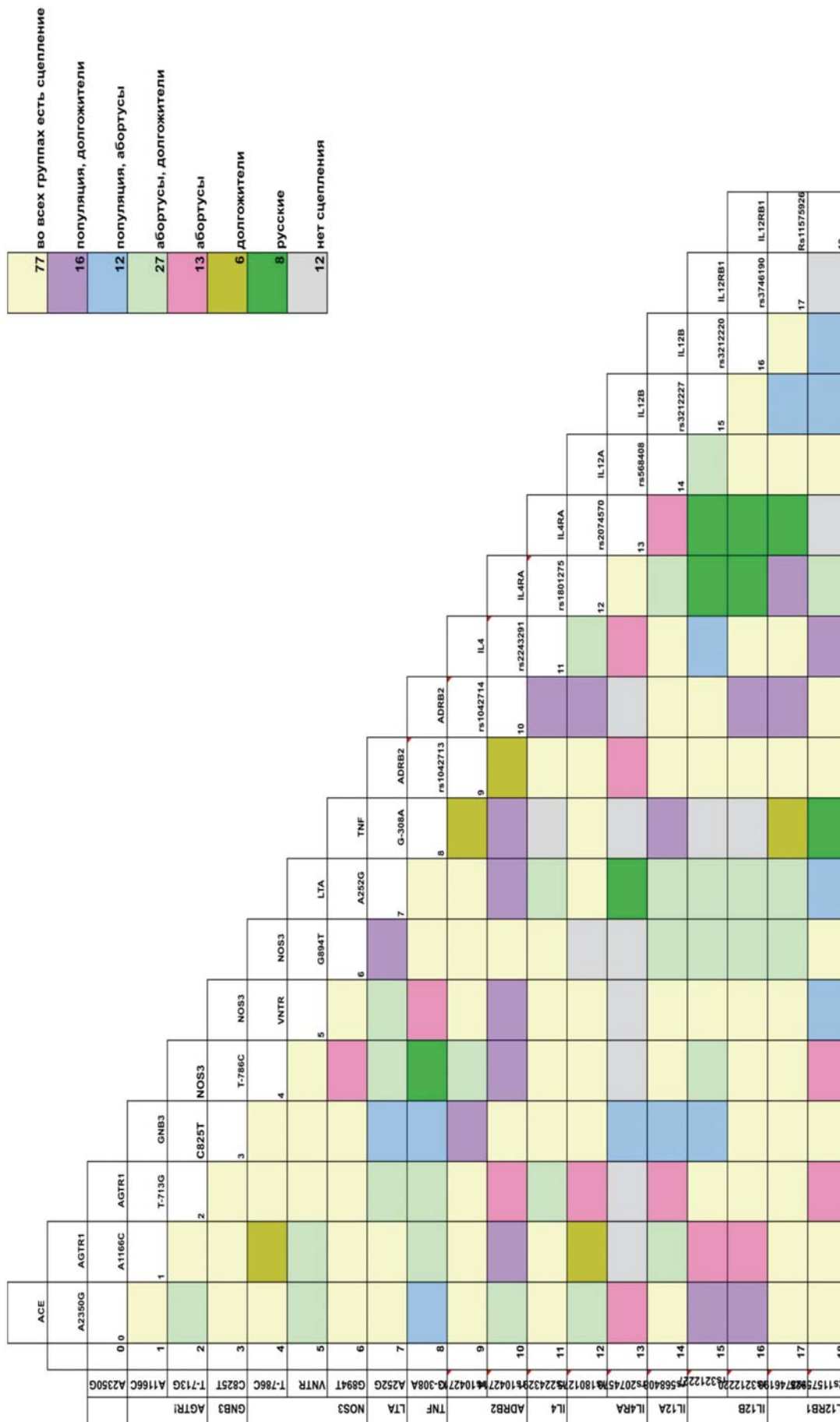


Рис. 2. Неслучайные сочетания гентипов в группах, находящихся на разных стадиях онтогенеза

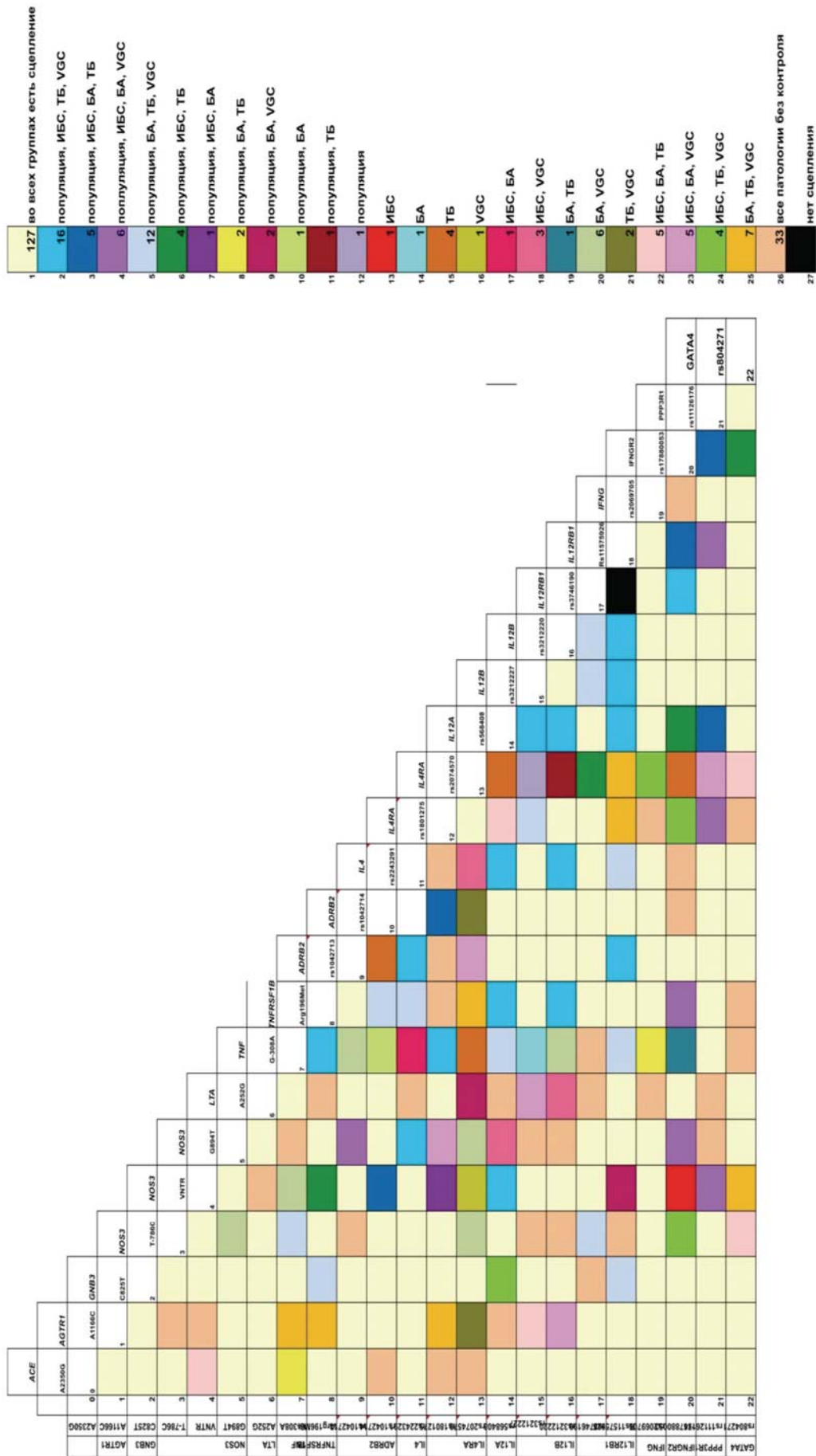


Рис. 3. Неслучайные сочетания генотипов в контроле и группах с разными патологиями (контроль – популяция)

Таблица 1

Уровень значимости оценки неравновесия по сцеплению сочетаний внутригенных SNP, полученные с использованием различных методов расчета в различных выборках

| Локус | SNPs | Оценка по методу Хилла [13] | | Оценка в пакете программ Arlequin | | | | | |
|------------------|------------------------|-----------------------------|---------|-----------------------------------|-----|-----------------|-------------|-----------------|---------|
| | | Популяции | | Этапы онтогенеза | | Патологии | | | |
| | | Группа | p | Группа | p | Группа | p | Группа | |
| <i>ADRB2</i> | rs1042713 / rs1042714 | <0,001 | Все | 0,18866–0,80254 | | 0,04985–0,87586 | Долгожители | 0,00000–1,00000 | ТБ |
| <i>NOS3</i> | rs2070744 / VNTR | <0,001 | Все | <0,00000 | Все | <0,00000 | Все | <0,00000 | Все |
| | rs2070744 / rs1799983 | 0,001–0,05 | Р, Я | 0,03519–1,00000 | Б | 0,04203–0,43206 | СА | 0,00000–0,99902 | БА, ВГС |
| | VNTR / rs1799983 | 0,001–0,05 | Р, Б | 0,00000–0,32845 | Р | <0,00000 | Все | <0,00000 | Все |
| <i>ACE</i> | rs4291 / rs4343 | <0,001 | Все | <0,00000 | Все | – | – | – | – |
| <i>AGTR1</i> | rs5186 / T/713G | 0,001–0,05 | Б | 0,00000–0,38612 | Р | 0,00000–0,08113 | Сред., СА | – | – |
| <i>GNB3</i> | rs5442 / rs5443 | <0,05 | | 0,12708–1,00000 | – | – | – | – | – |
| <i>IL4RA</i> | rs1801275 / rs2074570 | <0,001 | Все | <0,00000 | Все | <0,00000 | Все | <0,00000 | все |
| <i>IL12B</i> | rs3212227 / rs3212220 | <0,001 | Все | <0,00000 | Все | <0,00000 | Все | <0,00000 | все |
| <i>IL12RB1</i> | rs3746190 / rs11575926 | 0,001–0,05 | Р, Б | 0,584556–1,00000 | Все | 0,59433–0,83969 | Все | 0,17107–0,82796 | все |
| <i>TNFRSF1B</i> | rs1061622 / rs5746026 | 0,001–0,05 | Р, Т, Я | <0,00000 | Все | – | – | – | – |
| <i>TNFB/TNFA</i> | rs909253 / rs1800629 | 0,001–0,01 | Все | <0,00000 | Все | <0,00000 | Все | <0,00000 | все |

Примечание. Р – русские, Т – тувинцы, Б – буряты, Я – якуты, Сред. – популяционная выборка (средний возраст), СА – спонтанные абортусы.

Таким образом, из вышесказанного можно заключить, что, поскольку при использованном в настоящем исследовании подходе получены данные, имеющие в целом ту же тенденцию, что и при классических подходах (и полностью, но с более высоким уровнем значимости, совпадающие в случае тесно сцепленных полиморфных вариантов), то показатели гаметического неравновесия для остальных локусов также с высокой долей вероятности должны отражать неслучайность сочетаний. На настоящий момент нельзя однозначно объяснить причины «сцепления» полиморфных вариантов генов, локализованных в разных регионах хромосом. Такая ситуация может быть следствием как случайных событий, так и отражать сформированные коадаптированные комплексы генов.

Два момента могут указывать на то, что выявленные в разных группах варианты «сцепления» между SNP, локализованными на разных хромосомах, могут являться случайными событиями. Во-первых, в пользу «случайности» может говорить тот факт, что зарегистрированные пары SNP, находящиеся в гаметическом неравновесии, не универсальны для всех изученных этнических групп. В то же время следует отметить, что в ряде случаев в неслучайную комбинаторику генотипов у представителей нескольких групп были вовлечены разные полиморфные варианты одних и тех же генов. Во-вторых, некоторые из полиморфных вариантов, для которых показано «сцепление», не находились в состоянии равновесия Харди–Вайнберга [14–16], а использованный в пакете программ Arlequin алгоритм для расчета неравновесия по сцеплению чувствителен к такому отклонению (могут быть ложноположительные результаты). В то же время неравновесие неоднократно регистрировалось по одним и тем же SNP как для группы, где по одному

из полиморфных вариантов имело место отклонение от равновесия Харди–Вайнберга, а в другой выборке по обоим локусам наблюдалось соответствие наблюдаемого распределения генотипов теоретически ожидаемому.

В поддержку предположения о возможной функциональной значимости выявленных отклонений от случайных генотипических комбинаций по полиморфным вариантам, локализованным в разных хромосомах, также можно привести ряд аргументов. Так, для ряда продуктов генов (для которых установлено неравновесие между локализованными в них SNP) установлены, во-первых, непосредственные взаимодействия (например, между продуктами генов *AGTR1* и *NOS3* [17]); во-вторых, включенность в одни и те же метаболические пути (например, продукты генов *IL4R*, *IL12A*, *IL12B*, *TNFRSF1B* вовлечены в

цитокин – цитокин-рецепторные взаимодействия, *IL4R* и *TNFRSF1B* – в метаболический путь воспалительного ответа (по KEGG [18])). Кроме того, изученные гены характеризуются выраженным плейотропным эффектом, многие локализованные в них полиморфные варианты обладают функциональной значимостью, и как для генов, так и для полиморфных вариантов установлены ассоциации с различными многофакторными заболеваниями, а в ряде случаев локализованные в них SNP, ассоциированные с патологиями, рассматриваются в качестве причинных по отношению к соответствующим заболеваниям.

Для проверки гипотезы вовлеченности продуктов генов, SNP в которых находятся в гаметическом неравновесии, в одни и те же биохимические пути условия анализа полученных данных были ужесточены: были отобраны пары находящихся в неравновесии сочетаний генотипов с уровнем значимости

$p = 0,00000$; из них выбраны те пары, показатель неравновесия по сцеплению D' которых превышал значение 0,5. Вышеперечисленным условиям хотя бы в одной из проанализированных в третьем блоке исследования групп удовлетворяли 46 сочетаний, из них одно – внутригенное (*ADRB2* в группе больных с туберкулезом легких). Поскольку использовавшийся для дальнейшего анализа ресурс GeneMania работает не с отдельными полиморфными вариантами, а с генами, то анализ взаимодействий был проведен для 37 пар генов. Оказалось, что продукты 54% пар генов напрямую участвуют в одних биохимических путях, для 14% прямого взаимодействия не обнаружено, однако имеется опосредованное взаимодействие. Для 59% показано участие (здесь и далее как прямое, так и опосредованное) в белок-белковых взаимодействиях, для 95% – коэкспрессия, для 22% – генетические взаимодействия (коррегуляция и т.п.). Для 19% пар проанализированных генов нет указаний на наличие экспериментально подтвержденных взаимодействий, но знание их структуры и свойств позволяет предсказывать наличие таковых. В структуре 5% пар генов есть общие домены, а экспрессия 24% происходит в одних и тех же органах, тканях и т.д. (т.е. сококализована). Лишь для одной пары генов (*IL12RB1 / PPP3R1*) не найдено ничего общего. Таким образом, полученные данные подтверждают возможность наличия функциональных связей между генами, полиморфные варианты которых находятся в гаметическом неравновесии. Соответственно, подобный метод оценки взаимодействий может использоваться для поиска функциональных связей между анализируемыми генами и построения генных сетей, характерных для тех или иных систем организма.

Рассмотрение массива данных, полученных в третьем блоке настоящего исследования, с привлечением результатов анализа в ресурсе GeneMania с точки зрения формирования того или иного функционального состояния позволяет сделать ряд предположений. Если гаметическое неравновесие по какой-либо паре локусов наблюдается во всех исследованных группах или во всех группах, кроме популяционной выборки, то это, скорее всего, отражает общую популяционную особенность и не информативно с точки зрения вовлеченности данных генов в формирование патологического фенотипа. Если гаметическое неравновесие в паре локусов определяется только в группе с патологией (или в двух, но его нет и в популяции), то это сочетание присуще для биологического процесса (процессов), характерных при развитии данного заболевания (заболеваний). Если гаметическое неравновесие в паре локусов зарегистрировано во всех группах с патологиями, кроме одной или же кроме двух (но при этом есть еще и в популяции), значит, это сочетание маркирует биохимический процесс (или процессы), которые разрушаются («выпадают») при этих одной-двух патологиях. Для проанализированных в настоящем исследовании патологий было определено по несколько значимых комбинаций, которые могут маркировать процессы, немаловажные для развития данных заболеваний (табл. 2). Графическая визуализация полученных результатов представляет собой генные сети (на рис. 4 приведен пример таких сетей при туберкулезе легких).

Таблица 2

Количество значимых сочетаний генов при разных патологиях

| Сочетания генов | Патология | | | |
|-----------------|-----------|----|----|-----|
| | ИБС | БА | ТБ | ВГС |
| Характерные | 5 | 3 | 5 | 3 |
| «Выпадающие» | 8 | 12 | 7 | 7 |

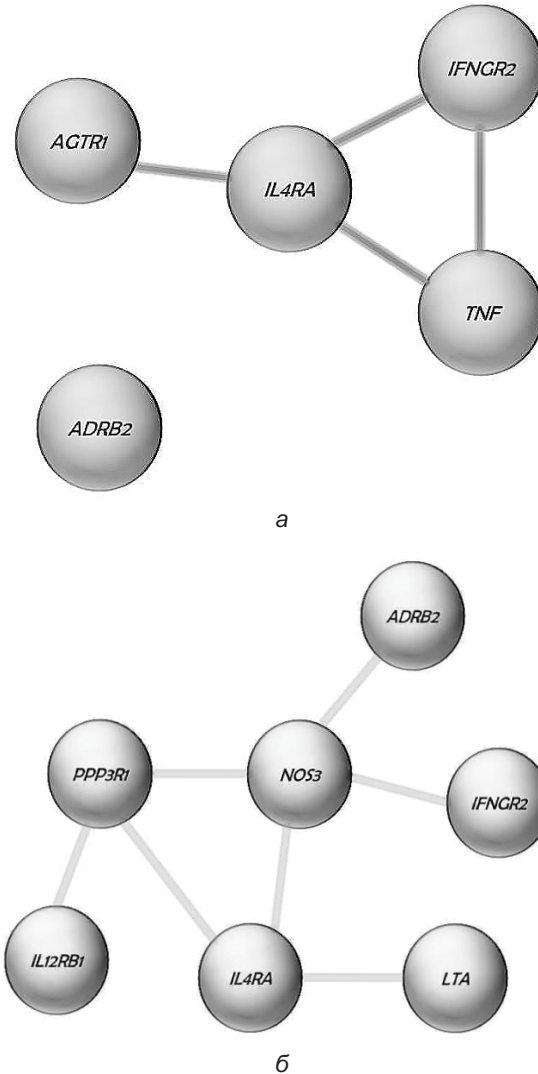


Рис. 4. Генные сети характерные (а) и выпадающие (б) при туберкулезе легких

При анализе полученных в настоящем исследовании данных с привлечением информации ресурса GeneMania вероятность причастности некоторых процессов к формированию патологического фенотипа достаточно велика. Например, продукты генов *NOS3* и *GATA4* – это сочетание, «выпадающее» в группе больных ИБС, совместно задействованы в процессах морфогенеза и развития кровеносных сосудов, нарушение которых является одним из факторов патологического функционирования сердечно-сосудистой системы [19]. В других случаях ситуация выглядит значительно более сложной. Например, при вирусном гепатите С три полиморфных варианта, локализованных в гене *NOS3*, находятся в неравновесии с одной из замен в гене *IL4R*, обозначая это сочетание генов как характерное при данной патологии; однако VNTR-полиморфизм в

гене *NOS3* также находится в гаметическом неравновесии со второй изученной заменой в гене *IL4R*, маркируя это же сочетание генов как «выпадающее» при том же заболевании.

В силу плейотропности исследованных генов в большинстве случаев определяется много процессов, в которых задействованы их продукты. Поэтому задача по выявлению функциональных связей по-прежнему остается трудоемкой и неоднозначной в своем решении. В любом случае полученные в настоящем исследовании данные представляют собой информацию для дальнейшего анализа и размышления и могут помочь в понимании биологических процессов, лежащих в основе тех или иных функциональных состояний организма. Очевидно, что знания в этой области приобретают первостепенную важность при изучении сложнаследуемых признаков и болезней человека.

Литература

1. Risma K.A., Wang N., Andrewa R.P. et al. V75R576 *IL-4* receptor α is associated with allergic asthma and enhanced *IL-4* receptor function // *J. Immunol.* 2002. V. 169. P. 1604–1610.
2. Akahoshi M., Nakshima H., Miyake K. et al. Influence of interleukin-12 receptor β 1 polymorphism on tuberculosis // *Hum. Genet.* 2003. V. 112. P. 237–243.
3. Sharma R., Li D.-Z. Role of Dendritic Cells in Atherosclerosis // *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2006. V. 14. P. 166–169.
4. Melen E., Umerkajeff S., Nyberg F. et al. Interaction between variants in the interleukin-4 receptor alpha and interleukin-9 receptor genes in childhood wheezing: evidence from a birth cohort study // *Clin. Exp. Allergy.* 2006. V. 36. № 11. P. 1391–1398.
5. Angunsri R., Sritharathikhun T., Suttirat S., Tencomnao T. Association of angiotensin-converting enzyme gene promoter single nucleotide polymorphisms and haplotype with major depression in a northeastern Thai population // *J. of Renin-Angiotensin-Aldosterone System.* 2009. V. 10, № 3. P. 179–184.
6. Niu W., Qi Y., Hou S. et al. Haplotype-based association of the renin-angiotensin-aldosterone system genes polymorphisms with essential hypertension among Han Chinese: the Fangshan study // *J. Hypertens.* 2009. V. 27, № 7. P. 1384–1391.
7. Blair D.R., Lyttle Ch.S., Mortensen J.M. et al. A nondegenerate code of deleterious variants in Mendelian loci contributes to complex disease risk // *Cell.* 2013. V. 155. P. 70–80.
8. Пузырёв В.П. Генетический взгляд на феномен сочетанной патологии у человека // *Мед. генетика.* 2008. № 9. С. 3–9.
9. Puzyrev V.P., Makeeva O.A., Freidin M.B. Syntropy, genetic testing and personalized medicine // *Personalized Med.* 2010. V. 7, № 4. P. 399–405.
10. Cardon L.R., Abecasis G.R. Using haplotype blocks to map human complex trait loci // *Trends in Genetics.* 2003. V. 19, № 3. P. 135–140.
11. Excoffier L., Slatkin M. Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium // *Am. J. Hum. Genet.* 1998. V. 62. P. 171–180.
12. <http://www.genemania.org/>
13. Пузырёв В.П., Кучер А.Н., Бабушкина Н.П. и др. Анализ мультилокусных генотипов, гаплотипов и оценка параметров неравновесия по сцеплению по полиморфным вариантам генов-кандидатов многофакторных заболеваний в сибирских популяциях // *Мед. генетика.* 2011. № 2 С. 36–48.
14. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Брагина Е.Ю. и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов интерлейкинов и их рецепторов у представителей четырех этнических групп Сибирского региона // *Мед. генетика.* 2009. № 10. С. 43–52.
15. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Маркова В.В. и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов-кандидатов заболеваний сердечно-сосудистой системы у представителей четырех этнических групп Сибирского региона // *Мед. генетика.* 2010. № 5. С. 24–34.
16. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Тарасенко Н.В. и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов факторов некроза опухоли и их рецепторов у представителей четырех этнических групп Сибирского региона // *Мед. генетика.* 2010. № 6. С. 16–23.
17. Marrero M.B., Venema V.J., Ju H. et al. Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors // *Biochem J.* 1999. V. 343. Pt. 2. P. 335–340.
18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
19. Новицкий В.В., Гольдберг Е.Д., Уразова О.И. Патология: в 2 т. 4-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. Т. 2.

РЕПЛИКАТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОДВЕРЖЕННОСТИ К ШИЗОФРЕНИИ В РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

А.В. Бочарова¹, В.А. Степанов¹, А.В. Марусин¹, Е.В. Рудиков², С.А. Иванова²,
А.В. Семке², Н.А. Бохан²

¹ НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

² НИИ психического здоровья СО РАМН, г. Томск

На протяжении последних нескольких десятилетий шизофрения является одним из наиболее изучаемых как отечественной, так и зарубежной наукой заболеваний. По данным Международного консорциума по шизофрении, количество опубликованных статей, посвященных этой болезни, поднялось с 1 200 в 1987 г. до 4 450 в 2007 г. [1]. Не последнюю роль в этом интересе играет распространенность шизофрении в мире, которая оценивается в пределах 0,8–1%, а заболеваемость составляет 15 случаев на 100 тыс. населения [2]. Риск развития этого расстройства растет при увеличении степени родства и составляет 0,4–1,4% в общей популяции, 3–10% у родственников первой линии, 8–10% при наличии больного сибса, 12% при наличии больного

родителя, до 50%, если больны оба родителя, 15% у дизиготного и 40–50% у монозиготного близнеца больного [3].

В руководстве под редакцией А.С. Тиганова (1999) приводится следующее определение: «Шизофрения – психическое заболевание, характеризующееся дисгармоничностью и утратой единства психических функций (мышления, эмоций, моторики), длительным непрерывным или приступообразным течением и разной выраженностью продуктивных (позитивных) и негативных расстройств, приводящих к изменениям личности в виде аутизма, снижения энергетического потенциала, эмоционального обеднения и нарастающей инвертированности» [4].

В 2001 г. Всемирная организация здравоохранения внесла это заболевание в список десяти ведущих причин инвалидности у лиц молодого возраста (от 15 до 44 лет), т.е. в отличие от других нарушений психики и головного мозга это заболевание поражает людей в расцвете их социального и репродуктивного роста.

Гетерогенность шизофрении несомненна как в этиологии, так и в клинических проявлениях. У различных людей болезнь вызывается комбинацией различных причин, и клиническая картина заболевания также различается. Но все же есть элементы относительно неизменные на всем спектре проявления болезни, они могут быть отражением общей дисфункции. Одним из таких элементов является нарушение когнитивных процессов, связанных с работой префронтальной коры головного мозга. Более того, когнитивные функции затрагиваются неравномерно, в наибольшей степени страдают исполнительские функции, социальная когниция, рабочая и вербальная память, отчасти внимание и речь [5].

Когнитивные нарушения являются важным и относительно независимым компонентом симптоматики шизофрении. До сих пор не существует общепризнанной концепции этиопатогенеза шизофрении. Но на данный момент не вызывает сомнения тот факт, что шизофрения имеет многофакторную природу. Это доказано многочисленными разноплановыми исследованиями (близнецовые, клинико-генетические, эпидемиологические). По данным зарубежных исследователей, относительная роль генетической составляющей в этиопатогенезе шизофрении оценивается в 60–70%, а оставшиеся 30–40% приходятся на долю средовых факторов [6].

До недавнего времени генетическая составляющая шизофрении изучалась с помощью подхода кандидатных генов. Благодаря этому подходу были выявлены перспективные гены, роль которых значима в предрасположенности к этому заболеванию. В последние годы новым источником данных о генах подверженности к мультифакторным заболеваниям стали полногеномные ассоциативные исследования (GWAS). Благодаря одновременному анализу ассоциаций с болезнью большого числа генетических маркеров такие исследования позволяют выявлять сотни тысяч маркеров предрасположенности к заболеванию. С помощью генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) на микроматрицах ДНК, которые включают сотни тысяч SNP, в полногеномных ассоциативных исследованиях шизофрении были выявлены генетические локусы, характеризующиеся малым генетическим эффектом ($OR = 1,1-1,5$), которые в совокупности могут объяснить примерно 30% генетического риска заболевания [7]. Все опубликованные GWAS занесены в каталог, который поддерживается Национальным институтом геномных исследований США. На конец июня 201 г. каталог GWAS насчитывал 1 922 публикации и 13 395 SNP, значимо ассоциированных с комплексными фенотипами [8]. По шизофрении к настоящему моменту опубликовано 31 исследование, включающее выборки по несколько тысяч больных и здоровых индивидов разного этнического происхождения.

Цель настоящей работы – провести репликативный анализ полиморфных вариантов генов *TCF4*,

VRK2, *NOTCH4*, *NRGN*, *RELN*, *KCNB2*, *CSMD1*, *CPVL*, *NRIP1*, ассоциированных, по данным GWAS, с шизофренией и когнитивными способностями в группе больных и здоровых русских.

Материал и методы

Сбор и клиническая характеристика выборки больных проходила на базе НИИ психического здоровья СО РАМН (г. Томск). В исследование было включено 114 больных шизофренией русских (59% мужчин и 41% женщин). Диагностические критерии соответствовали МКБ-10 для шизофрении F.20. Средний возраст в группе больных составил 35,7 года. Контрольная группа состояла из 285 добровольцев русской этнической принадлежности (68% мужчин и 32% женщин). Средний возраст в группе контроля составил 31,6 года. Данное генетическое исследование было одобрено биоэтическим комитетом НИИ медицинской генетики СО РАМН. При сборе материала от каждого больного было получено добровольное подписанное информированное согласие.

ДНК для генотипирования выделяли методом фенол-хлороформной экстракции из лейкоцитов периферической венозной крови стандартным методом. Генотипирование проводили методом ПЦР в реальном режиме времени с помощью TaqMan проб фирмы Applied Biosystems (США) по протоколу производителя на амплификаторе с детекцией ПЦР в реальном режиме времени фирмы Bio-Rad (США). В табл. 1 приведена характеристика 10 изученных полиморфных локусов.

Таблица 1

Характеристика изученных полиморфных локусов

| Ген (локализация) | Полиморфный локус | Аллели | Литературный источник |
|-------------------------|-------------------|--------|-----------------------|
| <i>TCF4</i> (18q21.2) | rs 9960767 | A*/C | [10] |
| <i>TCF4</i> (18q21.2) | rs 17594526 | C*/T | [7] |
| <i>VRK2</i> (2p16.1) | rs 2312147 | C*/T | [10] |
| <i>NOTCH4</i> (6p21.32) | rs 3131296 | A/G* | [10] |
| <i>NRGN</i> (11q24.2) | rs 12807809 | C*/T | [10] |
| <i>RELN</i> (7q22.1) | rs 7341475 | A/G* | [11] |
| <i>KCNB2</i> (8q13.3) | rs 2247572 | C*/T | [12] |
| <i>CSMD1</i> (8p23.2) | rs 2616984 | A*/G | [12] |
| <i>CPVL</i> (7p14.3) | rs 2252521 | C/T* | [13] |
| <i>NRIP1</i> (21q11.2) | rs 2229741 | A*/G | [13] |

* Обозначен предковый аллель.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью статистической программы Statistica 7.0. Распределение генотипов исследованных полиморфных вариантов проверяли на соответствие ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера [9]. При проведении попарного сравнения частот аллелей и генотипов между анализируемыми группами использовался критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность. Для оценки ассоциаций полиморфных вариантов генов с патологическим фенотипом рассчитывали показатель «отношение шансов» (odds ratio (OR)). Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

По данным GWAS, все 10 полиморфных маркеров, изученных в представленном исследовании, показали высокодостоверную ассоциацию с шизофренией и когнитивными нарушениями (рабочая па-

мать, эпизодическая память, контроль внимания, речь) [7, 10–13].

Распределение частот аллелей и генотипов по всем изученным полиморфным маркерам во всех исследуемых группах соответствовало равновесию Харди–Вайнберга. В табл. 2 представлены частоты аллелей изученных локусов у больных шизофренией русских и в группе контроля.

Таблица 2
Распределение частот аллелей изученных полиморфных локусов у больных шизофренией и в контрольной группе

| Полиморфный локус и ген | Аллель | Частота аллелей | | χ^2 (<i>p</i>) |
|-----------------------------|--------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | Группа больных (114 человек) | Группа контроля (285 человек) | |
| rs 9960767 <i>TCF4</i> | A | 0,98 | 0,97 | 0,74 (0,39) |
| | C | 0,02 | 0,03 | |
| rs 17594526 <i>TCF4</i> | C | 0,99 | 0,99 | 0,06 (0,81) |
| | T | 0,01 | 0,01 | |
| rs 2312147 <i>VRK2</i> | C | 0,58 | 0,61 | 0,84 (0,36) |
| | T | 0,42 | 0,39 | |
| rs 3131296 <i>NOTCH4</i> | C | 0,91 | 0,89 | 1,04 (0,31) |
| | T | 0,09 | 0,11 | |
| rs 12807809 <i>NRGN</i> | C | 0,13 | 0,16 | 1,63 (0,2) |
| | T | 0,87 | 0,84 | |
| rs 7341475 <i>RELN</i> | A | 0,18 | 0,14 | 1,74 (0,19) |
| | G | 0,82 | 0,86 | |
| rs 2247572 <i>KCNB2</i> | C | 0,87 | 0,83 | 1,71 (0,19) |
| | T | 0,13 | 0,17 | |
| rs 2616984 <i>CSMD1</i> | A | 0,66 | 0,73 | 3,89 (0,048) |
| | G | 0,34 | 0,27 | |
| rs 2252521 <i>CPVL</i> | C | 0,75 | 0,76 | 0 (0,96) |
| | T | 0,25 | 0,24 | |
| rs 2229741 <i>NRIP1</i> | C | 0,54 | 0,50 | 1,30 (0,25) |
| | T | 0,46 | 0,50 | |

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия между группой больных и контрольной группой ($p < 0,05$).

Были выявлены статистически значимые различия по полиморфному локусу rs 2616984 гена *CSMD1* (табл. 2). В результате сравнительного анализа распределения частот генотипов и аллелей между группами больных и здоровых была обнаружена ассоциация аллеля G с риском развития шизофрении у русских ($\chi^2 = 3,89$; $p = 0,048$; OR = 1,40; 95%-й CI 1,00–1,93). Также было показано, что аллель A гена *CSMD1* является протективным аллелем к развитию шизофрении у русских ($\chi^2 = 3,89$; $p = 0,048$; OR = 0,72; 95%-й CI 0,51–1,00).

За последние несколько лет в разных мировых источниках появилось много публикаций о роли гена *CSMD1* в восприимчивости к различным неврологическим и психиатрическим заболеваниям – болезнь Альцгеймера, биполярное расстройство, в том числе и шизофрения [14–17]. Например, E. Koiliari и соавт. установили, что один из полиморфных вариантов этого гена (rs10503253), который по GWAS ассоциирован с шизофренией, очень сильно влияет на общую познавательную способность и исполнительную функцию у здоровых белых греков [18]. Авторы предполагают, что один из аллелей имеет существенное неблагоприятное воздействие на познание, что может быть частью механизма, который увеличивает риск возникновения шизофрении [18].

Ген *CSMD1* экспрессируется во всех тканях, но наиболее высокий уровень продукта обнаружен в

тканях головного мозга. Продуктом гена *CSMD1* является мембранный белок, содержащий множественные домены SUB и Sushi и вовлеченный в контроль каскада комплемента [19–20]. Система комплемента является комплексом сложных белков, постоянно присутствующих в крови. Это каскадная система протеолитических ферментов, предназначенная для гуморальной защиты организма от действия чужеродных агентов, она участвует в реализации иммунного ответа организма и является важным компонентом врожденного, так и приобретенного иммунитета. В отечественной литературе опубликованы работы об исследованиях врожденного иммунитета при шизофрении, которые дают основания для предположения об активации этого типа иммунитета у больных индивидов [21]. Нами также подтверждена ассоциация rs 2616984 гена *CSMD1* с болезнью Альцгеймера в российской популяции [22].

Для других полиморфных вариантов, изученных в настоящей работе, не были зафиксированы ассоциации с риском развития шизофрении в русской популяции. Но о некоторых из них стоит упомянуть ввиду того, что они играют не последнюю роль в этиологии заболевания, а также есть литературные (не только GWAS) и наши собственные неопубликованные данные, которые подтверждают ассоциацию маркера с риском возникновения того или иного заболевания. Таким является ген *VRK2*, который кодирует белок серин/треонин протеинкиназу, принадлежащий к группе казеин киназ I. Эти протеинкиназы фосфорилируют гидроксильную группу в остатках серина или треонина. Они участвуют в контроле цитоплазматических и ядерных процессов, включая репликацию и репарацию ДНК, а также вовлечены в контроль за апоптозом. Серин/треонин протеинкиназа связывает белок JIP1, который в нейронных клетках служит фактором антиапоптоза в ответ на стресс и играет роль в развитии аксона [23]. Этот белок локализован в эндоплазматическом ретикулуме. Ген *VRK2* широко экспрессируется в человеческих тканях: в активно делящихся клетках (яичке, лейкоцитах, эмбриональной печени, карциномах). M. Li и соавт. выявил ассоциацию полиморфного маркера rs 2312147 гена *VRK2* с шизофренией у ханьцев [24]. В данной же работе была подтверждена ассоциация этого же локуса с шизофренией у казахов [25].

Ген *NOTCH4* кодирует белок, который относится к семейству Notch. Члены этого семейства представляют собой трансмембранные рецепторные белки, которые имеют внеклеточный домен, состоящий из многократных повторов, подобных эпидермальному фактору роста (EGF), и внутриклеточный домен, который состоит из многократных повторов различных типов. Белки семейства Notch участвуют в проведении сигнала с поверхности клетки в ядро. Notch-сигнальный путь – высококонсервативный внутриклеточный сигнальный путь, который регулирует взаимодействие прилегающих друг к другу клеток. Этот сигнальный путь активируется при взаимодействии трансмембранного лиганда семейства Jagged (Jagged 1 и 2) и семейства Delta (Delta-like 1; 3 и 4) с Notch-рецепторами (Notch1–4). После связывания рецептор-лиганд Notch-рецептор активируется протеолитическим расщеплением внутриклеточного домена, который

мигрирует в ядро и, образуя комплекс с ДНК, выполняет функцию транскрипционного фактора и участвует в экспрессии генов *Hes1* и *Hes5*, а также *Hey1* и *Hey2* [26]. В предыдущих работах была выявлена ассоциация rs 3131296 гена *NOTCH4* с болезнью Альцгеймера [22].

Ген нейрогранин (*NRGN*) содержит четыре экзона и три интрона. Экзоны 1 и 2 кодируют белок нейрогранин, а экзоны 3 и 4 содержат нетранслируемые последовательности. Белок нейрогранин является кальмодулинсвязывающим и участвует в сигнальном каскаде протеинкиназы С. Он встречается только в мозге, в повышенной концентрации содержится в дендритных шипиках. Нейрогранин является основным постсинаптическим кальмодулинсвязывающим белком и связывается с кальмодулином (*CaM*) в отсутствие кальция, а фосфорилирование белка снижает его способность к образованию связи с кальмодулином. Экспрессия гена *NRGN* предположительно контролируется гормонами щитовидной железы. Работа Е. J. Rose и соавт. не выявила взаимосвязи этого полиморфного варианта с особенностями структуры мозга и поведением у ирландцев, больных шизофренией [27].

В результате проведенного репликативного исследования полиморфных локусов генов *TCF4*, *VRK2*, *NOTCH4*, *NRGN*, *RELN*, *KCNB2*, *CSMD1*, *CPVL*, *NRIP1* в популяции русских, ассоциированных с риском развития шизофрении, по данным полногеномных исследований, была подтверждена вовлеченность полиморфного варианта rs 2616984 гена *CSMD1* в развитие шизофрении.

Так, было установлено, что маркерами риска развития шизофрении у русских является и аллель G гена *CSMD1* (OR = 1,40). Протективными факторами в отношении развития шизофрении у русских является аллель A гена *CSMD1* (OR = 0,72). По нашим данным, полиморфные маркеры генов *TCF4*, *VRK2*, *NOTCH4*, *NRGN*, *RELN*, *KCNB2*, *CPVL*, *NRIP1* не показали ассоциации с риском возникновения шизофрении у русских.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 12-04-00595).

Литература

1. <http://www.schizophreniaforum.org>
2. Хоменко Н.В. Генетические и средовые факторы в развитии шизофрении // Мед. журнал. 2012. № 2. С. 15–18.
3. Ягода С.А. Биомаркеры шизофрении и пути объективизации психофармакотерапии // Современная терапия психических расстройств. 2011. № 2. С. 2–7.
4. Руководство по психиатрии / под ред. А.С. Тиганова. М.: Медицина, 1999. Т. 1. 712 с.
5. Мосолов С.Н. Некоторые актуальные теоретические проблемы диагностики, классификации, нейробиологии и терапии шизофрении: сравнение зарубежного и отечественного подходов // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2010. Т. 6. С. 4–11.
6. Gejman P., Sanders A., Duan J. The Role of Genetics in the Etiology of Schizophrenia // Psychiatr. Clin. North Am. 2010. V. 33, № 1. P. 35–66.
7. Purcell S.M., Wray N.R., Stone J.L. et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder // Nature. 2009. V. 460, № 7256. P. 748–752.
8. <http://www.genome.gov>
9. Вейр Б. Анализ генетических данных. М.: Мир, 1995. 400 с.
10. Stefansson H., Ophof R.A., Steinberg S. et al. Common variants conferring risk of schizophrenia // Nature. 2009. V. 460, № 7256. P. 744–747.
11. Shifman S., Johannesson M., Bronstein M. et al. Genome-wide association identifies a common variant in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women // PLoS Genet. 2008. V. 4, № 2. P. e28
12. Cirulli E.T., Kasperaviciute D., Attix D.K. et al. Common genetic variation and performance on standardized cognitive tests // Eur. J. Hum. Genet. 2010. V. 18, № 7. P. 815–820.
13. Need A.C., Attix D.K., McEvoy J.M. et al. A genome-wide study of common SNPs and CNVs in cognitive performance in the CANTAB // Hum. Mol. Genet. 2009. V. 18. № 23. P. 4650–4661.
14. Luykx J.J., Bakker S.C., Lentjes E. et al. Genome-wide association study of monoamine metabolite levels in human cerebrospinal fluid // Mol. Psychiatry. 2014. V. 19, № 2. P. 228–234.
15. Sherva R., Tripodis Y., Bennett D.A. et al. Genome-wide association study of the rate of cognitive decline in Alzheimer's disease // Alzheimers Dement. 2014. V. 10. P. 45–52.
16. Xu W., Cohen-Woods S., Chen Q. et al. Genome-wide association study of bipolar disorder in Canadian and UK populations corroborates disease loci including *SYNE1* and *CSMD1* // BMC Medical Genetic. 2014. V. 15, № 2.
17. Rose E.J., Morris D.W., Hargreaves A. et al. Neural effects of the *CSMD1* genome-wide associated schizophrenia risk variant rs10503253 // Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet. 2013. V. 162, № 6. P. 530–537.
18. Koiliari E., Roussos P., Pasparakis E. et al. The *CSMD1* genome-wide associated schizophrenia risk variant rs10503253 affects general cognitive ability and executive function in healthy males // Schizophr. Res. 2014. V. 154, № 1–3. P. 42–47.
19. Steen V.M., Nepal C., Erland K.M. et al. Neuropsychological deficits in mice depleted of the schizophrenia susceptibility gene *CSMD1* // PLoS One. 2013. V. 8, № 11. P. e79501.
20. Håvik B., Le Hellard S., Rietschel M. et al. The complement control-related genes *CSMD1* and *CSMD2* associate to schizophrenia // Biol. Psychiatry. 2011. V. 70, № 1. P. 35–42.
21. Щербак И.В. Активация врожденного иммунитета при шизофрении // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2006. Т. 10. С. 79–82.
22. Степанов В.А., Бочарова А.В., Марусин А.В. и др. Репликативный анализ ассоциаций генетических маркеров когнитивных признаков с болезнью Альцгеймера в российской популяции // Мол. биол. 2014. Т. 48. № 6 (в печати).
23. Ellenberger T., Fass D., Amaud M., Harrison S.C. Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer // Genes. Dev. 1994. V. 8, № 8. P. 970–980.
24. Li M., Wang Y., Zheng X. et al. Meta-analysis and brain imaging data support the involvement of *VRK2* (rs2312147) in schizophrenia susceptibility // Schizophr. Res. 2012. V. 142. P. 200–205.
25. Степанов В.А., Бочарова А.В., Марусин А.В. и др. Репликативное исследование подверженности к шизофрении с ранним началом в казахской популяции // Генетика. 2014. Т. 50 (в печати).
26. Вартамян А.А., Григорьева И.Н., Домбровский В.С. и др. Блокирование Notch-сигнального пути стабилизирует васкулогенную мимикрию при меланоме // Рос. биотерапевт. журн. 2012. Т. 11, № 3. С. 3–8.
27. Rose E.J., Morris D.W., Fahey C. et al. The Effect of the Neurogranin Schizophrenia Risk Variant rs12807809 on Brain Structure and Function // Twin Research and Human Genetics. 2012. V. 15, № 3. P. 296–303.

К ПРОБЛЕМЕ ДИСТРОПИИ: ТУБЕРКУЛЕЗ И БРОНХИАЛЬНАЯ АСТМА

Е.Ю. Брагина¹, Е.С. Тийс^{2,3}, М.Б. Фрейдин¹, Л.А. Конева¹, В.А. Иванисенко^{2,3},
П.С. Деменков^{2,3}, Н.А. Колчанов², В.П. Пузырёв¹

¹ НИИ медицинской генетики СО РАН, г. Томск

² Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

³ Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

Особенности отношений между многофакторными хроническими болезнями человека позволили выделить ряд понятий, характеризующих эти связи. Еще в начале XX в. немецкие педиатры определили понятие синтропии – «взаимное притяжение» или сочетания болезней, связанные общими патогенетическими механизмами [1]. Позднее, в 1970 г., A.R. Feinstein предложил термин «коморбидность», определяющий наличие «любой отдельной дополнительной сущности, которая существует или может возникнуть в анамнезе пациента, и отличается от основного заболевания» [2]. Специфичностью данного феномена является сочетание двух и более патологических состояний не только у индивида, но и у его ближайших родственников, что предполагает наследственную основу, определенную наличием функционально взаимодействующих, корегулируемых синтропных генов, вовлеченных в общие для данной синтропии биохимические и физиологические пути [3, 4]. Развитие исследований в этом направлении позволило выделить среди многообразия генетических вариантов синтропные гены болезней сердечно-сосудистого континуума [4], аутоиммунных [5] и atopических заболеваний [6].

Отношения болезней между собой мало исследованы на геномном уровне по сравнению с отдельными нозологиями. В настоящее время разрабатываются подходы, позволяющие анализировать сходство между заболеваниями с учетом всей мощности достижений современных биомедицинских наук [7–9]. Болезни, связанные через общие гены, белки, высокую степень взаимодействий между молекулами и определенную внутриклеточную локализацию, как правило, имеют тенденцию быть коморбидными [10–13]. Значительная коморбидность наблюдается между заболеваниями, связанными схожими эволюционными влияниями [14]. Коморбидность характерна как для комплексных заболеваний, болезней менделевской природы, так и для пар болезней «многофакторная – менделевская патология» [15].

Наряду с синтропией или коморбидностью существуют альтернативные отношения, именуемые дистропией – редко встречающиеся одновременно сочетания болезней у одного индивида [1, 4]. Клинические наблюдения в начале прошлого века определили как дистропию редкое сочетание туберкулеза с сердечно-сосудистыми, аллергическими и некоторыми инфекционными (скарлатина, дифтерия, септические осложнения) заболеваниями [16]. Подозрения об антагонистических отношениях между раком и туберкулезом высказал известный патологоанатом К. Rokitansky [17]. Примером дистропии может быть не встречающееся на практике сочетание пролиферативных процессов лимфоидного и миелоидного типа [18]. Единичны случаи совместного развития В- и Т-клеточных лимфом у одного индивида [19]. Феномен дистропии, также получивший опре-

деление как обратная, или отрицательная, коморбидность, хорошо иллюстрирован на примере нейродегенеративных и онкологических заболеваний в метаанализе 50 клинических исследований [20].

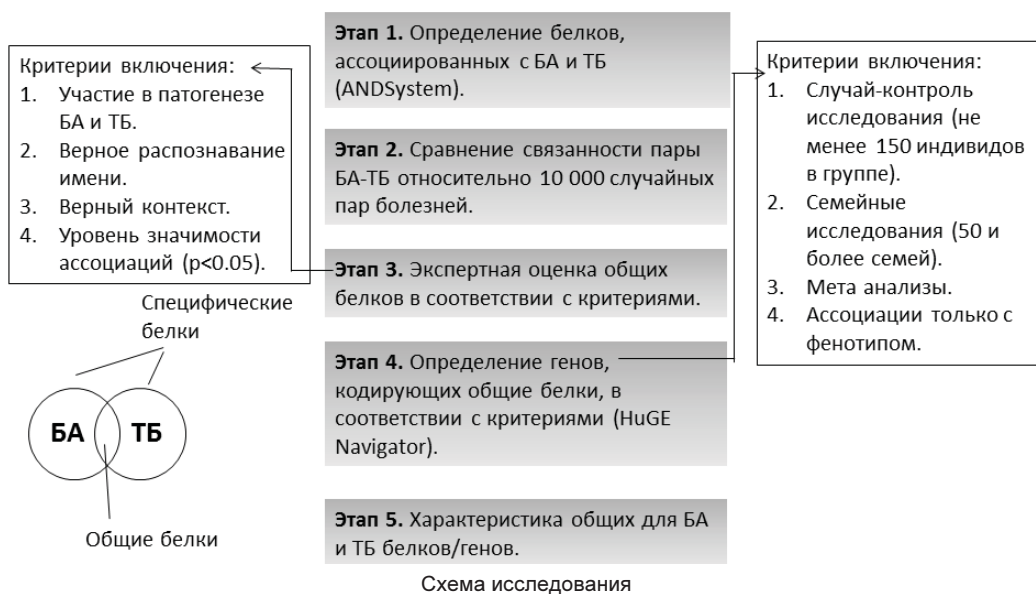
Частота случаев совместного проявления симптомов atopической бронхиальной астмы (БА) и туберкулеза (ТБ) у одного индивида невысока [21, 22], что позволяет отнести эти болезни к дистропии. Патогенез БА как аллергического заболевания определяется преимущественной активностью Th2-лимфоцитов, выделяющих цитокины, стимулирующих синтез антител аллергии, IgE, и привлекающих в участок развития воспаления эозинофилы и другие клетки, секретирующие медиаторы, обуславливающие патологические реакции. В свою очередь, противотуберкулезный иммунный ответ характеризуется преимущественно Th1-циткиновым профилем с повышенной продукцией интерлейкинов-2, -12, фактора некроза опухоли α , интерферона- γ , которые усиливают активацию макрофагов, фагоцитирующих и уничтожающих *Mycobacterium tuberculosis*. Возможно, что низкая сочетанность этих болезней может быть обусловлена генами, участвующими в патофизиологических механизмах, препятствующих совместному развитию БА и ТБ, поэтому важно установить общие и специфические гены, а также определить молекулярно-генетические механизмы, приводящие к снижению вероятности совместного развития заболеваний у одного индивида.

Цель данной работы – поиск и анализ общих генов, ассоциированных как с развитием БА, так и ТБ, и, соответственно, молекулярно-генетических путей, лежащих в основе общих патогенетических механизмов.

Материал и методы

На рисунке представлены основные этапы исследования. На первом этапе были определены общие и специфические белки, ассоциированные с БА и ТБ в сетях молекулярных взаимодействий, реконструированные с помощью разработанной в Институте цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) программы ANDSystem [23]. Данные о взаимодействиях были экстрагированы, используя метод компьютерного лингвистического анализа текстов (метод text-mining) из базы знаний ANDCell, и затем визуализированы с помощью программы ANDVisio.

На втором этапе исследования, предположив, что дистропные заболевания обладают большей связностью между собой по сравнению со случайными парами заболеваний в ассоциативных сетях, выполнено сравнение связности между парой БА и ТБ в сравнении с 10 000 случайных пар болезней, выбор последних производился из тех заболеваний, которые имели хотя бы одну ассоциацию с белком в базе ANDCell (3 013 заболеваний из 4 582). Использовались три меры связности между заболеваниями.



Первая мера представляла количество белков, ассоциированных с обоими заболеваниями; вторая мера – Jaccard index [24] в данной работе рассчитывалась как отношение числа белков, ассоциированных с обоими заболеваниями, к числу белков, ассоциированных хотя бы с одним из них; третья мера связанности – $meet/min$ [25] – рассчитывалась как число белков, ассоциированных с обоими заболеваниями, деленное на число белков, ассоциированных с заболеванием, имеющим меньшее «белковое окружение». Уровень значимости p рассчитывался как число случайно выбранных пар заболеваний, превосходящих по связанности БА и ТБ, отнесенное к полному числу случайно выбранных пар заболеваний. Коррекция на множественное сравнение выполнена с использованием подхода False-Discovery Rate (FDR) [26].

Для общих белков на третьем этапе исследования была проведена экспертная оценка, основным критерием которой было участие белка в патогенезе обоих изучаемых заболеваний. Кроме того, белки были исключены в случае:

- неправильного распознавания имени (наличие неспецифических синонимов для ряда объектов, как, например, Th1 к белку NELFD);

- неправильного контекста, например, отсутствие ассоциации *STAT3* с развитием БА тем не менее идентифицировало данный белок в сети в связи с упоминанием заболевания и белка в абстракте статьи [27].

Экспертная оценка также учитывала информацию о статистической значимости ассоциаций белка с заболеваниями ($p \leq 0,05$). Связь между белком и заболеваниями расценивалась как верная с учетом вышеперечисленных критериев.

На четвертом этапе исследования для общих белков выполнен поиск генов, ассоциированных одновременно с двумя заболеваниями по публикациям, представленным в базе знаний HuGENet (Human Genome Epidemiology Network) включительно до ноября 2013 г. Информацию о генах получали путем построения поискового запроса англоязычных названий заболеваний «asthma» и «tuberculosis» в HuGE Navigator [28]. Затем провели экспертную оценку на предмет ассоциации полиморфных вариантов общих генов с изучаемыми заболеваниями,

которая учитывала следующие дизайны исследований: случай – контроль, семейные, а также метаанализы исследований «случай – контроль». Использована информация из публикаций, изучаемые группы в которых составили не менее 150 индивидов (для исследований «случай – контроль») или 50 и более семей (для исследований на семейном материале). Оценивали непосредственно ассоциации с заболеваниями, не принимая во внимание информацию об ассоциациях с количественными признаками и клиническими особенностями.

На последнем этапе кратко были описаны биологические процессы, в которых участвуют общие белки, функции этих белков, локализация и полиморфные варианты кодирующих их генов, ассоциированные с изучаемыми заболеваниями.

Результаты и обсуждение

Обсуждая возможные механизмы дистропии БА и ТБ, можно предположить, что общие молекулярные паттерны, действующие во взаимоисключающих направлениях, могут препятствовать совместному развитию этих болезней. В связи с чем в данной работе были определены общие белки (гены), ассоциированные с БА и ТБ.

Сравнение списков белков двух сетей позволило выявить, что с БА в ассоциативной сети связаны 585 белков, с развитием ТБ – 131 белок, а также определены 69 общих белков, ассоциированных с развитием и БА, и ТБ. Связанность между БА и ТБ оказалась выше связанности случайно выбранных пар заболеваний по числу общих белков ($p = 0,0004$), по Jaccard index ($p = 0,017$) и по $meet/min$ ($p = 0,0364$). Подобным образом высокую связанность ($p < 0,05$ по числу общих белков и Jaccard index) мы обнаружили для онкологических (рак легких, колоректальный рак, рак простаты) и нейродегенеративных (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и шизофрения) пар болезней, известных своими дистропными отношениями.

После экспертной оценки (см. «Материал и методы») список из 69 общих белков был редуцирован до 19. Выявленные общие белки задействованы во множестве ключевых биологических процессов, включая клеточную дифференциацию и пролиферацию, иммунные, воспалительные реакции. Стоит отметить их

важную роль в развитии многих иммунозависимых заболеваний, включая сахарный диабет, болезнь Крона, ревматоидный артрит и многие другие.

Согласно анализу ассоциаций полиморфизма генов, кодирующих общие белки, с использованием ресурса HuGe Navigator установлено, что полиморфные варианты 14 из 19 общих генов ассоциированы с БА и ТБ (табл. 1). Для трех генов ассоциация была изучена только с одним заболеванием: полиморфизм гена *SPP1* – с БА, полиморфизм генов *CXCL10* и *TNFRSF1B* – с ТБ. Полиморфные варианты двух генов (*CD4*, *CD79A*) не были изучены относительно развития как БА, так и ТБ.

Остеопонтин, кодируемый геном *SPP1*, относится к провоспалительным цитокинам, вовлеченным преимущественно в иммунный ответ Th1-типа. Высокий уровень остеопонтина выявляется в сыворотке пациентов с ТБ [65]. Различная экспрессия этого гена обнаружена в здоровых и инфицированных микобактерией клетках [66]. Некоторые варианты этого гена связаны с развитием БА [55], однако данные об исследовании его полиморфизма в связи с развитием ТБ не представлены в литературе, таким образом, *SPP1* может быть рассмотрен как ген-кандидат инфекционного заболевания.

Продукция *CXCL10* повышена при аллергическом воспалении в мышинной модели БА [67], так же

как и установлена критическая роль *TNFRSF1B* в воспалении и повреждении тканей [68]. Позитивная регуляция экспрессии гена *TNFRSF1B* обнаружена у пациентов с БА атопического и не атопического генеза в сравнении со здоровыми индивидами [69]. Таким образом, гены *CXCL10* и *TNFRSF1B* являются значимыми в связи с развитием БА, однако роль конкретных полиморфных вариантов этих генов на данный момент недостаточно изучена в отношении аллергического заболевания.

Для шести общих генов (*IL1B*, *IL2*, *IL10*, *IL12B*, *CCL2*, *VDR*) были исследованы ассоциации с БА и ТБ одних и тех же полиморфных вариантов. Для четырех из них наблюдали противоположный эффект одних и тех же генотипов на развитие БА и ТБ. Полиморфизм rs2069762 гена *IL2* затрагивает сайт связывания для транскрипционного фактора AP-1, который играет важную роль в регуляции экспрессии *IL2* [70]. Аллель Т (rs2069762) снижает экспрессию *IL2*, способствуя риску развития БА [29], но в то же время известно о протективной роли этого аллеля для ТБ [30]. Подобным образом комбинация генотипов AA+GA (rs1800896) гена *IL10* оказывает защитный эффект для развития ТБ ($OR = 0,55$; 95%-й CI 0,35–0,88; $p = 0,01$), в то время как генотип AA связан с повышенным риском БА ($OR = 1,26$; 95%-й CI 1,02–1,55; $p < 0,05$) [33, 34].

Таблица 1

Полиморфные варианты генов, ассоциированные с БА и ТБ

| Ген (локализация) | ID гена | Полиморфные варианты, ассоциированные с | | Литературный источник |
|--------------------------------|---------|---|--|-----------------------|
| | | БА | ТБ | |
| <i>IL2</i> (4q26–q27) | 3558 | rs2069762 | rs2069762 | [29, 30] |
| <i>IL8</i> (4q13–q21) | 3576 | rs2227306 | rs2227538 | [31, 32] |
| <i>IL10</i> (1q31–q32) | 3586 | rs1800896 | rs1800896 | [33, 34] |
| <i>IL12B</i> (5q31.1–q33.1) | 3593 | rs3212227 rs568404 rs17860508 | rs3212227 rs17860508 rs10631390 VNTR (TG-TA) _n | [35–37] |
| <i>TNFA</i> (6p21.3) | 7124 | rs1800629 | rs1799724 | [38, 39] |
| <i>IFNG</i> (12q14) | 3458 | rs1861494 | rs2430561 | [40, 41] |
| <i>HLA-DQB1</i> (6p21.3) | 3119 | rs1063355 | Asp57 | [42, 43] |
| <i>HLA-DRB1</i> (6p21.3) | 3123 | HLA-DRB1* 03 | HLA-DRB1*1101 HLA-DRB1*1202 DRB1*1302 HLA-DRB1*0803 | [44–47] |
| <i>CCL2</i> (17q11.2–q12) | 6347 | rs1024611 | rs1024611 rs2857656 rs13306750 | [48, 49] |
| <i>IL1B</i> (2q14) | 3553 | rs16944 | rs16944 | [50, 51] |
| <i>IL4</i> (5q31.1) | 3565 | rs2243250 rs2070874 | Не соответствует критериям исследования | [52] |
| <i>IL6</i> (7p21) | 3569 | Не соответствует критериям исследования | rs1800796 | [53] |
| <i>CXCL10</i> (4q21) | 3627 | Не изучен для БА | –135G > A | [54] |
| <i>SPP1</i> (4q22.1) | 6696 | rs1126616 rs1126772 rs9138 | Не изучен для ТБ | [55] |
| <i>VDR</i> (12q13.11) | 7421 | rs2228570 rs1544410 rs731236 rs7975232 | rs2228570 rs1544410 | [56–60] |
| <i>SLC11A1</i> (2q35) | 6556 | Ген <i>SLC11A1</i> не ассоциирован с астмой | rs17235409 1729+del4 rs3731865 rs34448891 | [61, 62] |
| <i>TNFRSF1B</i> (1p36.3–p36.2) | 7133 | Не изучен для БА | rs1061624 rs3397 | [63, 64] |
| <i>CD4</i> (12p13.31) | 920 | Не изучен для БА | Не изучен для ТБ | – |
| <i>CD79A</i> (19q13.2) | 973 | Не изучен для БА | Не изучен для ТБ | – |

Исследование полиморфного варианта rs2228570 гена *VDR* показало, что генотип ff ассоциирован с риском развития ТБ ($OR = 1,91$, 95%-й *CI* 1,44–2,52) [58] и отмечена его протективная значимость в отношении БА [56]. Генотип 2/2 полиморфного варианта rs3212227 гена *IL12B* снижает риск развития ТБ [37] и способствует развитию БА [36].

Аллель G (rs1024611) гена *CCL2* увеличивает риск БА ($OR = 2,0$; 95%-й *CI* 1,4–2,9; $p < 0,001$) [48]. В метаанализе не найдено подтверждения значимости данного варианта в развитии ТБ [71]. В случае полиморфизма rs144410 гена *VDR* показано, что генотип bb снижает риск ТБ [60], в то время как альтернативный генотип BB способствует развитию БА ($OR = 2,15$; 95%-й *CI* 1,19–3,90; $p = 0,006$) [56]. Для полиморфного варианта rs16944 гена *IL1B* генотип CC и аллель C снижают риск развития как БА, так и ТБ [50, 51].

Большинство аллельных вариантов общих генов располагается в регуляторных областях. Согласно экспериментальным данным многие варианты, ассоциированные с развитием и БА, и ТБ, влияют на уровень экспрессии, например, нуклеотидная замена (rs2069762) гена *IL2* [72]. В некоторых случаях для одних и тех же полиморфных вариантов наблюдается связь разных аллелей с развитием БА и ТБ, что позволяет обсуждать патологическую значимость разных аллелей одного полиморфизма для развития разных болезней. Различия в экспрессии цитокинов, связанные с полиморфизмом в регуляторных регионах общих для БА и ТБ генов, могут быть одной из причин дистропии. Схожая картина характерна для разных аутоиммунных заболеваний, когда один аллель гена *IL23R* ассоциирован с болезнью Крона и язвенным колитом, в то время как альтернативный вариант приводит к развитию псориаза, в основе чего может лежать гипер- и гипорегуляция *IL23* сигналинга [5]. В ходе полногеномных ассоциативных исследований также показано, что одни и те же SNPs в генах, вовлеченных в специфические биологические процессы, демонстрируют противоположный эффект, в одних случаях способствуя развитию аллергических, в других – аутоиммунных болезней [73].

В настоящее время не так много известно о механизмах, лежащих в основе феномена дистропии. Различные факторы, включая полиморфизм генов, уровень метилирования, воздействие средовых факторов, влияющих на активность ключевых патогенетических паттернов, могут способствовать дистропии между комплексными болезнями человека. Сравнительно недавно были определены ключевые общие молекулы взаимоисключающих отношений для онкологических и нейродегенеративных болезней, играющие важную роль в установлении решения клеткой «репарация и жизнь»/«клеточная гибель» [74]. Кроме того, для этих дистропных состояний в ходе транскриптомного метаанализа показано значительное перекрытие между дифференциально экспрессируемыми генами, де-регулируемыми в противоположных направлениях [75].

Современные системные подходы, использующиеся для анализа геномных данных, открывают принципиально новые возможности для изучения болезней, включая аспект коморбидности. В их основе лежит допущение о многих общих причинах и патогенетических механизмах разных болезней. Используя реконструкцию и анализ ассоциативных

сетей и предположив, что генетические факторы могут лежать в основе редкого сосуществования двух болезней у одного индивида, в настоящей работе определены общие для БА и ТБ гены. О неслучайности отношений между этими болезнями свидетельствует оценка связанности, показавшая высокую связанность пары БА и ТБ в сравнении с 10 тыс. пар случайно выбранных болезней.

Практически все общие для БА и ТБ белки представляют цитокины – интерлейкины, интерфероны, туморнекротизирующий фактор, а также хемокины, которые обладают широким спектром биологической активности, связаны с процессами иммунорегуляции, острого и хронического воспаления и, соответственно, играют неотъемлемую роль в развитии самых разных по этиологии и патогенезу иммунозависимых заболеваний, включая сахарный диабет, ревматоидный артрит, болезнь Крона и др.

Анализ ассоциаций генов, кодирующих общие для БА и ТБ белки, позволил определить, что в некоторых случаях наблюдаются разные эффекты одного генотипа на развитие разных заболеваний (*IL2*, *IL10*, *IL12B*, *VDR*). Кроме того, выявлены гены-кандидаты БА и ТБ, полиморфизм которых ранее не изучен в ассоциативных исследованиях.

Исследования взаимоотношений болезней являются уникальной возможностью разобраться не только в патогенезе многофакторных заболеваний, но и понять, почему одни индивиды со специфическими болезнями защищены от других заболеваний. Общие для разных заболеваний молекулы могут оказывать влияние на их дистропные отношения, тем не менее для полного понимания биологических причин этого явления нужны экспериментальные функциональные и экспрессионные исследования. Предложенная в данном исследовании стратегия оказалась полезной как для понимания дистропии, так и выявления новых генов-кандидатов иммунологически полярных болезней.

Литература

1. Pfaundler M., von Seht L. Weiteres über Syntropie kindlicher Krankheitszustände // *Z Kinderheilkd.* 1921. V. 30. P. 298–313.
2. Feinstein A.R. Pre-therapeutic classification of co-morbidity in chronic disease // *J. Chron Dis.* 1970. № 23. P. 455–468.
3. Пузырёв В.П. Генетический взгляд на феномен сочетанной патологии у человека // *Мед. генетика.* 2008. Т. 7, № 9. С. 3–9.
4. Пузырев В.П., Фрейдин М.В. Genetic View on the Phenomenon of Combined Diseases in Man // *Acta Naturae.* 2009. № 1. P. 52–57.
5. Zhernakova A., van Diemen C.C., Wijmenga C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases // *Nat. Rev. Genet.* 2009. 10. P. 43–55.
6. Фрейдин М.В., Пузырёв В.П. Синтропные гены аллергических заболеваний // *Генетика.* 2010. Т. 46, № 2. С. 224–229.
7. Goh K.I., Cusick M.E., Valle D. et al. The human disease network // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007. № 104. P. 8685–8690.
8. Sirota M., Schaub M.A., Batzoglou S. et al. Autoimmune Disease Classification by Inverse Association with SNP Alleles // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. P. e1000792.
9. Li J., Gong B., Chen X. et al. DOSim: an R package for similarity between diseases based on Disease Ontology // *BMC Bioinformatics.* 2011. V. 12. P. 266.
10. Rzhetsky A., Wajngurt D., Park N., Zheng T. Probing genetic overlap among complex human phenotypes // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2007. V. 104. P. 11694–11699.

11. Lee D.S., Park J., Kay K.A. The implications of human metabolic network topology for disease comorbidity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. 105. P. 9880–9885.
12. Park J., Lee D.S., Christakis N.A., Barabasi A.L. The impact of cellular networks on disease comorbidity // *Molecular Systems Biology*. 2009. V. 5. P. 262.
13. Park S., Yang J.S., Shin Y.E. et al. Protein localization as a principal feature of the etiology and comorbidity of genetic diseases // *Mol. Syst. Biol.* 2011. V. 7. P. 494.
14. Park S., Yang J.S., Kim J. et al. Evolutionary history of human disease genes reveals phenotypic connections and comorbidity among genetic diseases // *Sci Rep.* 2012. V. 2. P. 757.
15. Blair D.R., Lyttle C.S., Mortensen J.M. et al. A nondegenerate code of deleterious variants in Mendelian loci contributes to complex disease risk // *Cell*. 2013. V. 155. P. 70–80.
16. Ickert Fr. Über konstitutionelle und erbbiologische Faktoren bei der Tuberkulose unter erücksichtigung der Eheberatung // *Lung*. 1940. V. 94. P. 383–402.
17. Hauswirth O. Über Syntropie- und Dystropiekrankheiten // *J. of Neural Transmission*. 1962. V. 25, № 4. P. 607–630.
18. Крылов А.А. К проблеме сочетаемости заболеваний // *Клинич. медицина*. 2000. № 1. С. 56–58.
19. Paolini R., Poletti A., Ramazzina E. et al. Co-existence of cutaneous T-cell lymphoma and B hairy cell leukemia // *Am. J. Hematol.* 2000. V. 64. P. 197–202.
20. Catalá-López F., Suárez-Pinilla M., Suárez-Pinilla P. et al. Inverse and direct cancer comorbidity in people with central nervous system disorders: a meta-analysis of cancer incidence in 577,013 participants of 50 observational studies // *Psychoter Psychosom.* 2014. V. 83. P. 89–105.
21. Shirtcliffe P., Weatherall M., Beasley R. International Study of Asthma and Allergies in Childhood An inverse correlation between estimated tuberculosis notification rates and asthma symptoms // *Respirology*. 2002. V. 7. P. 153–155.
22. Fekih L., Boussoffara L., Jemaa M. et al. Tuberculosis in patients with asthma // *Rev. Mal. Respir.* 2010. V. 27. P. 679–684.
23. Demenkov P., Ivanisenko T., Kolchanov N., Ivanisenko V. ANDVisio: a new tool for graphic visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem // *In silico biology*. 2011. V. 11. P. 149–161.
24. Jaccard P. The distribution of the flora in the alpine zone // *New phytologist*. 1912. 11. P. 37–50.
25. Goldberg D.S., Roth F.P. Assessing experimentally derived interactions in a small world // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003. V. 100. P. 4372–4376.
26. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995. P. 289–300.
27. Wjst M., Lichtner P., Meitinger T., Grimbacher B. STAT3 single-nucleotide polymorphisms and STAT3 mutations associated with hyper-IgE syndrome are not responsible for increased serum IgE serum levels in asthma families // *Eur. J. Hum. Genet.* 2009. V. 17. P. 352–356.
28. Yu W., Gwinn M., Clyne M. et al. A Navigator for Human Genome Epidemiology // *Nat. Genet.* 2008. V. 40. P. 124–125.
29. Christensen U., Haagerup A., Binderup H.G. et al. Family based association analysis of the IL2 and IL15 genes in allergic disorders // *Eur. J. Hum. Genet.* 2005. V. 14. P. 227–235.
30. Selvaraj P., Alagarasu K., Harishankar M. et al. Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis // *Cytokine*. 2008. V. 43. P. 26–33.
31. Puthothu B., Krueger M., Heinze J. et al. Impact of IL8 and IL8-receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections // *Clin. Mol. Allergy*. 2006. V. 4. P. 2.
32. de Wit E., van der Merwe L., van Helden P.D., Hoal E.G. Gene-gene interaction between tuberculosis candidate genes in a South African population // *Mamm. Genome*. 2011. V. 22. P. 100–110.
33. Zheng X.Y., Guan W.J., Mao C. et al. Interleukin-10 Promoter 1082/-819/-592 Polymorphisms are Associated with Asthma Susceptibility in Asians and Atopic Asthma: A Meta-Analysis // *Lung*. 2014. V. 192. P. 65–73.
34. Zhang J., Chen Y., Nie X.B. et al. Interleukin-10 polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2011. V. 15. P. 594–601.
35. Chen T., Liang W., Gao L. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in interleukin 12 (IL-12A and -B) with asthma in a Chinese population // *Hum. Immunol.* 2011. V. 72 (7). P. 603–606.
36. Hirota T., Suzuki Y., Hasegawa K. et al. Functional haplotypes of IL-12B are associated with childhood atopic asthma // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005. V. 116. P. 789–795.
37. Tso H.W., Lau Y.L., Tam C.M. et al. Associations between IL12B polymorphisms and tuberculosis in the Hong Kong Chinese population // *J. Infect. Dis.* 2004. V. 190. P. 913–919.
38. Zhang Y., Zhang J., Tian C. et al. The -308 G/A polymorphism in TNF- α gene is associated with asthma risk: an update by meta-analysis // *J. Clin. Immunol.* 2011. V. 31. P. 174–185.
39. Zhu H., Zhang Z., Lei X. et al. Tumor necrosis factor alpha -308G>A, -863C>A, -857C>T gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis // *Gene*. 2012. 509. P. 206–214.
40. Kumar A., Ghosh B. A single nucleotide polymorphism (A->G) in intron 3 of IFNGamma gene is associated with asthma // *Genes Immun.* 2008. V. 9. P. 294–301.
41. Tian C., Zhang Y., Zhang J. et al. The +874T/A polymorphism in the interferon- γ gene and tuberculosis risk: an update by meta-analysis // *Hum. Immunol.* 2011. V. 72. P. 1137–1142.
42. Li X., Howard T.D., Zheng S.L. et al. Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010. V. 125. P. 328–335.
43. Delgado J.C., Baena A., Thim S., Goldfeld A.E. Aspartic acid homozygosity at codon 57 of HLA-DQ beta is associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia // *J. Immunol.* 2006. V. 176. P. 1090–1097.
44. Munthe-Kaas M.C., Carlsen K.L., Carlsen K.H. et al. HLA Dr-Dq haplotypes and the TNFA-308 polymorphism: associations with asthma and allergy // *Allergy*. 2007. V. 62. P. 991–998.
45. Yuliwulandari R., Sachrowardi Q., Nakajima H. et al. Association of HLA-A, -B, and -DRB1 with pulmonary tuberculosis in western Javanese Indonesia // *Hum. Immunol.* 2010. V. 71. P. 697–701.
46. Lombard Z., Dalton D.L., Venter P.A. et al. Association of HLA-DR, -DQ, and vitamin D receptor alleles and haplotypes with tuberculosis in the Venda of South Africa // *Hum. Immunol.* 2006. V. 67. P. 643–654.
47. Kim H.S., Park M.H., Song E.Y. et al. Association of HLA-DR and HLA-DQ genes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Koreans: preliminary evidence of associations with drug resistance, disease severity, and disease recurrence // *Hum. Immunol.* 2005. V. 66. P. 1074–1081.
48. Szalai C., Kozma G.T., Nagy A. et al. Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001. 108. P. 375–381.
49. Intemann C.D., Thye T., Förster B. et al. MCP1 haplotypes associated with protection from pulmonary tuberculosis // *BMC Genet.* 2011. V. 12. P. 34.
50. Zeyrek D., Demir E., Alpman A. et al. Association of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in Turkish children with atopic asthma // *Allergy Asthma Proc.* 2008. V. 29. P. 468–474.
51. Awomoyi A.A., Charurat M., Marchant A. et al. Polymorphism in IL1B: IL1B-511 association with tuberculosis and decreased lipopolysaccharide-induced IL-1beta in IFN-gamma primed ex-vivo whole blood assay // *J. Endotoxin Res.* 2005. V. 11 (5). P. 281–286.
52. Zhu N., Gong Y., Chen X.D. et al. Association between the polymorphisms of interleukin-4, the interleukin-4 receptor

- gene and asthma // *Chin. Med. J. (Engl)*. 2013. V. 126. P. 2943–2951.
53. Zhang G., Zhou B., Wang W. et al. A functional single-nucleotide polymorphism in the promoter of the gene encoding interleukin 6 is associated with susceptibility to tuberculosis // *J. Infect. Dis*. 2012. V. 205. P. 1697–1704.
 54. Tang N.L., Fan H.P., Chang K.C. et al. Genetic association between a chemokine gene *CXCL-10* (IP-10, interferon gamma inducible protein 10) and susceptibility to tuberculosis // *Clin. Chim. Acta*. 2009. V. 406. P. 98–102.
 55. Arjomandi M., Galanter J.M., Choudhry S. et al. Polymorphism in osteopontin gene (*SPP1*) is associated with asthma and related phenotypes in a Puerto Rican population // *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol*. 2011. V. 24 (4). P. 207–214.
 56. Maalmi H., Sassi F.H., Berraies A. et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to asthma in Tunisian children: A case control study // *Hum. Immunol*. 2013. V. 74. P. 234–240.
 57. Saadi A., Gao G., Li H. et al. Association study between vitamin D receptor gene polymorphisms and asthma in the Chinese Han population: a case-control study // *BMC Med. Genet*. 2009. V. 10. P. 71.
 58. Cao S., Luo P.F., Li W. et al. Vitamin D receptor genetic polymorphisms and tuberculosis among Chinese Han ethnic group // *Chin. Med. J. (Engl)*. 2012. V. 125. P. 920–925.
 59. Gao L., Tao Y., Zhang L., Jin Q. Vitamin D receptor genetic polymorphisms and tuberculosis: updated systematic review and meta-analysis // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis*. 2010. V. 14. P. 15–23.
 60. Wu Y.J., Yang X., Wang X.X. et al. Association of vitamin D receptor Bsm1 gene polymorphism with risk of tuberculosis: a meta-analysis of 15 studies // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e66944.
 61. Poon A.H., Laprise C., Lemire M. et al. *NRAMP1* is not associated with asthma, atopy, and serum immunoglobulin E levels in the French Canadian population // *Genes Immun*. 2005. V. 6. P. 519–527.
 62. Meilang Q., Zhang Y., Zhang J. et al. Polymorphisms in the *SLC11A1* gene and tuberculosis risk: a meta-analysis update // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis*. 2012. V. 16. P. 437–446.
 63. Mokrousov I., Wu X.R., Vyazovaya A. et al. Polymorphism of 3'UTR region of *TNFR2* coding gene and its role in clinical tuberculosis in Han Chinese pediatric population // *Infect. Genet. Evol*. 2011. V. 11. P. 1312–1318.
 64. Möller M., Flachsbart F., Till A. et al. A functional haplotype in the 3'untranslated region of *TNFRSF1B* is associated with tuberculosis in two African populations // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2010. V. 181. P. 388–393.
 65. Amer G.A., El-Gazzar A.G. Circulating interleukin-18 and osteopontin in pulmonary tuberculosis patients and their correlation with disease activity // *Egyptian Journal of Medical Microbiology*. 2008. V. 17. P. 405–410.
 66. Wang J.P., Rought S.E., Corbeil J., Guiney D.G. Gene expression profiling detects patterns of human macrophage responses following *Mycobacterium tuberculosis* infection // *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003. V. 39. P. 163–172.
 67. Medoff B.D., Sauty A., Tager A.M. et al. IFN-gamma-inducible protein 10 (*CXCL10*) contributes to airway hyper-reactivity and airway inflammation in a mouse model of asthma // *J. Immunol*. 2002. V. 168. P. 5278–5286.
 68. Douni E., Kollias G. A critical role of the p75 tumor necrosis factor receptor (*p75TNF-R*) in organ inflammation independent of *TNF*, lymphotoxin alpha, or the *p55TNF-R* // *J. Exp. Med*. 1998. V. 188. P. 1343–1352.
 69. Syed F., Blakemore S.J., Wallace D.M. et al. *CCR7* (*EBI1*) receptor down-regulation in asthma: differential gene expression in human CD4+ T lymphocytes // *QJM*. 1999. V. 92. P. 463–471.
 70. Jain J., Valge-Archer V.E., Rao A. Analysis of the AP-1 sites in the *IL-2* promoter // *J. Immunol*. 1992. 148. P. 1240–1250.
 71. Thye T., Nejentsev S., Intemann C.D. et al. *MCP-1* promoter variant -362C associated with protection from pulmonary tuberculosis in Ghana, West Africa // *Hum. Mol. Genet*. 2009. V. 18. P. 381–388.
 72. Hoffmann S.C., Stanley E.M., Darrin Cox E. et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and *in vitro* cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes // *Transplantation*. 2001. V. 72. P. 1444–1450.
 73. Li X., Ampleford E.J., Howard T.D. et al. Behrens M.I., Lendon C., Roe C. M. A common biological mechanism in cancer and Alzheimer's disease? // *Curr Alzheimer Res*. 2009. V. 6. P. 196–204.
 74. Ibáñez K., Boulosa C., Tabarés-Seisdedos R. et al. Molecular evidence for the inverse comorbidity between central nervous system disorders and cancers detected by transcriptomic meta-analyses // *PLoS Genetics*. 2014. V. 10. P. e1004173.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ АТИПИЧНЫХ СЕМЕЙНЫХ МИКОБАКТЕРИОЗОВ НА ПОДВЕРЖЕННОСТЬ ТУБЕРКУЛЕЗУ В СИБИРСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ

А.Ф. Гараева¹, А.А. Рудко¹, Е.Ю. Брагина¹, М.Б. Фрейдин¹, Н.П. Бабушкина¹,
О.В. Колоколова², О.Н. Липаенкова³, В.П. Пузырёв¹

¹ НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

² Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

³ Томский фтизиопульмонологический медицинский центр, г. Томск

Туберкулез (ТБ) был и остается крайне актуальной проблемой всемирного здравоохранения: в 1991 г. ВОЗ объявило эту инфекцию глобальной проблемой [1]. Несмотря на все усилия врачей и совершенствование профилактических мер, в мире по разным оценкам регистрируется от 8 до 10 млн случаев впервые заболевших; кроме того, ежегодная смертность от ТБ и его осложнений достигает 2 млн случаев, т.е. среди инфекций стоит на втором месте по численности после СПИДа [2]. Одна из причин повышенного интереса к данному заболеванию – его непредсказуемое развитие: приблизительно треть мирового населения инфицировано *M. tuberculosis*, но лишь у 5–15% людей инфицирование приводит к развитию активного ТБ [3]. В противном случае это так называемая латентная ин-

фекция, которая может манифестировать в течение жизни при нарушении иммунологического баланса между патогеном и организмом хозяина, что служит триггерным фактором активации микобактерии [4].

Влияние наследственных факторов человека на развитие ТБ не вызывало сомнений задолго до открытия микобактерии. Данные, полученные в XX в., подтвердили наличие генетической компоненты предрасположенности к ТБ: свидетельством служат результаты многочисленных эпидемиологических, близнецовых и молекулярно-генетических исследований. В современной генетике подверженности ТБ можно выделить два основных направления исследований: анализ полигенной подверженности в эндемичных регионах и изучение семей с редкими формами подверженности микобактериальной ин-

фекции, проявляющимися моногенный (менделевский) характер наследования и полученными в связи с этим название в базе данных OMIM «синдром атипичных семейных микобактериозов» (синдром менделирующей подверженности к микобактериальным заболеваниям (МПМЗ)) (MIM 209950) [5].

МПМЗ – редкое наследственное фенотипически гетерогенное расстройство иммунитета, в результате которого у здоровых в отношении других заболеваний индивидов формируются атипичные реакции на нетуберкулезные микобактерии (слабовирулентные в норме). Пораженные индивиды чувствительны и к более вирулентному штамму – *M. tuberculosis*. Именно поэтому пациенты с клиническими проявлениями данного синдрома представляют интерес с точки зрения изучения генетической предрасположенности ТБ. Накоплена информация о мутациях шести генов, приводящих к клиническим проявлениям синдрома: *IL12B* (ген субъединицы р40 ИЛ-12), *IL12RB1* (субъединицы $\beta 1$ рецептора к ИЛ-12), *IFNGR1*, *IFNGR2* (кодирующие первый и второй домены рецептора к ИФН- γ), *STAT1* (ИФН- γ -ассоциированного сигнального трансдуктора и активатора транскрипции) а также ген *IKBKKG* (*NEMO*) – основного модулятора NF- κ -B. Эффект этих мутаций имеет общий патогенетический механизм и проявляется в ослаблении сигнала ИФН- γ – ключевого активатора антимикобактериальной активности макрофагов [6].

Неполная пенетрантность ряда мутаций, приводящих к этому синдрому, послужила основанием для предположения о том, что эти генетические дефекты могут быть распространены в общей популяции с более высокой, чем для мутаций (менее 1%), частотой. В свою очередь, это дает основание предполагать, что редкие полиморфизмы с сильным эффектом в отношении развития ТБ и низкой пенетрантностью могут быть существенной причиной подверженности ТБ в популяции, а не только в отдельных семьях. Результаты теоретического расчета доли менделевских случаев среди детского диссеминированного ТБ показали, что частота МПМЗ в данной группе может составлять от 3 до 45% [7]. То есть до половины случаев детского ТБ может быть обусловлено наличием менделеевской предрасположенности. Кроме того, эти мутации могут играть значительную роль в восприимчивости ТБ и у взрослого населения. Изучения данных мутаций в России ранее не проводилось. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение влияния мутаций и полиморфизмов генов *IL12B*, *IL12RB1*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IKBKKG* на подверженность различным формам ТБ в популяциях Сибири.

Материал и методы

Материалом для настоящего исследования послужила ДНК неродственных между собой русских жителей Томской области (331 человек; 113 женщин, 218 мужчин, средний возраст составил $(31,7 \pm 15,4)$ года) и 238 коренных жителей Республики Тыва (116 женщин, 122 мужчины, средний возраст $(33,5 \pm 12,9)$). Всем им был выставлен диагноз первичного ТБ легких или тяжелых форм ТБ вторичного генеза (диссеминированная форма, фиброзно-кавернозный ТБ и др.). Контрольные выборки составили 279 русских (208 женщин, 71 мужчин, средний возраст $(45,4 \pm 21,7)$ года) и 265 тувинцев (63 жен-

щины и 202 мужчины, средний возраст $(33,1 \pm 8,5)$ года), не имевших ТБ в анамнезе.

Для поиска новых мутаций и полиморфизмов генов, вовлеченных в патогенез противомикобактериального иммунного ответа, на базе детского легочно-туберкулезного отделения железнодорожной больницы при участии сотрудников кафедры фтизиатрии Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск) была сформирована группа из 10 детей в возрасте от 2 до 18 лет с генерализованными формами ТБ и тяжелыми осложнениями БЦЖ-вакцинации.

Генотипирование осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующего ПДРФ-анализа. Для проведения ПЦР использовались структуры праймеров, подобранных с помощью программы Primer3 0.4.0 (<http://gmdd.shgmo.org/primer3/>). Поиск новых мутаций исследуемых генов проводили по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3130xl. Для сиквенса были выбраны только транскрируемые экзоны, для обнаружения возможных мутаций сплайсинга праймеры были подобраны так, чтобы продукты амплификации перекрывали интрон-экзонную область. Анализ результатов секвенирования проводился с использованием программных пакетов BioEdit и Sequence Scanner 1.0.

Распределение генотипов по исследованным полиморфизмам проверялось на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью точного теста Фишера [8]. Поиск ассоциации маркеров исследуемых генов с ТБ и его отдельными формами проводили путем сравнения частот аллелей и генотипов между группами больных и здоровых индивидов, используя критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность. Об ассоциации разных генотипов (или их комбинаций) и аллелей с заболеванием судили также по величине отношения шансов (odds ratio (OR)), которая показывает, во сколько раз у индивида с определенным генотипом (или комбинацией генотипов) выше вероятность заболеть [9].

Результаты и обсуждение

На первом этапе проведено скрининговое исследование распространенности 12 мутаций, обнаруженных ранее хотя бы в двух независимых случаях МПМЗ в мире: *IL12RB1* – Gln32Ter, Gln376Ter, Arg213Trp; *IFNGR1* – Ile87Thr, 4-bp Del NT818, 1-bp Del NT818; *IFNGR2* – 2-bp Del278AG, Thr168Asn, 663Del27; *STAT1* – Leu706Ser, Gln463His, Glu320Gln у больных ТБ русских и тувинцев с наиболее тяжелым течением заболевания (76 и 38 человек соответственно). В результате по всем изученным мутациям установлен мономорфизм по нормальным аллелям, что свидетельствует об отсутствии в исследованных группах больных с синдромом МПМЗ, обусловленным перечисленными мутациями, однако не исключает наличия других причинных мутаций, предрасполагающих к развитию данного синдрома в нашем регионе. Это согласуется с предположением исследователей о том, что генетическая этиология примерно 50% случаев МПМЗ остается невыясненной [10].

На втором этапе исследования для поиска мутаций и полиморфизмов у детей с генерализованными формами туберкулеза и осложнениями БЦЖ-вакцинации (10 человек) проведено секвенирование 65 локусов. В результате секвенирования иденти-

фицированы 15 полиморфных вариантов, локализованных в различных регионах исследуемых генов. Среди выявленных полиморфизмов семь располагались в интронных, два – в нетранслируемых областях генов, три полиморфизма приводят к синонимичной замене нуклеотидов и не отражаются на строении белка, а три полиморфизма известны как миссенс-мутации, два из которых расположены в гене *IL12RB1* и один – в гене *IFNGR1* (табл. 1).

Для выявленных вариантов, за исключением синонимичных замен, выполнен поиск ассоциаций с ТБ методом «случай – контроль» в двух популяциях (русские и тувинцы). Кроме того, в связи с невозможностью подбора условий для ПДРФ-анализа трех SNPs в генах *IFNGR1* (rs11754268, rs11575936) и *IFNGR2* (rs17883129) данные варианты были исключены из анализа. Таким образом, для генотипирования были отобраны девять табл. 2. табл. 2.

Таблица 1

Полиморфные варианты генов МПМЗ, обнаруженные при секвенировании детей с тяжелым течением туберкулеза и осложнениями БЦЖ-вакцинации

| Тип замены | мРНК | | Протеин | |
|-------------------------|-------------------|--------------------|---------|--------------------------------|
| | Позиция | Замена аллеля | Позиция | Замена аминокислоты |
| <i>IL12RB1</i> | | | | |
| Синонимичная rs11086087 | 451 (экзон 5) | CTG→GTA GTG→GTC | 129 | V[Val]→V[Val] V[Val]→V[Val] |
| Миссенс rs11575934 | 705 (экзон 7) | CAG→CGG | 214 | Q[Gln]→R[Arg] |
| Синонимичная rs17852635 | 748 (экзон 7) | CCC→CCT | 228 | P[Pro]→P[Pro] |
| Миссенс rs401502 | 1196 (экзон 10) | GGG→CGG | 378 | G[Gly]→R[Arg] |
| rs12461312 | 32041 (интрон 13) | A/C | – | – |
| rs17882555 | 32018 (интрон 13) | C/T | – | – |
| rs3746190 | 2087 (3'UTR) | C/T | – | – |
| <i>IL12B</i> | | | | |
| rs919766 | 14918 (интрон 3) | A/C | – | – |
| <i>IFNGR1</i> | | | | |
| rs2234711 | 48 (5'UTR) | C/T | – | – |
| rs7749390 | 5198 (интрон 1) | A/G | – | – |
| rs17181457 | 5233 (интрон 1) | C/T | – | – |
| Миссенс rs11575936 | 143 (экзон 1) | GTG→ATG | 14 | V[Val] →M[Met] |
| Синонимичная rs11914 | 153 (экзон 7) | TCT→TCG | 350 | S[Ser] →S[Ser] |
| <i>IFNGR2</i> | | | | |
| rs17883129 | 34996 (интрон 6) | C/T | – | – |
| <i>STAT1</i> | | | | |
| rs2066797 | 29554 (интрон 9) | A/G | – | – |

Таблица 2

Частоты аллелей и генотипов у тувинцев и русских при сравнении больных туберкулезом и контрольной группы

| Ген (полиморфизм) | Генотип, аллель | Русские, абс. (%) | | Тувинцы, абс. (%) | |
|-------------------------------|-----------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|
| | | Больные ТБ | Здоровые | Больные ТБ | Здоровые |
| <i>IL 12 RB1</i> (rs11575934) | AA | 134 (43,51) | 103 (40,87) | 64 (36,36) | 72 (34,12) |
| | AG | 138 (44,81) | 125 (49,80) | 78 (44,32) | 96 (45,71) |
| | GG | 36 (11,69) | 23 (9,13) | 34 (19,32) | 42 (20,00) |
| | G | 34,1 | 34,0 | 41,5 | 42,9 |
| $\chi^2 (p)^*$ | | 1,768 (0,413) | | 0,181 (0,913) | |
| $\chi^2 (p)^{\#}$ | | 0,003 (0,957) | | 0,098 (0,754) | |
| <i>IL 12 RB1</i> (rs17882555) | TT | 57 (19,00) | 49 (21,12) | 43 (25,44) | 58 (26,13) |
| | TC | 132 (44,00) | 111 (47,84) | 78 (46,15) | 116 (52,25) |
| | CC | 111 (37,00) | 72 (31,03) | 48 (28,40) | 48 (21,62) |
| | T | 41,0 | 45,1 | 48,5 | 52,3 |
| $\chi^2 (p)^*$ | | 2,072 (0,355) | | 2,533 (0,282) | |
| $\chi^2 (p)^{\#}$ | | 1,586 (0,208) | | 0,925 (0,336) | |
| <i>IL 12 RB1</i> (rs401502) | CC | 33 (11,38) | 23 (9,70) | 41 (19,62) | 35 (16,20) |
| | CG | 122 (42,07) | 104 (43,88) | 94 (44,98) | 106 (49,07) |
| | GG | 135 (46,55) | 110 (46,41) | 74 (35,41) | 75 (34,72) |
| | C | 32,4 | 31,6 | 42,1 | 40,7 |
| $\chi^2 (p)^*$ | | 0,445 (0,801) | | 1,085 (0,581) | |
| $\chi^2 (p)^{\#}$ | | 0,040 (0,842) | | 0,112 (0,738) | |
| <i>IL 12 RB1</i> (rs3746190) | CC | 118 (35,87) | 80 (33,06) | 59 (29,06) | 54 (28,27) |
| | CT | 154 (46,81) | 117 (48,35) | 99 (48,77) | 87 (45,55) |
| | TT | 57 (17,33) | 45 (18,60) | 45 (22,17) | 50 (26,18) |
| | T | 40,7 | 42,7 | 46,6 | 49,0 |
| $\chi^2 (p)^*$ | | 0,513 (0,774) | | 0,894 (0,640) | |
| $\chi^2 (p)^{\#}$ | | 0,397 (0,529) | | 0,364 (0,546) | |

Окончание табл. 2

| Ген (полиморфизм) | Генотип, аллель | Русские, абс. (%) | | Тувинцы, абс. (%) | |
|-------------------------------|--------------------|----------------------|-------------|-------------------|-------------|
| | | Больные ТБ | Здоровые | Больные ТБ | Здоровые |
| <i>IL 12 RB1</i> (rs12461312) | GG | 97 (30,79) | 74 (30,45) | 46 (22,12) | 62 (25,41) |
| | TG | 153 (48,57) | 124 (51,03) | 105 (50,48) | 107 (43,85) |
| | TT | 65 (20,63) | 45 (18,52) | 57 (27,40) | 75 (30,74) |
| | T | 44,9 | 44,0 | 52,6 | 52,6 |
| χ^2 (p)* | | 1,484 (0,785) | | 2,989 (0,370) | |
| χ^2 (p)# | | 0,055 (0,814) | | 0,004 (0,951) | |
| <i>STAT1</i> (rs2066797) | AA | 249 (92,57) | 192 (84,58) | 113 (66,08) | 116 (67,05) |
| | AG | 19 (7,06) | 34 (14,98) | 41 (23,98) | 45 (26,01) |
| | GG | 1 (0,37) | 1 (0,44) | 17 (9,94) | 12 (6,94) |
| | G | 3,9 | 7,9 | 21,9 | 19,9 |
| χ^2 (p)* | | 8,114 (0,017) | | 1,076 (0,584) | |
| χ^2 (p)# | | 6,645 (0,010) | | 0,299 (0,584) | |
| <i>IFN GR1</i> (rs2234711) | CC | 47 (16,73) | 46 (18,78) | 18 (9,89) | 16 (9,25) |
| | TC | 149 (53,02) | 117 (47,76) | 81 (44,51) | 58 (33,53) |
| | TT | 85 (30,25) | 82 (33,47) | 83 (45,60) | 99 (57,23) |
| | C | 43,24 | 42,65 | 32,1 | 26,0 |
| χ^2 (p)* | | 1,457 (0,483) | | 5,105 (0,078) | |
| χ^2 (p)# | | 0,017 (0,897) | | 2,938 (0,086) | |
| <i>IFN GR1</i> (rs7749390) | AA | 70 (30,04) | 80 (34,39) | 76 (41,08) | 63 (43,15) |
| | AG | 111 (47,64) | 108 (47,16) | 87 (47,03) | 64 (43,84) |
| | GG | 52 (22,32) | 41 (17,00) | 22 (11,89) | 19 (13,01) |
| | G | 46,1 | 40,6 | 35,4 | 34,9 |
| χ^2 (p)* | | 1,974 (0,373) | | 0,348 (0,840) | |
| χ^2 (p)# | | 1,846 (0,174) | | 0,002 (0,964) | |
| <i>IFN GR1</i> (rs17181457) | CC | 241 (86,07) | 225 (91,09) | 186 (97,38) | 153 (99,35) |
| | CT | 38 (13,57) | 20 (8,10) | 5 (2,65) | 1 (0,65) |
| | TT | 1 (0,36) | 2 (0,81) | 0 (0) | 0 (0) |
| | T | 7,1 | 4,9 | 1,3 | 0,3 |
| χ^2 (p)* | | 4,42 (0,11) | | 0,571 (0,752) | |
| χ^2 (p)# | | 2,018 (0,155) | | 0,006 (0,937) | |

Примечание. χ^2 – критерий Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность; p – уровень значимости различий; * – при сравнении генотипов; # – при сравнении аллелей.

Отклонение от равновесия Харди–Вайнберга выявлено только для rs2066797 гена *STAT1*, что может быть обусловлено подразделенностью популяций по отношению к данному локусу или его возможной патогенетической значимостью в отношении ТБ.

При анализе результатов исследования не было показано значимых различий частот аллелей и генотипов исследуемых генов между больными ТБ и контрольной выборкой тувинцев. Возможно, для данной этнической группы причинными в отношении развития туберкулеза являются другие полиморфные варианты генов иммунного ответа.

У русских зафиксированы значимые различия частот генотипов и аллелей между больными и группой контроля: среди больных ТБ аллель А и генотип АА гена *STAT1* (rs2066797) встречался чаще по сравнению с альтернативными вариантами ($p = 0,017$). Аллель А и генотип АА данного полиморфного варианта связаны с риском развития ТБ (OR = 2,12; 95%-й CI 1,18–3,82; $p = 0,0066$; OR = 2,27; 95%-й CI 1,23–4,23; $p = 0,0048$ – для аллеля и генотипа соответственно). Частота минорного аллеля G у больных составила 3,9%, а в группе контроля она оказалась в 2 раза выше – 7,9%, что свидетельствует о его протективной роли в отношении развития ТБ (OR = 0,47; 95%-й CI 0,26–0,85; $p = 0,0066$). Установлено также, что риск развития заболевания снижен у индивидов с гетерозиготным генотипом AG (OR = 0,43; 95%-й CI 0,23–0,81; $p = 0,0045$).

Существует предположение о том, что первичный и вторичный туберкулез имеют разную иммунопатогенетическую основу [7]. В связи с этим в выборке русских произведен поиск ассоциации исследуемых полиморфизмов с ТБ, исходя из периода инфицирования: первичная форма заболевания (61 человек) и вторичная (270 человек) ТБ. В данных подгруппах была проведена сравнительная оценка распространенности аллелей и генотипов относительно контрольной группы. При сравнении группы больных первичным ТБ с контролем не было установлено значимых различий частот аллелей и генотипов. При рассмотрении группы с вторичным ТБ наблюдается картина, схожая с описанным выше сравнением общей группы больных: статистически значимые различия были идентифицированы также для rs2066797 гена *STAT1* ($\chi^2 = 7,038$; $p = 0,030$) в сравнении с контролем.

При рассмотрении отношения шансов установлено, что аллель А rs2066797 гена *STAT1* и генотип АА являются рисковыми в отношении развития вторичного ТБ (OR = 2,16; 95%-й CI 1,16–4,08; $p = 0,0091$; OR = 2,20; 95%-й CI 1,15–4,24; $p = 0,0102$ – для аллелей и генотипов соответственно). Протективный в отношении ТБ эффект выявлен соответственно для аллеля G (OR = 0,46; 95%-й CI 0,24–0,86; $p = 0,0091$) и гетерозиготного генотипа AG (OR = 0,47; 95%-й CI 0,24–0,90; $p = 0,0145$).

На следующем этапе был проведен поиск ассоциаций исследуемых полиморфизмов с отдельными клиническими формами заболевания. В расчет были взяты две наиболее распространенные среди пациентов формы: инфильтративная (155 человек) и диссеминированная (68 человек). Для обеих подгрупп было проведено сравнение с контрольной выборкой.

При сравнении с контролем пациентов с инфильтративным ТБ были получены значимые различия для rs17882555 гена *IL12RB1* ($\chi^2 = 15,243$; $p = 0,000$). При рассмотрении отношения шансов для rs17882555 гена *IL12RB1* оказалось, что носительство аллеля С и генотипа СС повышает риск развития инфильтративного ТБ (OR = 1,80; 95%-й CI 1,32–2,46; $p = 0,0001$; OR = 2,42; 95%-й CI: 1,48–3,94; $p = 0,0001$ – для аллеля и генотипа соответственно).

Продукт гена *IL12RB1* (OMIM 601604) – субъединица IL-12R β 1, которая в комплексе с IL-12R β 2 образует высокоаффинный рецептор к IL12. При контакте цитокина с рецептором запускается каскад реакций, индуцирующий в конечном счете секрецию ИФН- γ . Ген *IL12RB1* активно исследовался в отношении предрасположенности к ТБ. Полиморфизм rs17882555 локализован в интроне 13 и, вероятно, изменяет функциональную активность мРНК. В доступной литературе не удалось обнаружить данных об ассоциации данного полиморфизма с ТБ.

Продукт гена *STAT1* (OMIM 600555) играет ключевую роль в активации клеточного звена иммунитета. Он является внутриклеточным мессенджером сигналов ИФН- γ и ИФН- α/β , активируя транскрипцию генов иммунного ответа. Учитывая разнонаправленность функционирования интерферонов различных типов, пациенты с мутациями гена *STAT1* проявляют повышенную восприимчивость не только к внутриклеточным бактериям, но и вирусам (наиболее часто описаны вирус простого герпеса 1-го типа, вирус Эпштейна–Барр). Для пациентов характерны крайне тяжелые клинические проявления и неблагоприятный прогноз. Ассоциация полиморфного варианта гена *STAT1* (rs2066797) в настоящем исследовании выявлена впервые. Этот полиморфный вариант расположен в интроне 9 и его связь с заболеванием у русских, вероятнее всего, обусловлена неравновесием по сцеплению с другим, действительно причинным вариантом гена.

Заключение

Состояние иммунной системы индивида очень важно для полноценного антимикобактериального ответа. Критическое значение это имеет и для туберкулезной инфекции: именно нарушение иммунологического баланса между организмом-хозяином и микобактерией может препятствовать полному элиминированию патогена из организма человека или являться триггерным фактором активации латентного ТБ. Поэтому так важно правильное функционирование отдельных звеньев иммунного ответа, которое определяется наличием или отсутствием генетических перестроек ключевых молекул.

В настоящем исследовании изучалась группа генов, ответственных за развитие синдрома МПМЗ в свете подверженности ТБ. У пациентов с наиболее тяжелыми проявлениями заболевания не выявлены мутации, ответственные за развитие синдрома МПМЗ. При поиске ассоциации с ТБ обнаруженных при секвенировании полиморфизмов генов МПМЗ

выявлены ассоциации только в группе славянского населения Томской области. Отсутствие связи изученных генов с заболеванием в группе тувинцев может быть обусловлено их слабым влиянием на подверженность ТБ и возможным наличием в данной популяции других генов с относительно сильным эффектом (главные гены), действие которых может усугубляться генами, рассмотренными в настоящем исследовании. «Эффект главного гена» в отношении ТБ может проявляться в случае заражения *M. tuberculosis* популяции, ранее с бактерией не сталкивавшихся [15]. Классическим примером являются вспышки заболеваемости среди аборигенов Северной Америки [16]. Ранее уже выдвигалось предположение о наличии данного эффекта у населения Тувы, так как тувинская популяция столкнулась с микобактерией сравнительно недавно – предположительно в середине XX в. [17].

Полиморфные варианты гена *STAT1* (rs2066797) определяют общую подверженность ТБ независимо от формы и периода инфицирования индивида. В то же время установлено влияние rs17882555 гена *IL12RB1* на развитие исключительно инфильтративного ТБ у русских пациентов. Суммируя вышеизложенное, важно отметить, что особый интерес представляет дальнейшее изучение этих полиморфных вариантов в других сибирских популяциях с высокой распространенностью ТБ. Обнаруженные ассоциации подтверждают значимую роль кодируемых генами *STAT1* и *IL12RB1* белков в антимикобактериальном иммунитете и требуют дальнейшего детального изучения.

Литература

1. Lin P. L., Flynn J.A.L. Understanding latent tuberculosis: a moving target // *J. Immunol.* 2010. V. 1. P. 15–22.
2. Sahiratmadja E., Baak-Pablo R., de Visser A.W. Association of polymorphisms in IL-12/IFN- γ pathway genes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Indonesia // *Tuberculosis*. 2007. V. 4. P. 303–311.
3. Möller M., de Wit E., Hoal E.G. Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2009. V. 2. P. 1–24.
4. Lin M.Y., Ottenhoff T.H.M. Host-pathogen interactions in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: identification of new targets for tuberculosis intervention // *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets*. 2008. V. 8. P. 15–29.
5. Ottenhoff T.H.M., Verreck F.A.W., Hoeve M.A., van de Vosse E. control of human host immunity to mycobacteria // *Tuberculosis*. 2005. V. 85. P. 53–64.
6. Salem S., Gros P. Genetic determinants of susceptibility to mycobacterial infections: *IRF8*, a new kid on the block // *Adv Exp Med Biol.* 2013. V. 783. P. 45–80.
7. Alcais A., Fieschi C., Abel L., Casanova J.L. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases // *J. Exp. Med.* 2005. V. 202. P. 1617–1621.
8. Веър Б. Анализ генетических данных: пер. с англ. М.: Мир, 1995. 400 с.
9. Pearce N. What does the odds ratio estimate in a case-control study? // *Int. J. Epidemiol.* 1993. V. 26 (6). P. 1189–1192.
10. Al-Muhsen S., Casanova J.L. The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008. V. 122. P. 1043–1051.
11. Jülicher S., Bongartz M., Luty A.J. et al. Functional analysis of a promoter variant of the gene encoding the interferon-gamma receptor chain I // *Immunogenetics*. 2003. V. 54 (10). P. 675–680.
12. Cooke G.S., Campbell S.J., Sillah J. et al. Polymorphism within the Interferon- γ /receptor complex is associated with

- pulmonary tuberculosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006. V. 174. P. 339–343.
13. Stein C.M., Zalwango S., Chiunda A.B. et al. Linkage and association analysis of candidate genes for TB and TNF α cytokine expression: evidence for association with *IFNGR1*, *IL-10*, and *TNF* receptor 1 genes // *Hum. Genet.* 2007. V. 121. P. 663–673.
 14. Hijikata M., Shojima J., Matsushita I. et al. Association of *IFNGR2* gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis among the Vietnamese // *Hum. Genet.* 2012. V. 131. P. 675–682.
 15. Abel L., Casanova J.-L. Genetic predisposition to clinical tuberculosis: bridging gap between simple and complex inheritance // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 67. P. 274–277.
 16. Stead W.W. The origin and erratic global spread of tuberculosis. How the past explains the present and is the key to the future // *Clin. Chest. Med.* 1997. V. 18 (1). P. 65–77.
 17. Фрейдлин М.Б. Сравнительный анализ структуры наследственной компоненты подверженности туберкулезу у тувинцев и русских // *Молекулярная биология.* 2006. Т. 40, № 2. С. 252–262.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КЛАССОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ СТРУКТУРНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ С

И.А. Гончарова¹, Е.В. Белобородова²

¹ НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

² Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Введение

Сложнонаследуемые многофакторные заболевания человека ассоциированы с многочисленными генетическими вариантами с незначительным фенотипическим эффектом. В связи с этим в формировании конечного фенотипа заболевания принимают участие множество совместно функционирующих генов, образующих генные кластеры или модули коэкспрессирующихся генов [1]. Исследования вариаций в генной экспрессии могут обеспечить подход для выявления связи между специфическими генами и заболеванием, выявить генетические факторы, влияющие на течение, исход заболевания и ответ на терапию. Так, например, разные стадии фиброза печени характеризуются различным паттерном экспрессии. Показано, что при более тяжелом фиброзе увеличивается экспрессия генов: цитоскелета (*KRT19*, *SCG10*); факторов роста и цитокинов (*CXCL6*, *IL8*, *IL1A*, *IL2*, *CXCL10*); рецепторов факторов роста (*CCR2*, *CXCR3*, *CXCR4*), продукции и ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса (*COL1A1*, *CHI3*, *SPP1*, *TIMP1*, *MMP7*, *MMP9*); межклеточных взаимодействий (*ITGA2*, *CLDN4*) [2]. Функционирование интерферонрегулируемых генов у человека во многом определяет подверженность к хронизации вирусного гепатита С и ответ на интерферонотерапию. Показано, что уровень экспрессии интерферониндуцированных генов *IFI27*, *IFIT1*, *IFI6*, *ISG15*, *CXCL10* является маркером ответа на комбинированную терапию интерфероном и рибавирином у больных HCV [3].

Внутренними факторами, влияющими на функционирование генного модуля, могут быть мутации, структурный полиморфизм, эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов. Например, в экспериментальных исследованиях на культурах клеток было показано, что VNTR-полиморфизм гена *NOS3* влияет на его экспрессию путем продукции микроРНК, регулирующей экспрессию как гена *NOS3*, так и других генов [4]. При инфекционных заболеваниях экспрессия гена *IL28B* является генотипспецифической. Было выявлено, что у инфицированных Т-лимфотропным вирусом человека типа 1 (HTLV-1) и у больных Т-клеточной лейкемией наибольшее повышение уровня экспрессии гена *IL28B* наблюдается у носителей генотипа ТТ по поли-

морфному варианту rs8099917. Такой зависимости не наблюдается у здоровых лиц и не инфицированных вирусом HTLV-1 [5].

Инфекционные заболевания можно рассматривать как внешние факторы, оказывающие влияние на функционирование генного модуля. Так, было показано, что вирус гепатита С (HCV) изменяет экспрессию многих генов в культуре клеток. Например, при заражении культур гепатоцитов мыши наблюдается увеличение экспрессии генов цитокиновых рецепторов (*EB13*, *IGFII*); ингибиторов циклинзависимых киназ (*CDKN1C*); хемокинов (*IP-10*); апоптоза (*IGF β* , *TP53*, *SARP3*), регулируемые интерфероном (*STAT1*, *STAT2*, *IFI27*, *MX1*); антивирусного ответа (*SOCS2*); метаболизма липидов (*GGPS1*, *PGGT1B*) и понижение уровня экспрессии генов антиоксидантного ответа (*GSTM1*, *ATOX1*, *GLRX*) и TLR4-сигнального пути [6, 7].

Таким образом, в настоящем исследовании была сделана попытка проверки следующей гипотезы: структурный полиморфизм может быть внутренним фактором, определяющим особенности функционирования генома человека посредством взаимовлияния полиморфных вариантов генов на экспрессию ближайших членов генного модуля, а внешние факторы, такие как HCV, могут определять особенности такого взаимовлияния, характеризующие патогенез хронического вирусного гепатита.

Материал и методы

В исследование были включены больные хроническим вирусным гепатитом С русской национальности (39 человек), проживающие в г. Томске. Среди обследованных было 24 мужчины и 15 женщин в возрасте от 20 до 56 лет. Критериями для включения в исследование служили серологические маркеры хронического вирусного гепатита С, обнаруженные в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа и РНК вируса гепатита С, выявленная с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для морфологической верификации диагноза у всех больных проведена биопсия печени.

Непосредственно после биопсии образцы ткани были помещены в жидкий азот и хранились там до момента выделения РНК. Выделение РНК из биоптатов печени проводили с использованием набора TRIzol Reagent (Invitrogen). Из мРНК получали кДНК

при помощи реакции обратной транскрипции с использованием набора High capacity cDNA Reverse transcription Kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems). ПЦР проводили в режиме реального времени (RT-PCR) на приборе iCycler iQ (Applied Biosystems). Уровень экспрессии каждого исследуемого гена оценивали методом калибровочной кривой, построенной по пяти точкам посредством серии разведений образца РНК с известной концентрацией [8].

Для оценки уровней экспрессии генов *IFNG*, *IFNGR*, *IL10*, *IL12B*, *IL12RB1*, *CTLA4*, *TLR4*, *ACE*, *NOS3*, *TNF* использовали наборы реагентов TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems), содержащие специфические ПЦР-праймеры и TaqMan пробу. Для каждого исследуемого образца реакцию RT-PCR проводили в трех повторах одновременно. Для нормализации значений уровня экспрессии исследованных генов использовали ген домашнего хозяйства *GAPDH*.

Для изучения зависимости уровня экспрессии исследованных генов от наличия структурного полиморфизма из биоптатов печени выделяли ДНК с использованием набора TRIzol Reagent (Invitrogen) по методике, указанной производителем. Генотипирование полиморфных вариантов генов *NOS3* (T-786C – rs2070744; G894T – rs1799983; VNTR – rs не определен), *TNFA* (G-308A – rs1800629), *TNFB* (A252G – rs909253), *TNFRSF1B* (T676G – rs1061622), *IL4* (G+717C – rs2243291), *IL4RA* (A2726G – rs2074570; Q416R – rs1801275), *IL12B* (A1188C – rs3212227; G-405T – rs3212220), *IL12RB1* (C2087T – rs3746190), *IFNG* (T-1488C – rs2069705), *IFNGR2* (G-1704/del – rs17880053) осуществляли путем ПДРФ-анализа продуктов амплификации по ранее описанной методике [9, 10]. Электрофорез проводили в 3%-м агарозном геле в течение 40 мин при напряжении 110 Вт. Гель окрашивали бромистым этидием. Визуализацию фрагментов проводили с помощью установки фирмы BioRad в проходящем ультрафиолетовом свете.

Оценку различий в уровне экспрессии осуществляли путем сравнения средних значений нормализованных показателей уровня экспрессии каждого гена между носителями различных генотипов по вышеуказанным полиморфным вариантам по критерию Стьюдента или Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

В данном исследовании была изучена зависимость изменений уровня экспрессии генов от наличия структурного полиморфизма. Не показано зависимости уровня экспрессии для каждого гена от генотипов по исследованным полиморфным вариантам, расположенным в пределах его нуклеотидной последовательности. Было выявлено влияние полиморфных вариантов, расположенных в пределах одних генов на экспрессию других генов. Например, наблюдалось различие в уровне экспрессии гена *ACE* в ткани печени у лиц с различными генотипами по полиморфному варианту T-786C (rs2070744) гена *NOS3*. У носителей генотипа СТ количество мРНК гена *ACE* было выше относительно генотипов ТТ и СС (табл. 1). Кроме этого, уровень экспрессии гена *ACE* менялся в зависимости от генотипов по полиморфному варианту гена рецептора интерлейкина-4 – *IL4RA* Q416R (rs1801275). Гетерозиготный генотип QR обуславливал более высокий уровень экспрессии гена *ACE* (табл. 1).

Таблица 1
Зависимость уровня экспрессии генов *ACE*, *TLR4*, *IL12B* от структурного полиморфизма генов *NOS3*, *IL4RA*, *IFNG*

| Ген | Генотип | N | \bar{x} | σ | p |
|--------------------------------------|---------|----|-----------|----------|-------|
| Уровень экспрессии гена <i>ACE</i> | | | | | |
| <i>NOS3</i> rs2070744 | TT | 24 | 0,69 | 0,55 | 0,055 |
| | CT | 13 | 2,01 | 2,61 | |
| | CC | 2 | 0,55 | 0,68 | |
| | TT+CC | 26 | 0,68 | 0,54 | 0,015 |
| <i>IL4RA</i> rs1801275 | QQ | 25 | 0,74 | 0,49 | 0,050 |
| | QR | 14 | 1,81 | 2,60 | |
| Уровень экспрессии гена <i>TLR4</i> | | | | | |
| <i>NOS3</i> rs1799983 | GG | 23 | 0,58 | 0,43 | 0,014 |
| | GT | 12 | 1,44 | 1,05 | |
| | TT | 4 | 0,39 | 0,27 | |
| | GG+TT | 27 | 0,55 | 0,41 | 0,002 |
| Уровень экспрессии гена <i>IL12B</i> | | | | | |
| <i>IFNG</i> rs2069705 | TT | 20 | 0,04 | 0,05 | 0,020 |
| | TC | 14 | 0,16 | 0,32 | |
| | CC | 5 | 0,34 | 0,24 | |
| | TC+CC | 19 | 0,29 | 0,30 | 0,018 |

Примечание. p – уровень значимости, полученный при сравнении средних значений уровня экспрессии исследуемого гена t-критерием Стьюдента; N – число человек в группе; \bar{x} – среднее значение уровня экспрессии исследуемого гена, нормализованного по гену домашнего хозяйства *GAPDH*; σ – стандартное отклонение.

Известно, что повышение уровня NO может приводить к эндотелиальной дисфункции клетки, повреждению тканей, повышению проницаемости сосудов, образованию свободных радикалов (пероксинитрита) и индукции цитотоксичности. Полиморфные варианты, расположенные в различных регионах гена, могут изменять его экспрессионную активность и влиять на продукцию NO. Ранее получены данные о влиянии промоторного полиморфного варианта T-786C гена *NOS3* на продукцию NO, которые, однако, являются противоречивыми. С одной стороны, показано, что замена тимина на цитозин в -786 положении (T-786C) промотора гена *NOS3* приводит к повышению его активности. В культуре эндотелиальных клеток активность промотора с аллелем С составила 84%, тогда как наличие аллеля Т обеспечивало только 16% активности [11]. С другой стороны, у больных системной красной волчанкой гомозиготных носителей аллеля С уровень мРНК составляет 30% от уровня, характерного для аллеля Т [12]. Молекулярным механизмом такого снижения может быть связывание с мутантным аллелем белка RPA1 (репликационный протеин А1), который приводит к репрессии транскрипции гена, уменьшением уровня NO в сыворотке крови и его биодоступности [13]. Поскольку NO является физиологически активным веществом, участвующим в поддержании сосудистого гомеостаза, внутриклеточной передаче сигналов и экспрессии различных генов [14], вероятно, что полиморфный вариант T-786C может не только изменять активность своего промотора, но и опосредованно влиять на экспрессию других генов.

В настоящем исследовании показано, что на уровень экспрессии гена *TLR* оказывает влияние полиморфный вариант G894T (rs1799983) гена *NOS3*. Выявлено, что у носителей гетерозиготного генотипа GT уровень экспрессии выше, чем у лиц с генотипами GG и TT (табл. 1). Замена гуанина на тимин в позиции 894 (G894T) гена *NOS3* приводит

к замене глутаминовой кислоты на аспарагиновую в положении 298 фермента (Glu298Asp или E298D) [15]. Предполагают, что полиморфные варианты T-786C, VNTR и G894T объединены в гаплотип, и поэтому в одинаковой степени влияют на экспрессию гена *NOS3* [12, 16].

Кроме этого, в настоящем исследовании выявлено, что генотип по полиморфному варианту C3511T (rs2069705) гена *IFNG* является фактором, влияющим на уровень экспрессии гена *IL12B*. Показано, что аллель С ассоциирован с более высоким уровнем экспрессии гена *IL12B* и его наличие в гетеро- или гомозиготном состоянии приводит к постепенному повышению активности гена (см. табл. 1). В свою очередь, на экспрессию гена *IFNG* оказывает влияние полиморфный вариант A2726G (rs2074570) гена *IL4RA*. У носителей гетерозиготного генотипа AG уровень экспрессии гена *IFNG* выше, чем у носителей генотипа AA ($1,57 \pm 1,81$ и $0,64 \pm 0,57$ соответственно; $p = 0,035$).

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что на экспрессию гена *ACE* может оказывать влияние структурный полиморфизм генов *NOS3* и *IL4RA*, который, кроме этого, может влиять на экспрессию генов *TLR4* и *IFNG*. Полиморфный вариант гена *IFNG*, в свою очередь, влияет на экспрессию гена *IL12B* (рис. 1).

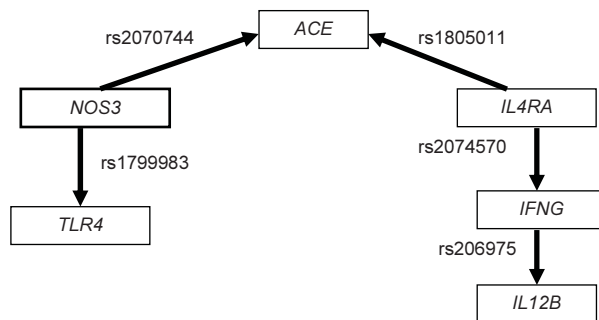


Рис. 1. Структурно-функциональные взаимодействия генов

В настоящее время большое внимание исследователей привлекает проблема роли цитокиновой системы в патогенезе хронических заболеваний печени, а также механизмы ее взаимодействия с другими регуляторными системами организма [17]. Для

цитокинов характерны плейотропность, дублирующие и перекрывающиеся эффекты (взаимозаменяемость и взаимодополняемость), а также взаимодействие в каскадах единой регуляторной сети, где они оказывают значительное влияние на выработку друг друга. Показано, что противовоспалительные цитокины (IL4, IL10, IL13) способны подавлять транскрипцию генов провоспалительных цитокинов (IL1, IL6, IL8, IL12, TNF α , IFN γ) в клетках-продуцентах [18]. Доказательства взаимовлияния цитокинов друг на друга приводятся в экспериментальных исследованиях. Так, например, в литературе описан семейный генетический дефект синтеза IL12 моноцитами, который, в свою очередь, приводит к дефекту синтеза IFN мононуклеарами в ответ на индукцию фитогемагглютинином [19].

Среди причин, приводящих к изменению продукции белка, могут быть и структурные полиморфные варианты гена, кодирующего данный белок. Механизмы влияния структурных полиморфизмов одних генов на продукцию других могут быть довольно сложными. В полногеномных ассоциативных исследованиях (GWAS) 2009–2010 гг. была показана ассоциация полиморфных вариантов гена *IL28B* с ответом на интерферонотерапию и спонтанным клиренсом HCV-инфекции [20, 21]. Предполагается, что интерферон-лямбда, кодируемый геном *IL28B* синтез янус-киназы – передатчика сигналов и активатора транскрипции, запускающего, в свою очередь, экспрессию различных интерферонстимулированных генов (ISGs), которые и обеспечивают противовирусный эффект. Интересно, что внутрипеченочная экспрессия гена *IL28B* не зависит от генотипа по его полиморфным вариантам, изученным в GWAS. Однако в зависимости от генотипа значительно меняется экспрессия ISGs. «Неблагоприятный» генотип ассоциирован с увеличением экспрессии ISGs, что приводит к снижению ответа на экзогенный интерферон-альфа, входящий в состав противовирусной терапии [22]. Кроме этого, информация о сетях, построенных на основании межбелковых взаимодействий, представленная в базе данных String (<http://string-db.org>), позволяет сделать вывод о возможности прямых взаимодействий между *NOS3* и *ACE*, а также между *IFNG* и *IL12B* (рис. 2). Связь *IL4RA* с *IFNG* осуществляется через промежуточный компонент, а именно IL2 (<http://string-db.org>).

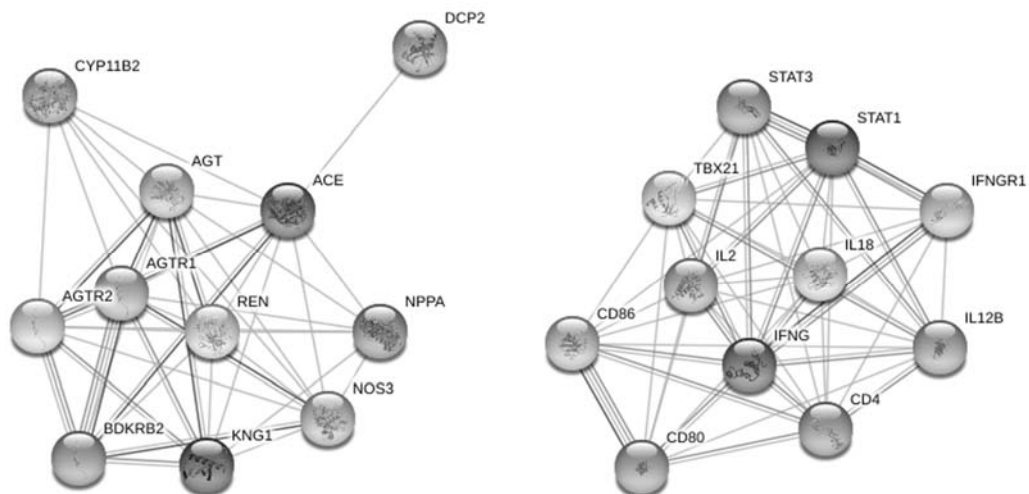


Рис. 2. Сети межбелковых взаимодействий по базе данных String.

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что структурный полиморфизм может быть причиной изменения экспрессионной активности не только гена – носителя функционально значимого варианта, но и других генов, белки которых оказывают влияние на патогенез заболевания.

Литература

- Mehan M.R., Nunez-Iglesias J., Dai C. et al. An integrative modular approach to systematically predict gene-phenotype associations // BMC Bioinformatics. 2010. Suppl 1. S62, 1–12.
- Asselah T., Bie`che I., Sabbagh A. et al. Gene expression and hepatitis C virus infection // Gut. 2009. V. 58. P. 846–858.
- Sixtos-Alonso M.S., Sánchez-Muñoz F., Sánchez-Ávila J.F. et al. IFN-stimulated Gene Expression Is a Useful Potential Molecular Marker of Response to Antiviral Treatment with Peg-IFN α 2b and Ribavirin in Patients with Hepatitis C Virus Genotype 1 // Archives of Medical Research. 2011. V. 42. P. 28–33.
- Бабушкина Н.П., Кучер А.Н. Функциональная роль VNTR-полиморфизма генов у человека // Генетика. 2011. Т. 47. С. 725–734.
- Kamihira S., Usui T., Ichikawa T. et al. Paradoxical expression of IL-28B mRNA in peripheral blood in human T-cell leukemia virus Type-1 mono-infection and co-infection with hepatitis C Virus // Virology Journal. 2012. V. 9. P. 1–7.
- Higgs M.R., Lerat H., Pawlotsky J.M. Downregulation of Gadd45 β Expression by Hepatitis C Virus Leads to Defective Cell Cycle Arrest // Molecular and Cellular Pathobiology Cancer Res. 2010. V. 70. P. 4901–4911.
- Tamura R., Kanda T., Imazeki F. et al. Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein Inhibits Lipopolysaccharide-Mediated Apoptosis of Hepatocytes by Decreasing Expression of Toll-Like Receptor 4 // The Journal of Infectious Diseases. 2011. V. 204. P. 793–801.
- Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР «в реальном времени». М.: Бином, 2009. 224 с.
- Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Брагина Е.Ю. и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов интерлейкинов и их рецепторов у представителей четырех этнических групп Сибирского региона // Мед. генетика. 2009. Т. 8. С. 43–52.
- Гончарова И.А., Гамаль Абд Эль-Азиз Наср Х., Белобородова Е.В. и др. Полиморфизм генов-модификаторов иммунного ответа при заболеваниях печени различной этиологии // Мед. генетика. 2010. Т. 12. С. 20–24.
- Wang J., Dudley D., Wang X.L. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking // Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002. V. 22. P. 1–4.
- AlFadhli S., AlTamimy B., AlSaeid K., Haider M.Z. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotype association with systemic lupus erythematosus // Lupus. 2011. V. 20. P. 700–708.
- Miyamoto Y., Saito Y., Nakayama M. et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a –786T→C mutation associated with coronary spastic angina // Hum. Mol. Genet. 2000. V. 9. P. 2629–2637.
- Asif A.R., Oellerich M., Armstrong V.W. et al. T-786C Polymorphism of the nos-3 Gene and the Endothelial Cell Response to Fluid Shear Stress: A Proteome Analysis // Journal of Proteome Research. 2009. V. 8. P. 3161–3168.
- Yoshimura M., Yasue H., Nakayama M. et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese // Hum. Genet. 1998. V. 103. P. 65–69.
- Howard T.D., Giles W.H., Xu J. et al. Promoter Polymorphisms in the Nitric Oxide Synthase 3 Gene Are Associated With Ischemic Stroke Susceptibility in Young Black Women // Stroke. 2005. V. 36. P. 1848–1853.
- Мезенцева М.В., Наровлянский А.Н., Оспельникова Т.П. и др. Продукция цитокинов клетками крови при герпесе, гепатите С и других формах патологии // Вопросы вирусологии. 2002. Т. 1. С. 44–47.
- Фрейдлин И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиниммунорегуляции. Иммунология. 2001. Т. 5. С. 4–15.
- Biron Ch., Gazzinelly R. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome // Current Opinion in Immunology. 1995. V. 7. P. 485–496.
- Suppiah V., Moldovan M., Ahlenstiel G. et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy // Nat. Genet. 2009. V. 41. P. 1100–1104.
- Rauch A., Kutalik Z., Descombes P. et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study // Gastroenterology. 2010. V. 138. P. 1338–1345.
- Soriano V., Poveda E., Vispo E. et al. Pharmacogenetics of hepatitis C // J. Antimicrob. Chemother. 2012. V. 67. P. 523–529.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССАХ ФИБРОГЕНЕЗА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ ЧЕЛОВЕКА

И.А. Гончарова^{1,2}, Н.В. Тарасенко¹, А.В. Марков¹

¹ НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

² НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово

В настоящее время доступно большое количество разнообразных высокопроизводительных технологий генотипирования однонуклеотидных полиморфных вариантов генома, каждая из которых представляет собой уникальное сочетание точности, производительности и стоимости анализа. Принцип генотипирования с помощью Sequenom MassARRAY технологии имеет ряд преимуществ, включающих точность анализа, возможность мультиплексирования и универсальные условия полимеразной цепной реакции (ПЦР) для всех анализируемых SNP, небольшие объемы реагентов и высокая пропускная способность (более 100 тыс. генотипов в день) [1].

Для выполнения поставленной научной задачи на первом этапе необходим выбор SNP-маркеров и формирование мультиплексных панелей с помощью программы Genotyping Assay Design (<http://bioscience.sequenom.com>). Данная программа автоматически генерирует возможные варианты мультиплексных сочетаний SNP, подбирает праймеры для первой локус-специфичной ПЦР и зонды (extension primers) – последовательности ДНК комплементарные матрице непосредственно перед анализируемым SNP. С помощью Genotyping Assay Design возможно создание мультиплексных панелей, содержащих до 36 ДНК-маркеров.

В НИИ медицинской генетики (г. Томск) с помощью Sequenom MassARRAY-технологии было выполнено исследование по выявлению молекулярно-генетических особенностей фиброгенеза при различных патологических состояниях человека. Для исследования, по данным, опубликованным в научной литературе, было выбрано 100 SNP-маркеров, ассоциированных с фиброзом печени, атеросклерозом, стабильностью атеросклеротической бляшки, эндотелиальной дисфункцией, сахарным диабетом 1-го (СД-1) и 2-го (СД-2) типа,

синтропией сердечно-сосудистого континуума, с дистропными заболеваниями, такими как астма и туберкулез; маркеров в генах, показавших изменение уровня экспрессии при разных стадиях фиброза печени. С помощью программного обеспечения Genotyping Assay Design на основании выбранных SNP было создано две мультиплексные панели маркеров, состоящие из 27SNP (27-плекс) и 31SNP (31-плекс) (табл. 1), для каждого из которых подобраны прямой, обратный и пролонгирующий праймеры.

Таблица 1

Характеристика SNP-маркеров, входящих в мультиплексные панели

| SNP ID | Ген | Локализация SNP | Белок | Ассоциации |
|---|-----------------|--------------------|--|--|
| <i>Маркеры мультиплексной панели 31-плекс</i> | | | | |
| rs56051972 | <i>KRT19</i> | 5'UTR C/G | Кератин 19 | Изменение экспрессии при разных стадиях фиброза при вирусном гепатите С [2] |
| rs8326 | <i>ELN</i> | 3'UTR,G/C | Эластин | Атеросклероз [3] |
| rs17740066 | <i>STXBP5L</i> | Экзон 15 Ile855Val | Синтаксинсвязывающий белок | Маркеры из прогностической панели подверженности к циррозу печени [4, 5] |
| rs7590760 | <i>DNMT3A</i> | Инtron 6 C/G | ДНК-метилтрансфераза 3-альфа | Ассоциирован с СД-1 и СД-2 [6] |
| rs1800588 | <i>LIPC</i> | 5'UTR, C/T | Печеночная липаза | Инфаркт миокарда [7] |
| rs1991401 | <i>DDX5</i> | 5'UTR A/G | Asp-Glu-Ala-Asp) бокс хеликазы 5 | Риск развития цирроза печени, [8] |
| rs3733619 | <i>CAMK2D</i> | 3'UTR A/G | Кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа | Ассоциирован с СД-1 и СД-2 [6] |
| rs514921 | <i>MMP1</i> | 5'UTR A/G | Металлопротеаза 1 | Аневризма аорты [9] |
| rs112385835 | <i>CD79A</i> | 5'UTR C/T | Иммуноглобулин А | Мутации в гене CD79A являются причиной наследственных форм иммунодефицитов [MIM: 613501] |
| rs62062995 | <i>COL1A1</i> | Экзон 39 Ter993Gly | Коллаген типа 1, альфа 1 | Фиброз различных органов [10] |
| rs17576 | <i>MMP9</i> | Экзон 6 Gly279Arg | Металлопротеаза 9 | Нестабильность бляшки, атеросклероз [11] |
| rs1726866 | <i>TAS2R38</i> | Инtron 3 C/T | Вкусовой рецептор | Гомеостаз глюкозы [12] |
| rs111902215 | <i>OAS1</i> | Экзон 2 Leu135Val | 2'-5'-олигоаденилат синтетаза1 | Фиброз при HCV [13] |
| rs6668182 | <i>CD247</i> | Инtron 6 A/G | Молекула CD247 | Системный склероз [14] |
| rs2738446 | <i>LDLR</i> | Инtron 11 C/G | Малый рецептор липопротеинов низкой плотности | Постинсультные осложнения [15] |
| rs1800469 | <i>TGFB1</i> | 5'UTR C/T | Трансформирующий фактор роста | Формирование внеклеточного матрикса при атеросклерозе [16, 17, 18] |
| rs3810153 | <i>CD79A</i> | 3'UTR A/G | Иммуноглобулин А | Мутации в гене приводят к развитию наследственных форм иммунодефицитов [MIM: 613501] |
| rs6778643 | <i>ITGB5</i> | Инtron 3 C/T | Интегрин-бета 5 | Тяжелый фиброз [19] |
| rs2878771 | <i>AQP2</i> | 3'UTR C/T | Аквaporин 2 | Маркеры из прогностической панели подверженности к циррозу печени [4, 5] |
| rs11515 | <i>CDKN2A</i> | 3'UTR C/G | Ингибитор циклинзависимых киназ | Аневризма аорты [20], ИБС [21] |
| rs12979860 | <i>IL28B</i> | Инtron 1 C/T | Интерферон-лямбда | Быстрая прогрессия фиброза в цирроз печени [22] |
| rs6841086 | <i>IGFBP7</i> | Инtron 2 A/G | Инсулиноподобный фактор роста | Экспрессия увеличивается в тканях печени при циррозе [23] |
| rs41356148 | <i>IFNGR2</i> | 3'UTR C/T | Рецептор к интерферону-гамма | Мутации в гене, приводят к развитию редкого синдрома atypical Mycobacteriosis, familial (OMIM #209950) |
| rs10087305 | <i>ADAMDEC1</i> | 5'URT C/G | ADAM-подобный дицеклин 1 | Нестабильность атеросклеротической бляшки [24] |
| rs4290029 | – | C/G | Маркер из панели подверженности к фиброзу печени | Маркеры из прогностической панели подверженности к циррозу печени [4, 5] |

Окончание табл. 1

| SNP ID | Ген | Локализация SNP | Белок | Ассоциации |
|---|-------------------|--------------------|---|--|
| rs1996546 | <i>ACSL1</i> | Интрон 2 A/C | Первый член семейства длинной цепи ацил-Со-А синтазы | Ассоциирован с СД-1 и СД-2 [6] |
| rs679620 | <i>MMP3</i> | Экзон 2 Lys45Gly | Металлопротеаза 3 | Экспрессия увеличивается в тканях печени при циррозе [23] |
| rs3890182 | <i>ABCA1</i> | Интрон 3 C/T | ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 1 | Атеросклероз [25] |
| rs11133482 | <i>IGFBP7</i> | Интрон 1 A/G | Инсулиноподобный фактор роста | Экспрессия увеличивается в тканях печени при циррозе [23] |
| rs11540899 | <i>CUX1</i> | Экзон 12 Pro/Pro | Cut-like homeobox 1 | Изменение экспрессии при фиброзе легких и почек [26] |
| rs12980602 | <i>IL28A</i> | Рядом с геном C/T | Интерферон-лямбда 2 | Ассоциирован с СД-1 и СД-2 [6] |
| <i>Маркеры мультиплексной панели 27-плекс</i> | | | | |
| rs9325154 | <i>IGFBP6</i> | Интрон 1 A/G | Инсулиноподобный фактор роста | Экспрессия увеличивается в тканях печени при циррозе [23] |
| rs3739998 | <i>KIAA1462</i> | Экзон 2 Thy1002Gly | KIAA1462 | Ишемическая болезнь сердца (The Coronary Artery Disease (CAD) Genetics Consortium, 2011) |
| rs2277698 | <i>TIMP2</i> | Экзон 2 Ser101Ser | Ингибитор металлопротеаз | Нестабильность бляшки, атеросклероз [11] |
| rs708272 | <i>CETP</i> | Интрон 1 C/T | Переносчик холестерина эфиров между липопротеидами | ИБС, инфаркт миокарда [27] |
| rs17181457 | <i>IFNGR1</i> | 5'UTR C/T | Рецептор к интерферону-гамма | Мутации в гене, приводят к развитию редкого синдрома atypical <i>Mycobacteriosis</i> , familial (OMIM #209950) |
| rs2071559 | <i>KDR</i> | 5'UTR C/T | Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase) | Инсульт [28] |
| rs2075555 | <i>COL1A1</i> | Интрон 11 A/C | Collagen, type I, alpha 1 | Атеросклероз аорты [29] |
| rs4938056 | <i>HTR3B</i> | Интрон 2 C/T | 5-гидрокситриптомин (серотонин) рецептор 3B | Ассоциирован с СД-1 и СД-2 [6] |
| rs112543324 | <i>CD79A</i> | Экзон 2 His36Arg | Иммуноглобулин А | Мутации в гене приводят к развитию наследственных форм иммунодефицитов [MIM: 613501] |
| rs1007856 | <i>ITGB5</i> | Интрон 1 C/T | Интегрин бета 5 | Тяжелый фиброз [19] |
| rs1133763 | <i>CCL8</i> | Экзон 1 Gln69Lys | Хемокиновый лиганд 8 | Изменение экспрессии при циррозе печени и инфаркте миокарда [30, 31] |
| rs4986790 | <i>TLR4</i> | Экзон 3 Asp299Cly | Toll-подобные рецепторы | Маркер прогрессирования фиброза при HCV [19] |
| rs20579 | <i>LIG1</i> | 5'UTR C/T | Лигаза 1 | Рак легких и верхних отделов желудочно-кишечного тракта [32] |
| rs77469272 | <i>GAS6</i> | Экзон 12 Ala673Val | Growth arrest-specific 6 | Фиброз печени, стабильность атеросклеротической бляшки у мышей [33] |
| rs4986819 | <i>PARP4</i> | Интрон 18 C/G | Поли(АДФ-рибоза) полимеразы 4 | Гепатоцеллюлярная карцинома [34] |
| rs5082 | <i>APOA2</i> | 5'UTR C/T | Аполипопротеин А-2 | Ожирение [35], инфаркт миокарда [36] |
| rs1333049 | <i>CDKN2B-AS1</i> | Рядом с геном G/C | CDKN2B antisense RNA 1 (non-protein coding) | Аневризма аорты [20, 21] |
| rs3918242 | <i>MMP9</i> | 5'UTR C/T | Металлопротеаза 9 | Нестабильность бляшки, атеросклероз [11] |
| rs1107946 | <i>COL1A1</i> | 5'UTR A/C | Коллаген | Атеросклероз аорты [29] |
| rs803064 | <i>CUX1</i> | Экзон 14 Thr464Ala | Cut-like homeobox 1 | Изменение экспрессии при фиброзе легких и почек [26] |
| rs7023329 | <i>MTAP</i> | Интрон 2 A/G | Метиладенозин фосфорилаза | Нейрофиброматоз [37] |
| rs12054703 | <i>NUP155</i> | Интрон 1 C/G | Нуклеопорин 155 | Ассоциирован с СД-1 и СД-2 [6] |
| rs1143674 | <i>ITGA4</i> | Экзон 16 Thr3Thr | Интегрин-альфа-4 | Аутизм [38] |
| rs1131454 | <i>OAS1</i> | Экзон 3 Gly162Ser | 2'-5'-олигоаденилат синтаза 1 | Фиброз при HCV [13] |
| rs3765124 | <i>ADAMDEC1</i> | Экзон 11 Ser365Asn | ADAM-like, decysin 1 | Нестабильность атеросклеротической бляшки [24] |
| rs626750 | <i>MMP3</i> | ? C/T | Металлопротеаза 3 | Экспрессия увеличивается в тканях печени при циррозе [23] |
| rs1817537 | <i>TREM1</i> | Интрон 3 C/G | Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 | Увеличение экспрессии гена при гепатоцеллюлярной карциноме [39] |

Синтез праймеров был осуществлен компанией Metabion (Германия). Дальнейшие этапы генотипирования были выполнены согласно протоколу, представленным в iPLEX Gold Application Guide [40].

В исследование был включен 941 человек русской национальности, проживающий в Сибирском регионе (г. Томск и г. Кемерово). Среди них были больные ишемической болезнью сердца с инфарктом миокарда (ИМ), разделенные на две подгруппы: больные без традиционных факторов риска (гипертония, ожирение, сахарный диабет) (60 человек); лица, характеризующиеся наличием всех вышеперечисленных факторов риска и включенные в группу, определяемую как синтропия сердечно-сосудистого континуума (96 человек). Следующие группы обследованных составили лица с СД-1 (285 человек) и хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) (200 человек). Популяционная выборка, состоящая из жителей г. Томска (300 человек), использовалась в качестве контрольной группы.

Генотипирование с помощью MALDI-TOF-спектрометрии на приборе Sequenom показало, что во всех исследованных группах SNP-маркеры генов *MMP3* (rs3918242), *OAS1* (rs1119022), *CD79A* (rs1123858), *IFNGR2* (rs4135614), *COL1A1* (rs6206299) были мономорфными. Отклонение распределения генотипов от ожидаемого при равновесии Харди–Вайнберга в группе популяционного контроля наблюдалось для следующих маркеров: *CD79A* (rs112543324), *IFNGR1* (rs17181457), *GAS6* (rs77469272), *IGFBP6* (rs9325154), *IL28B* (rs12979860). Все вышеперечисленные маркеры были исключены из дальнейшего анализа. Для остальных маркеров частота минорного аллеля была сопоставима с частотами, представленными в

базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) для популяций HarMap-CEU (популяционная группа европеоидного происхождения, включающая жителей штата Юта, Северной и Западной Европы) или PGA-EUROPEAN-PANEL (образцы ДНК лиц европеоидного происхождения, полученные из банка Coriell Cell Repository (CCR)). За исключением SNP, для которых не было представлено информации и маркеров rs1007856, rs2738446, rs679620, для которых частоты минорных аллелей у жителей г. Томска различались более чем на 10% от частот, представленных в NCBI для вышеуказанных популяций (табл. 2). Из 58 маркеров, включенных в мультиплексные панели, 48 являются информативными и пригодными для исследования «случай – контроль». Проведение такого исследования показало ассоциации 21 маркера с различными изученными патологическими состояниями (табл. 3).

Таким образом, Sequenom MassARRAY-технология является методом, позволяющим решать различные научные задачи, связанные с генотипированием SNP, который в последние годы с успехом применяется в области генетики онкологических [41], инфекционных заболеваний [42], фармакогенетики [43] и популяционной генетики [44]. Программное обеспечение Genotyping Assay Design позволяет создавать эффективно работающие мультиплексные панели генетических маркеров. MALDI-TOF-спектрометрия обеспечивает получение информации о нескольких десятках генотипов в сотне образцов ДНК в течение 15–20 мин. Программный пакет MassARRAY TYPER 4.0 производит автоматическое чтение генотипов и генерирует отчеты, содержащие информацию о генотипах каждого образца ДНК

Таблица 2

Частоты минорных аллелей исследованных SNP-маркеров у жителей г. Томска и в других популяционных группах европеоидного происхождения

| Маркеры мультиплексной панели 31-плекса | | | | Маркеры мультиплексной панели 27-плекса | | | |
|---|-----------------|----------|--|---|-----------------|----------|--|
| SNP_ID | Минорный аллель | Томск, % | Европеоиды, HarMap-CEU, PGA-EUROPEAN-PANEL | SNP_ID | Минорный аллель | Томск, % | Европеоиды, HarMap-CEU, PGA-EUROPEAN-PANEL |
| rs10087305 | C | 13,0 | 10,0 | rs1007856 | C | 51,3 | 65,0 |
| rs11133482 | G | 41,3 | 42,6 | rs1107946 | A | 16,5 | 15,4 |
| rs11515 | G | 11,6 | 12,5 | rs1131454 | G | 38,6 | 45,0 |
| rs11540899 | A | 41,1 | 43,3 | rs1133763 | C | 16,2 | 12,8 |
| rs12980602 | C | 21,5 | 22,6 | rs1143674 | G | 49,2 | 41,7 |
| rs1726866 | C | 49,1 | 42,9 | rs12054703 | G | 19,8 | 19,5 |
| rs17576 | G | 35,4 | 37,5 | rs1333049 | C | 44,2 | 49,2 |
| rs17740066 | A | 11,0 | 9,4 | rs1817537 | C | 42,4 | - |
| rs1800469 | T | 31,2 | 22,8 | rs20579 | T | 18,5 | 12,1 |
| rs1800588 | T | 24,0 | 25,8 | rs2071559 | C | 44,0 | 50,5 |
| rs1991401 | G | 37,7 | 39,2 | rs2075555 | A | 14,8 | 16,4 |
| rs1996546 | A | 14,9 | 15,3 | rs2277698 | A | 13,0 | 15,8 |
| rs2738446 | G | 30,6 | 42,8 | rs3739998 | C | 41,9 | 46,6 |
| rs2878771 | C | 20,9 | 18,6 | rs3765124 | G | 48,9 | 42,9 |
| rs3733619 | G | 11,7 | 12,8 | rs4938056 | T | 43,8 | 38,3 |
| rs3810153 | G | 44,1 | 48,7 | rs4986790 | G | 7,9 | 3,3 |
| rs3890182 | A | 9,8 | 8,0 | rs4986819 | G | 12,9 | 15,9 |
| rs4290029 | C | 14,4 | - | rs5082 | C | 48,6 | 39,4 |
| rs514921 | G | 22,5 | 31,9 | rs626750 | T | 22,8 | 17,5 |
| rs56051972 | G | 38,4 | 38,3 | rs7023329 | G | 50,2 | 52,5 |
| rs6668182 | A | 8,2 | 11,7 | rs708272 | T | 44,7 | 48,7 |
| rs6778643 | C | 49,4 | 54,4 | rs803064 | C | 46,0 | 46,5 |
| rs679620 | A | 43,7 | 58,7 | | | | |
| rs6841086 | A | 42,8 | 42,9 | | | | |
| rs7590760 | G | 44,5 | 45,6 | | | | |
| rs8326 | C | 11,6 | 9,1 | | | | |

Таблица 3

Ассоциации выбранных SNP-маркеров с различными патологическими состояниями

| Ген | SNP ID | Патология | Предрасполагающий/протективный генотип/аллель | OR | p |
|-------------------|------------|--------------------------|---|-------------------|--------|
| <i>ADAMDEC1</i> | rs10087305 | ХВГС | СС | 6,9 (1,84–31,04) | 0,001 |
| <i>ADAMDEC1</i> | rs3765124 | ИМ | АА | 2,60(1,01–7,01) | 0,048 |
| | | ХВГС | АА | 1,76(1,14–2,74) | 0,010 |
| | | СД-1 | АА | 1,78(1,18–2,68) | 0,005 |
| | | Цирроз печени | АА | 2,9 (1,24–6,77) | 0,01 |
| <i>MMP1</i> | rs514921 | ХВГС | СС | 0,58 (0,35–0,98) | 0,041 |
| <i>MMP3</i> | rs679620 | СД-1 | АА | 2,03 (1,19–3,47) | 0,008 |
| | | Диабетическая нефропатия | АА | 2,80 (1,43–5,50); | 0,002 |
| | | Умеренный фиброз печени | АА | 2,3 (1,17–4,42) | 0,014 |
| | | Цирроз печени | АА | 2,5 (1,0–6,77) | 0,05 |
| <i>ITGA4</i> | rs1143674 | СД-1 | GG | 2,06 (1,29–3,29) | 0,002 |
| | | Диабетическая нефропатия | GG | 1,91 (1,02–3,55) | 0,041 |
| <i>ITGB5</i> | rs1007856 | СД-1 | ТТ | 1,67 (1,10–2,53) | 0,015 |
| | | Диабетическая нефропатия | ТТ | 2,15 (1,28–3,62) | 0,003 |
| <i>COL1A1</i> | rs1107946 | ИМ | АА | 4,29 (1,24–14,6) | 0,014 |
| <i>LIG1</i> | rs20579 | ИМ | СС | 1,69 (1,02–2,80) | 0,040 |
| | | ХВГС | СС | 2,07 (1,27–3,38) | 0,002 |
| | | СД-1 | СС | 2,01 (1,29–3,13) | 0,002 |
| | | Умеренный фиброз печени | СС | 2,24 (1,15–4,39) | 0,015 |
| <i>PARP4</i> | rs4986819 | Диабетическая нефропатия | GG | 2,01 (1,29–3,38) | 0,01 |
| <i>KIAA1462</i> | rs3739998 | ИМ | СС | 2,39 (1,21–4,72) | 0,010 |
| | | Синтропия | СС | 2,51 (1,38–4,54) | 0,002 |
| | | ХВГС | СС | 1,88 (1,15–3,08) | 0,010 |
| | | Умеренный фиброз печени | С | 1,46 (1,02–2,09) | 0,040 |
| <i>STXBP5L</i> | rs17740066 | Цирроз печени | GG | – | 0,030 |
| <i>TAS2R38</i> | rs1726866 | Слабый фиброз печени | ТТ | 3,2 (1,43–7,37) | 0,003 |
| <i>APOA2</i> | rs5082 | Синтропия | Т | 1,47(1,02–2,11) | 0,038 |
| <i>LDLR</i> | rs2738446 | Синтропия | GG | – | 0,016 |
| <i>CETP</i> | rs708272 | Цирроз печени | СС | 4,1 (1,69–10,03) | 0,0008 |
| <i>CDKN2B-AS1</i> | rs1333049 | Синтропия | С | 1,48 (1,03–2,12) | 0,030 |
| <i>MTAP</i> | rs7023329 | Синтропия | GG | 0,48 (0,23–0,99) | 0,044 |
| <i>CD247</i> | rs6668182 | Диабетическая нефропатия | GA+AA | 2,2 (1,13–4,29) | 0,020 |
| <i>NUP155</i> | rs12054703 | Диабетическая нефропатия | СС | 0,61 (0,38–0,99) | 0,049 |
| <i>AQP2</i> | rs2878771 | ИМ | GC | – | 0,029 |

по всем анализируемым SNP, эффективности генотипирования, частотах аллелей, соответствии распределения генотипов по каждому локусу, ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга. В настоящем исследовании с применением Sequenom MassARRAY-технологии было показано, что гены, принимающие участие в процессах функционирования экстрацеллюлярного матрикса, и метаболизм коллагена играют существенную роль в формировании предрасположенности к различным патологическим состояниям человека. Так, например, с ИМ ассоциированы полиморфные варианты генов *ADAMDEC1* (rs3765124), *COL1A1* (rs1107946); с СД-1 – *ADAMDEC1* (rs3765124), *MMP3* (rs679620), *ITGB5* (rs1007856), *ITGA4* (rs1143674); с диабетической нефропатией – *ADAMDEC1* (rs3765124), *MMP3* (rs679620), *ITGB5* (rs1007856), *ITGA4* (rs1143674), *COL1A1* (rs1107946); с ХВГС – *ADAMDEC1* (rs3765124, rs10087305), *MMP1* (rs514921); циррозом печени – *ADAMDEC1* (rs3765124) и *MMP3* (rs679620) (табл. 3). Для полиморфных вариантов генов *ADAMDEC1* (rs3765124), участвующего в формировании экстрацеллюлярного матрикса, *LIG1* (rs20579) – репарации и рекомбинации ДНК и *KIAA1462* (rs3739998) – адгезии эндотелиальных клеток показана наибольшая степень плейотропности, поскольку каждый из них вовлечен

в формирование предрасположенности к нескольким патологиям. Так, *ADAMDEC1* (rs3765124) ассоциирован с ИМ, СД-1, ХВГС, диабетической нефропатией, циррозом печени; *LIG1* (rs20579) – с ИМ, СД-1, ХВГС, диабетической нефропатией, умеренным фиброзом печени; *KIAA1462* (rs3739998) – с ИМ, синтропией, ХВГС, умеренным фиброзом печени, диабетической нефропатией.

Литература

1. Gabriel S., Ziaugra L., Tabbaa D. SNP Genotyping Using the Sequenom MassARRAY iPLEX Platform // *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2009. V. 60. P. 2.12.1–2.12.18.
2. Idrees S., Ashfaq U.A., Masoud M.S. et al. Gene expression profiling of immune responsive and fibrosis genes in hepatitis C virus infected patients // *Viral Immunol.* 2014. V. 27, № 5. P. 250–254.
3. Roder C., Peters V., Kasuya H. et al. Common genetic polymorphisms in Moyamoya and atherosclerotic disease in Europeans // *Childs Nerv Syst.* 2011. V. 27. P. 245–252.
4. Huang H., Shiffman M.L., Friedman S. et al. A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C // *Hepatology.* 2007. V. 46. P. 297–306.
5. Li Y., Chang M., Abar O. et al. Multiple variants in toll-like receptor 4 gene modulate risk of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection // *Journal of Hepatology.* 2009. V. 51. P. 750–757.

6. *Torkamani A., Topol E.J., Schork N.J.* Pathway Analysis of Seven Common Diseases Assessed by Genome-Wide Association // *Genomics*. 2008. V. 92, № 5. P. 265–272.
7. *Ahmad T., Chasman D. I., Buring J. E. et al.* Physical Activity Modifies the Effect of LPL, LIPC, and CETP Polymorphisms on HDL-C Levels and the Risk of Myocardial Infarction in Women of European Ancestry // *Circ. Cardiovasc. Genet*. 2011. V. 4. P. 74–80.
8. *Guo J., Hong F., Loke J. et al.* A DDX5 S480A Polymorphism Is Associated with Increased Transcription of Fibrogenic Genes in Hepatic Stellate Cells // *J. Biological Chemistry*. 2010. V. 285, № 8. P. 5428–5437.
9. *Kato K., Tokuda Y., Inagaki N. et al.* Association of a matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism with long-term outcome of thoracic aortic aneurysm // *Int. J. Mol. Med*. 2012. V. 29, № 1. P. 125–132.
10. *Wenzke K.E., Cantemir-Stone C., Zhang J. et al.* Identifying common genes and networks in multi-organ fibrosis // *AMIA Summits Transl Sci Proc*. 2012. P. 106–115.
11. *Armstrong C., Abilleira S., Sitzer M. et al.* Polymorphisms in MMP Family and TIMP Genes and Carotid Artery Intima-Media Thickness // *Stroke*. 2007. V. 38. P. 2895–2899.
12. *Dotson C.D., Zhang L., Xu H. et al.* Bitter taste receptors influence glucose homeostasis // *PLoS One*. 2008. V. 3, № 12. P. e3974.
13. *Zhao Y., Kang H., Ji Y., Chen X.* Evaluate the relationship between polymorphisms of OAS1 gene and susceptibility to chronic hepatitis C with high resolution melting analysis // *Clin. Exp. Med*. 2013. V. 13. P. 171–176.
14. *Radstake T.R., Gorlova O., Rueda B., Martin J.* Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a novel susceptibility locus // *Nat. Genet*. 2010. V. 42, № 5. P. 426–429.
15. *Lee J.D., Lin Y.H., Hsu H.L. et al.* Genetic polymorphisms of low density lipoprotein receptor can modify stroke presentation // *Neurol. Res*. 2010. V. 32, № 5. P. 535–540.
16. *Romero-Gomez M., Eslam M., Ruiz A., Maraver M.* Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment // *Liver International*. 2011. Doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02449.
17. *Pham Y., Tu Y., Wu T. et al.* Cell division autoantigen 1 plays a profibrotic role by modulating downstream signalling of TGF-beta in a murine diabetic model of atherosclerosis // *Diabetologia*, Jan. 2010. V. 53, № 1. P. 170–179.
18. *Chen Y., Dawes P.T., Packham J.C., Matthey D.L.* Interaction between smoking and functional polymorphism in the TGFB1 gene is associated with ischaemic heart disease and myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study // *Arthritis Res Ther*. 2012. V. 14, № 2. P. R81.
19. *Weber S. N., Wasmuth H.E.* Liver fibrosis: from animal models to mapping of human risk variants // *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2010. V. 24. P. 635–646.
20. *Bown M.J., Braund P.S., Thompson J.* Association Between the Coronary Artery Disease Risk Locus on Chromosome 9p21.3 and Abdominal Aortic Aneurysm // *Circ. Cardiovasc. Genet*. 2008. V. 1. P. 39–42.
21. *Beeton L.D., Chivers P., Dawes J. et al.* Tiling array shows low ANRIL, high CDKN2B expression associated with chromosome 9p21 coronary artery disease (CAD) risk genotype // *Heart*. 2011. V. 97. P. e7. Doi: 10.1136/heartjnl-2011-300920b.44.
22. *Barreiro P., Pineda J.A., Rallo N. et al.* Influence of Interleukin-28B Single-Nucleotide Polymorphisms on Progression to Liver Cirrhosis in Human Immunodeficiency Virus Hepatitis C Virus Coinfected Patients Receiving Antiretroviral Therapy // *JID*. 2011. V. 203. P. 1629–1636.
23. *Boers W., Aarass S., Linthorst C. et al.* Transcriptional Profiling Reveals Novel Markers of Liver Fibrogenesis // *J. Biological Chemistry*. 2006. V. 281, № 24. P. 16289–16295.
24. *Papaspayridonos M., Smith A., Burnand K.G. et al.* Novel Candidate Genes in Unstable Areas of Human Atherosclerotic Plaques // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2006. V. 26. P. 1837–1844.
25. *Kyriakou T., Hodgkinson C., Pontefract D.E., Martin S.* Howell Genotypic Effect of the 565C>T Polymorphism in the ABCA1 Gene Promoter on ABCA1 Expression and Severity of Atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2005. V. 25. P. 418–423.
26. *Fragiadakia M., Ikeda T., Witherden A. et al.* High doses of TGF-β potently suppress type I collagen via the transcription factor CUX1 // *Mol. Biol. Cell*. 2011. V. 22. P. 1836–1844.
27. *Johannsen T.H., Frikke-Schmidt R., Schou J. et al.* Genetic Inhibition of CETP, Ischemic Vascular Disease and Mortality, and Possible Adverse Effects // *J. Am. Coll. Cardiol*. 2012. V. 60. P. 2041–2048.
28. *Zhang W., Sun K., Zhen Y. et al.* VEGF receptor-2 variants are associated with susceptibility to stroke and recurrence // *Stroke*. 2009. V. 40, № 8. P. 2720–2726.
29. *Jin H., van't Hof R.J., Albagha O.M., Ralston S.H.* Promoter and intron 1 polymorphisms of COL1A1 interact to regulate transcription and susceptibility to osteoporosis // *Hum. Mol. Genet*. 2009. V. 18. P. 2729–2738.
30. *Biecheva I., Asselaha T., Laurendeau I. et al.* Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection // *Virology*. 2005. V. 332. P. 130–144.
31. *Alves G.D., Pazzino M., Macedo Braga L.M.* Molecular mapping of the regenerative niche in a murine model of myocardial infarction // *International Journal of Molecular Medicine*. 2011. V. 29. P. 479–484.
32. *Lee Y.C., Morgenstern H., Greenland S. et al.* A case-control study of the association of the polymorphisms and haplotypes of DNA ligase I with lung and upper-aerodigestive-tract cancers // *Int. J. Cancer*. 2008. V. 122, № 7. P. 1630–1638.
33. *Fourcot A., Couchie D., Chobert M.N., Zafrani E.S.* Gas6 deficiency prevents liver inflammation, steatohepatitis, and fibrosis in mice // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2011. V. 24. Doi: 10.1152/ajpgi.00311.2010.
34. *Chen Y., Wang L., Xu H., Liu X., Zhao Y.* Exome capture sequencing reveals new insights into hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma at the early stage of tumorigenesis // *Oncol. Rep*. 2013. V. 30, № 4. P. 1906–1912.
35. *Corella D., Arnett D.K., Tsai M.Y. et al.* The -256T>C polymorphism in the apolipoprotein A-II gene promoter is associated with body mass index and food intake in the genetics of lipid lowering drugs and diet network study // *Clin. Chem*. 2007. V. 53, № 6. P. 1144–1152.
36. *Xiao J., Zhang F., Wiltshire S. et al.* The apolipoprotein AII rs5082 variant is associated with reduced risk of coronary artery disease in an Australian male population // *Atherosclerosis*. 2008. V. 199, № 2. P. 333–339.
37. *Pasmant E., Sabbagh A., Masliah-Planchon J. et al.* Role of noncoding RNA ANRIL in genesis of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1 // *J. Natl. Cancer. Inst*. 2011. V. 103, № 22. P. 1713–1722.
38. *Conroy J., Cochrane L., Anney R.J. et al.* Fine mapping and association studies in a candidate region for autism on chromosome 2q31-q32 // *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet*. 2009. V. 150B, № 4. P. 535–544.
39. *Wu J., Li J., Salcedo R. et al.* The proinflammatory myeloid cell receptor TREM-1 controls Kupffer cell activation and development of hepatocellular carcinoma // *Cancer. Res*. 2012. V. 72, № 16. P. 3977–3986.
40. *iPLEX® Gold Application Guide*. 2009. Doc. 11555 R2.0 CO 090096. (<http://www.sequenom.com>).
41. *Bai S.-B., Hong-Xiang Chen H.-X., Bao Y.-X.* Predictive Impact of Common Variations in DNA Repair Genes on Clinical Outcome of Osteosarcoma // *Asian Pacific J. Cancer. Prev*. 2013. V. 14, № 6. P. 3677–3680.
42. *Band G., Le Q.S., Luke Jostins L. et al.* Imputation-Based Meta-Analysis of Severe Malaria in Three African Populations // *PLOS Genetics*. 2013. V. 9, № 5. P. e1003509.

43. Martinelli-Boneschi *et al.* Pharmacogenomics in Alzheimer's disease: a genome-wide association study of response to cholinesterase inhibitors // *Neurobiology of Aging*. 2013. V. 34, № 6. P. 1711.e7–1711.e13.
44. Степанов В.А., Трифонова Е.А. Мультиплексное генотипирование однонуклеотидных полиморфных маркеров методом масс-спектрометрии MALDI-TOF: частоты 56 SNP в генах иммунного ответа в популяциях человека // *Молекулярная биология*. 2013. Т. 47, № 6. С. 976–986.

РОЛЬ МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАКУ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (НА ПРИМЕРЕ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ РЕПАРАЦИОННЫХ СИСТЕМ)

В.Н. Кипень

*Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова,
НИИ экологических проблем, г. Минск, Республика Беларусь*

Введение

В структуре всех злокачественных новообразований женского населения Республики Беларусь рак молочной железы (РМЖ) в 2012 г. составил 17,7%. По данным Белорусского канцер-регистра интенсивные показатели заболеваемости (на 100 тыс. женского населения) демонстрируют ежегодное увеличение частоты выявления новых случаев РМЖ. За период 2003–2012 гг. отмечен рост первичной заболеваемости с 61,7 до 76,6 [1].

Известно, что в основе наследственной предрасположенности к раковым заболеваниям лежит специфическая комбинация аллелей нескольких генов, которые оказывают влияние на развитие либо на модификацию клинических симптомов болезни. Установление взаимосвязей между полиморфными генами и фенотипическими проявлениями РМЖ является важнейшим условием для установления ключевых звеньев патогенеза, затрагивающих определенные физиологические функции, посредством которых формируется клиническая картина заболевания.

В настоящее время одними из наиболее эффективных и популярных программ для анализа межгенных взаимодействий являются биоинформатический метод сокращения многофакторной размерности Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) и логистический регрессионный анализ [2–4]. Важное преимущество метода MDR заключается в возможности его использования в выборках больных и здоровых относительно небольших объемов [5–7]. Кроме того, MDR позволяет проводить статистическую оценку валидности или воспроизводимости тестируемых моделей (cross-validation consistency, CVC), а также расчет ошибки предсказания модели (prediction error, Pre.). В программе MDR мультилокусные генотипы суммируются в группы повышенного и пониженного риска развития заболевания, что уменьшает размерность числа рассчитываемых параметров. С помощью многократного перекрестного пересчета вводимых первичных данных выбирается оптимальная модель межгенного взаимодействия, позволяющая с наиболее высокой точностью и, соответственно, с наименьшей ошибкой, предсказать респонденту наличие или отсутствие предрасположенности к определенным болезням.

Цель исследования – с помощью метода Multifactor Dimensionality Reduction выявить особенности взаимодействия полиморфных вариантов ключевых генов репарационных систем, отвечающих за высокий риск развития РМЖ.

Материал и методы

В исследование были включены 146 пациентов с монолатеральным РМЖ. Группа билатерального РМЖ составила: два случая синхронного билатерального РМЖ (временной критерий синхронности билатерального рака молочной железы составил не более 12 мес [8]) и семь случаев метасинхронного билатерального РМЖ. Средний возраст пациентов с монолатеральным РМЖ на момент возникновения опухоли составил ($43,2 \pm 5,9$) года (возрастной интервал – от 24 до 54 лет), пациентов с билатеральными формами РМЖ – ($39,8 \pm 5,0$) года (возрастной интервал – от 33 до 48 лет).

В группу сравнения вошли 123 условно здоровых пациента без онкологической патологии в анамнезе на момент забора крови, средний возраст составил ($39,6 \pm 5,1$) года (возрастной интервал – от 25 до 52 года). Группа сравнения соответствует по возрасту и этническому составу выборке больных РМЖ.

Все участники исследования подписали информированное согласие на проведение молекулярно-генетического тестирования.

Анализ межгенных взаимодействий проводили с помощью программы MDR (www.multifactor dimensionalityreduction.org). Математической базой данной программы является непараметрический кластерный анализ, который служит альтернативой логистической регрессии для обнаружения и описания нелинейного типа взаимодействия между дискретными генетическими предикторами [5–7, 10].

Результаты исследования

Роль межгенных взаимодействий генов репарационных систем в формировании предрасположенности к РМЖ

В проведенном исследовании были проанализированы все возможные комбинации полиморфных вариантов для ключевых генов репарационных систем: *XRCC1* (эксцизионная репарация оснований), *XRCC3* и *PALB2* (гомологичная рекомбинация), – у пациентов с РМЖ и в группе сравнения. Данные генотипирования по указанным генам приведены в предыдущем исследовании [9]. В результате анализа межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов репарационных систем в развитии РМЖ были установлены четыре статистически значимые модели (настройки поиска конфигурации модели: количество атрибутов (attribute count range) – 1–4; воспроизводимость модели (cross-validation count) – 10; анализ топ-моделей (track top models) – 500; по-

иск конфигурации модели (search method configuration) – exhaustive) (табл. 1):

1) однолокусная модель «PALB2 (rs152451)», воспроизводимость – 100%, точность предсказания – 60,9% ($p = 0,0024$);

2) двухлокусная модель «XRCC1 (rs25487)/XRCC3 (rs861539)» воспроизводимость – 80%, точность предсказания – 60,1% ($p = 0,0004$);

3) трехлокусная модель «PALB2 (rs152451)/XRCC1 (rs25487)/XRCC3 (rs861539)», воспроизводимость – 100%, точность – 66,3% ($p < 0,0001$);

4) четырехлокусная модель «PALB2 (rs152451)/XRCC1 (rs25487)/XRCC3 (rs861539)/PALB2 (rs45516100)», воспроизводимость – 100%, точность предсказания – 67,8% ($p < 0,0001$).

Основное внимание следует уделить моделям со 100%-й воспроизводимостью, т.е. № 1, 3 и 4. Стоит отметить, что при увеличении количества предикторов в модели наблюдается возрастание значений специфичности и чувствительности (с 37,19% при однолокусной модели до 47,93% для четырехлокусной для параметра «чувствительность», а также с 79,35 до 83,23% для параметра «специфичность»), однако данная тенденция имеет незначительный характер. Необходимо также отметить, что, по мнению ряда исследователей, увеличение количества включенных в модель полиморфизмов, незначи-

тельно увеличивающих или уменьшающих прогностическую значимость, может отразиться на скрытой аккумуляции ошибок при дальнейшем усложнении модели [2, 11]. Так, по данным Alison A. Motsinger и соав., при возрастании количества предикторов в модели с 1 до 6 наблюдается снижение ошибки классификации данных более чем в 3 раза (с 45 до 10%), однако не все предикторы имеют одинаково значимую прогностическую ценность, как правило, модель показывает хорошую воспроизводимость и точность при 3–5 предикторах [4]. На рис. 1 продемонстрированы описанные выше тенденции, из которого видно, что ошибка предсказания является минимальной при трех предикторах в модели (и составляет 20%), а дальнейшее включение переменных лишь дестабилизирует модель.

В результате анализа межгенных взаимодействий в однолокусной модели «PALB2 (rs152451)» был обнаружен генотип повышенного риска развития РМЖ – A/A, протективным потенциалом обладает аллель G (рис. 2). Стоит отметить, что ранее генотип A/A (rs152451 PALB2) был определен как генотип риска для РМЖ ($OR = 2,08$ при 95%-м CI 1,22–3,54, $p = 0,009$) [9]. Таким образом, проведенное моделирование с помощью MDR подтвердило правомочность сделанных ранее выводов и хорошо согласуется с результатами других статистических методов.

Таблица 1

Модели межгенных взаимодействий при РМЖ, рассчитанные с помощью программы MDR

| Номер модели | Tr. Bal. Acc. | Test. Bal. Acc. | χ^2 (p) | Se. | Sp. | CVC | Pre. |
|--------------|--|-----------------|------------------------|--------|--------|-------|--------|
| 1 | PALB2 (rs152451) | | | | | | |
| | 0,5831 | 0,5786 | 8,40 ($p = 0,0037$) | 0,7935 | 0,3719 | 10/10 | 0,6181 |
| 2 | XRCC1 (rs25487)/XRCC3 (rs861539) | | | | | | |
| | 0,6117 | 0,5456 | 12,76 ($p = 0,0004$) | 0,5548 | 0,6612 | 8/10 | 0,6772 |
| 3 | PALB2 (rs152451)/XRCC1 (rs25487)/XRCC3 (rs861539) | | | | | | |
| | 0,6423 | 0,6029 | 25,55 ($p < 0,0001$) | 0,8194 | 0,4628 | 10/10 | 0,6615 |
| 4 | PALB2 (rs152451)/XRCC1 (rs25487)/XRCC3 (rs861539)/PALB2 (rs45516100) | | | | | | |
| | 0,6585 | 0,5923 | 31,16 ($p < 0,0001$) | 0,8323 | 0,4793 | 10/10 | 0,6719 |

Примечание. Tr. Bal. Acc. – тренировочная сбалансированная точность, Test. Bal. Acc. – тестируемая сбалансированная точность, p – тест на значимость, χ^2 – критерий значимости различий популяций по распределению частот генотипов, Se. – чувствительность, Sp. – специфичность, Pre. (Precision) – точность модели.

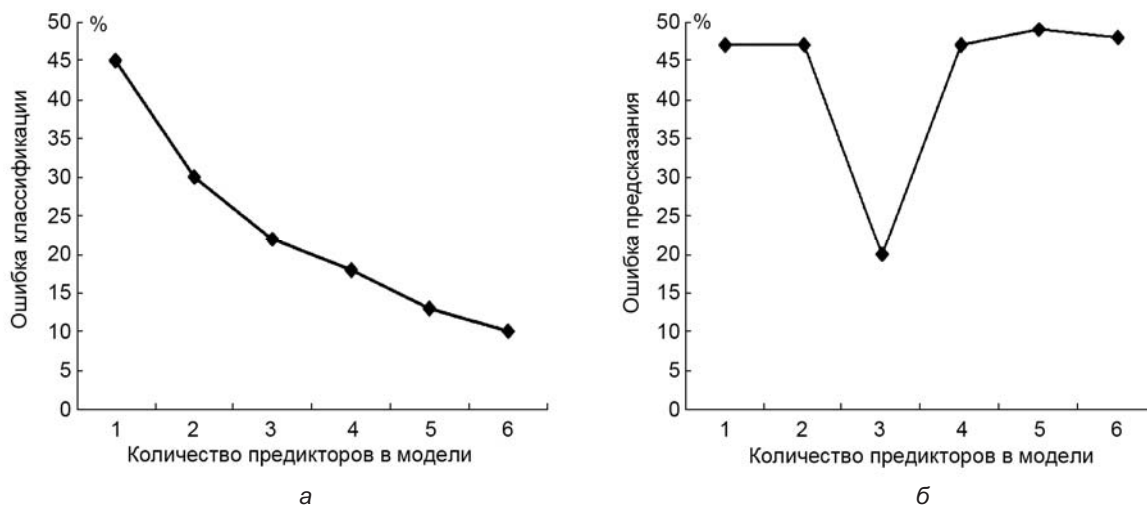


Рис. 1. Пример трендов ошибок классификации (а) и предсказания (б) в зависимости от количества предикторов в модели (адаптировано из Alison A. Motsinger, 2006)

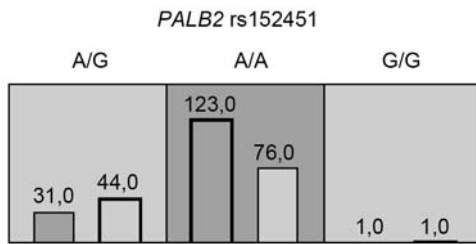


Рис. 2. Распределение сочетаний генотипов полиморфизма R559Q гена *PALB2* (rs152451) в группе больных РМЖ и в группе сравнения, здесь и на рис. 3, 4: темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска РМЖ, серые ячейки – генотипы пониженного риска, белые ячейки – отсутствуют сочетания генотипов, левые столбики – группа больных РМЖ, правые столбики – группа сравнения

В результате анализа межгенных взаимодействий в трехлокусной модели «*PALB2* (rs152451)/*XRCC1* (rs25487)/*XRCC3* (rs861539)» были обнаружены 11 сочетанных генотипов повышенного риска развития РМЖ и 7 сочетанных генотипов пониженного риска (рис. 3). У больных со злокачественными новообразованиями молочных желез высокими являются сочетания генотипов: СТ (rs861539, *XRCC3*)/СС-СТ (rs25487, *XRCC1*)/АА (rs152451, *PALB2*).

В состав четырехлокусной модели входят полиморфные варианты генов *PALB2* (rs152451), *XRCC1* (rs25487), *XRCC3* (rs861539) и *PALB2* (rs45516100). В данной модели было обнаружено 18 сочетанных генотипов повышенного риска развития РМЖ и 13 сочетанных генотипов пониженного риска (рис. 4). Наибольшей прогностической ценностью обладают следующие ассоциации генотипов: ТТ-ТГ (rs861539, *XRCC3*)/АА (rs152451, *PALB2*)/АА-АГ (rs25487, *XRCC1*)/ТТ (rs45516100, *PALB2*).

Возможности программы MDR позволяют представить в виде дендрограммы вклад каждого полиморфизма в риск развития РМЖ (возможны и другие варианты графической интерпретации – схемы Fruchterman-Rheingold, Circle Graph, Kamada-Kawaii и др.). Длинные линии в дендрограмме описывают слабую взаимосвязь между генами (рис. 5). И, соответственно, чем короче линии, соединяющие два предиктора, тем сильнее взаимодействие. Цвет каждой линии описывает тип взаимодействия: черный

и темносерый представляют синергетические взаимодействия, серый – независимый эффект; светлосерый описывает дублирующий эффект каждого предиктора.

Согласно схеме Fruchterman-Rheingold, из четырех анализируемых полиморфизмов наибольшим предсказательным потенциалом обладает полиморфизм R559Q (rs152451, *PALB2*) – 2,42% (рис. 5,а). Исходя из представленной ниже модели отмечен также слабой степени выраженности синергетический эффект в отношении одновременного вклада полиморфизмов Q399R (rs25487, *XRCC1*) и T241M (rs861539, *XRCC3*) – общий вклад составил 1,42%. В отношении полиморфизмов T1100T (rs45516100, *PALB2*) и R559Q (rs152451, *PALB2*) отмечается лишь дублирующий эффект в предсказательной ценности данной модели межгенных взаимодействий (рис. 5,б).

Исходя из данных анализа всех четырех моделей представляется возможным сделать заключение о ведущей роли полиморфизма R559Q в гене *PALB2* среди всех анализируемых в данной работе однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП). Вклад полиморфных вариантов генов *XRCC1* и *XRCC3* представляется менее существенным и может нести дополнительную смысловую нагрузку в контексте совместного определения при генетическом тестировании для уточнения риска осложнений при лучевой и адъювантной химиотерапии. Роль этих ОНП в ответе опухолевого узла и отдаленных метастазов на проводимое лечение была продемонстрирована в ряде исследований [16, 17]. Роль полиморфизма T1100T (rs45516100, *PALB2*), представляющего собой синонимичную замену, является и вовсе незначительной.

В то же время MDR позволяет оценить суммарный вклад нескольких ОНП и их ассоциаций в предсказательный потенциал модели. Для этих целей в «Конструкторе атрибутов» (Attribute Construction) имеется возможность создания новой переменной. На основе этого были созданы новые переменные: для модели № 3 – «rs152451/rs25487/rs861539», для модели № 4 – «rs152451/rs25487/rs45516100/rs861539».

Анализ показал, что суммарный вклад новой переменной в предсказательный потенциал модели № 3 составил 6,72%, модели № 4 – 8,22% (рис. 6).

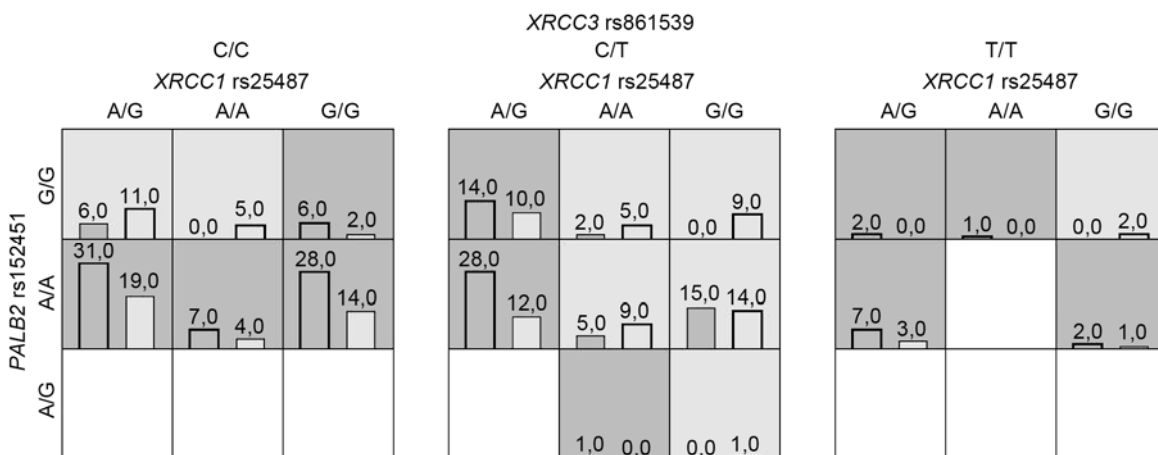


Рис. 3. Распределение сочетаний генотипов полиморфных вариантов генов *PALB2* (rs152451)/*XRCC1* (rs25487)/*XRCC3* (rs861539) в группе больных РМЖ и в группе сравнения

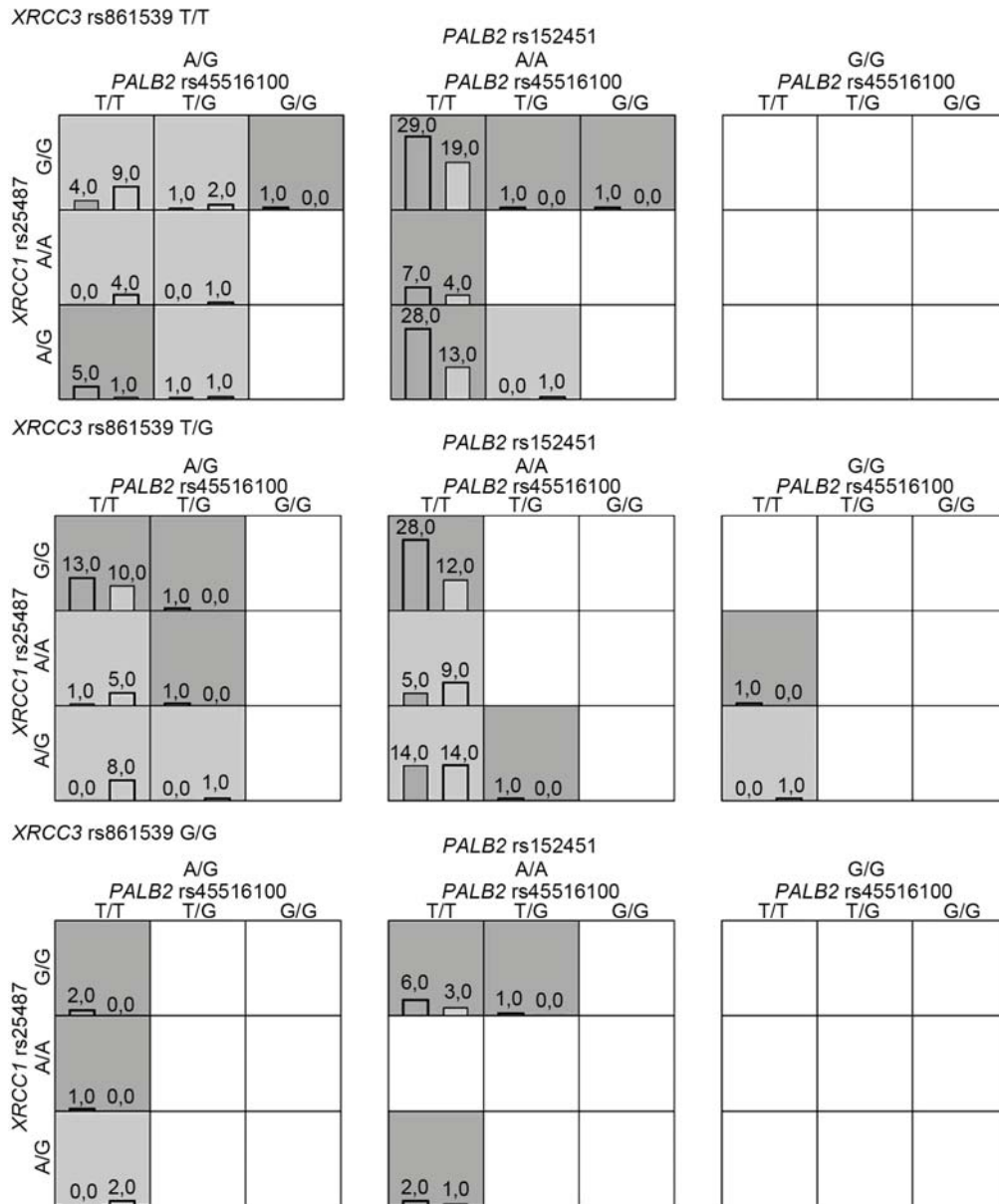


Рис. 4. Распределение сочетаний генотипов полиморфных вариантов генов *PALB2* (rs152451)/*XRCC1* (rs25487)/*XRCC3* (rs861539)/*PALB2* (rs45516100) в группе больных ПМЖ и в группе сравнения

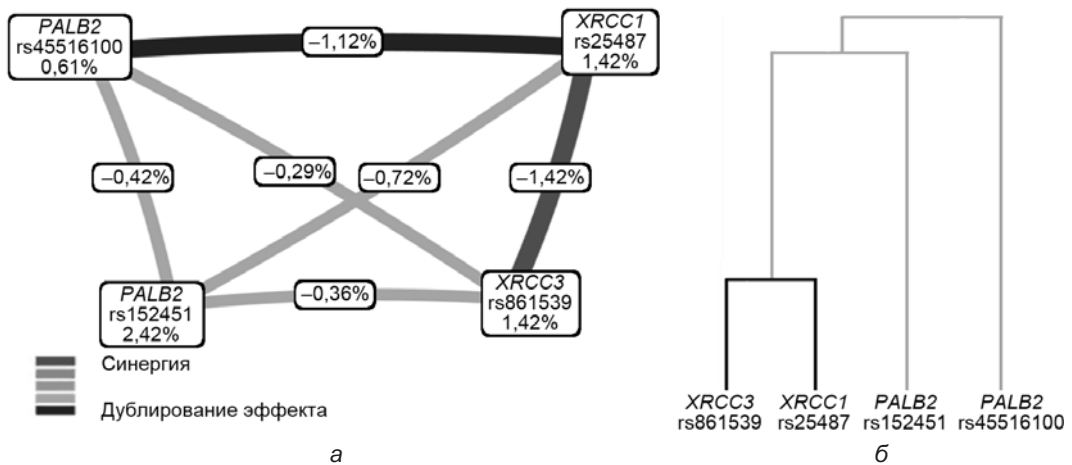


Рис. 5. Графическое отображение результатов анализа взаимодействий между генами *PALB2*, *XRCC1* и *XRCC3* при ПМЖ: на вершинах многогранника представлена информационная ценность каждого маркера, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары генов; а – схема Fruchterman-Rheingold; б – дендрограмма

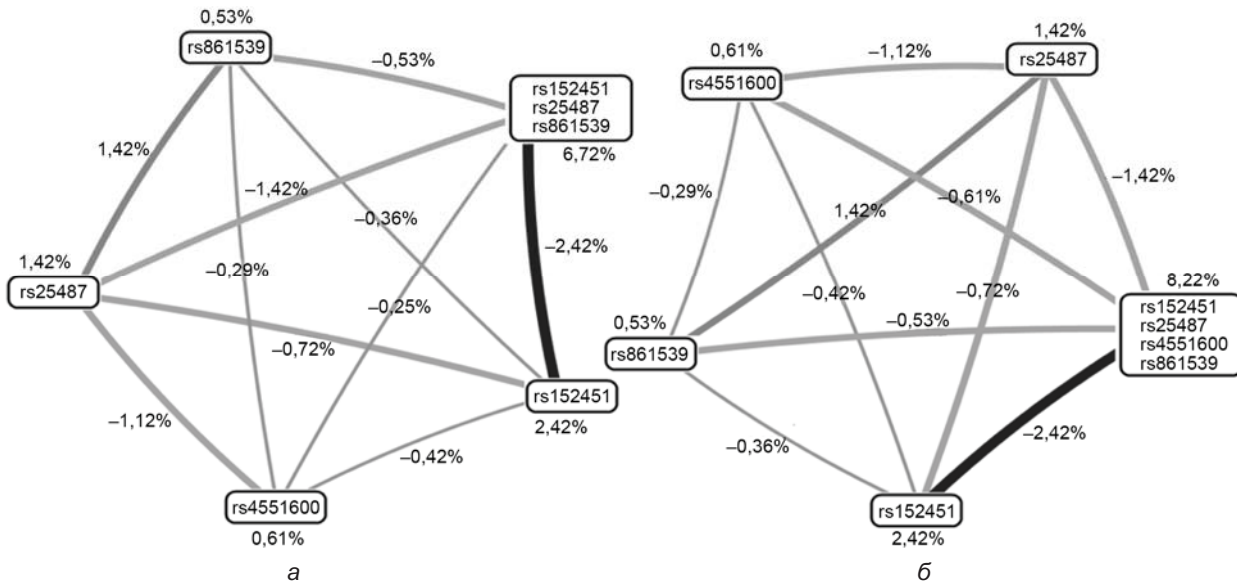


Рис. 6. Графическое отображение результатов анализа взаимодействий между генами *PALB2*, *XRCC1* и *XRCC3* при РМЖ: на вершинах многогранника представлена информационная ценность каждого маркера, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары генов; а – модель № 3 (схема Fruchterman-Rheingold); б – модель № 4 (схема Fruchterman-Rheingold)

Установление взаимосвязей между генами и фенотипическими проявлениями заболевания является важнейшим условием для выделения ключевых звеньев патогенеза, затрагивающих определенные физиологические функции, посредством которых формируется клиническая картина болезни. Рассмотренные модели свидетельствуют о вкладе исследуемых в данной работе ОНП генов репарационных систем в развитие РМЖ. Увеличение спектра изучаемых полиморфизмов генов как репарационных, так и других систем, участвующих в формировании предрасположенности к РМЖ, а также дальнейший анализ межгенных взаимодействий позволит приблизиться к лучшему пониманию их роли в патогенезе РМЖ. Ранее были проведены исследования с помощью биоинформатического метода MDR о роли генов антиоксидантной системы (*SOD1*, *SOD2*, *GPX1* и др.) в патогенезе РМЖ [12], влиянии ассоциации клинически значимых полиморфизмов генов системы биотрансформации ксенобиотиков на препараты ряда таксанов при химиотерапии [13], а также роли полиморфизма генов семейства GST в метаболизме препаратов антрациклинового ряда у пациентов с РМЖ [14]. Наиболее масштабным исследованием в области межгенных исследований при РМЖ является работа Roger L. Milne и соавт., в которой был проведен анализ 474 полиморфизмов в 120 генах (более 30 метаболических путей) [15].

К сожалению, это единственное исследование, проведенное с помощью MDR, где анализировался вклад генов *XRCC1* и *XRCC3* в риск развития РМЖ. В отношении гена *PALB2* в данном контексте оригинальных научных исследований в отечественной и зарубежной литературе найти не удалось. Возможно, это первая работа такого рода. В то же время, как отмечает Roger L. Milne, интерполировать результаты MDR с одной выборки на другую необходимо с известной мерой осторожности, так как учесть все факторы, влияющие на риск развития патологии, не представляется возможным.

Заключение

Значение величины тестируемой сбалансированной точности (Testing Ball. Acc.) для всех исследованных моделей не превышало критического уровня для мультилокусных моделей (менее 0,7), несмотря на тот факт, что обнаруженные межгенные взаимодействия были статистически значимыми.

На наш взгляд, получение такого результата может быть обусловлено несколькими причинами. Во-первых, обследованная выборка пациентов с РМЖ являлась гетерогенной по ряду клинико-морфологических характеристик. Для выявления более значимых показателей ассоциации целесообразно строже стратифицировать группы по типу РМЖ (гистологическая классификация, молекулярные подтипы РМЖ). Во-вторых, перечень генов, участвующих в патогенезе РМЖ, намного шире. Не были рассмотрены гены, отвечающие за контроль клеточного цикла, метаболизм ксенобиотиков, фолатный цикл, метаболизм алкоголя и т.д. И, наконец, исследуемые полиморфные варианты генов *XRCC3*, *XRCC1* и *PALB2* не являются строго специфичными для РМЖ и участвуют в образовании ряда других форм онкопатологии.

В целом компьютерная рандомизация выборок, реализованная с помощью данного биоинформатического подхода, позволила выявлять межгенные взаимодействия более высокого порядка, которые невозможно оценить с помощью традиционно используемых на сегодняшний день непараметрических статистических критериев. С биологических позиций межгенные взаимодействия в системе редокс-регуляции могут формироваться на различных уровнях: начиная с взаимодействий транскрипционных факторов с вариабельными участками промоторов генов до нелинейных взаимодействий ферментов через общие метаболические пути.

Планируется в дальнейшем расширить спектр анализируемых генов, включив основные патогенетически значимые полиморфизмы систем контроля

клеточного цикла (гены *TP53*, *HMMR*, *ATM*), биотрансформации ксенобиотиков (гены *GSTT1*, *GSTP1*, *EPHX1*, *GSTM1*, *NAT2*), фолатного цикла (ген *MTHFR*) и метаболизма алкоголя (гены *ALDH2*, *ADH1B*, *DRD3*).

Литература

1. *Статистика онкологических заболеваний* / под ред. О.Г. Суконко. Белорусский канцер-регистр. Минск, 2013. С. 374.
2. Motsinger A.A., Ritchie M.D. Multifactor dimensionality reduction: an analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies // *Hum Genomics*. 2006. P. 318–328.
3. Moore J.H., Gilbert J.C., Tsai C.T. et al. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility // *J. Theor. Biol.* 2006. P. 252–261.
4. Hahn L.W., Ritchie M.D., Moore J.H. et al. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions // *Bioinformatics*. 2003. P. 376–382.
5. Moore J. Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction // *Expert review of molecular diagnostics*. 2004. V. 4 (6). P. 795–803.
6. Moore J., Gilbert J.C., Chia-Ti T. et al. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility // *Journal of Theoretical Biology*. 2006. V. 241 (2). P. 252–261.
7. Moore J., Williams S. Epistasis and its implications for personal genetics // *Am. J. Hum. Genet.* 2009. P. 309–320.
8. Kheirelseid E.A., Jumustafa H., Miller N. et al. Bilateral breast cancer: analysis of incidence, outcome, survival and disease characteristics // *Breast Cancer Res Treat.* 2011. V. 126. P. 131–140.
9. Кипень В.Н., Снытков Е.В., Мельнов С.Б. Роль генов репарационных систем: *XRCC1* (эксцизионная репарация оснований), *XRCC3* и *PALB2* (гомологичная рекомбинация) – в генезе рака молочной железы у пациенток из Республики Беларусь // Сб. статей Международной науч.-практ. конференции «Теория и практика науки третьего тысячелетия». РИЦ БашГУ, Уфа. 2014. С. 296–301.
10. <http://www.multifactor dimensionality reduction.org/> (дата доступа: 01.06.2014).
11. Milne R.L., Fagerholm R., Nevanlinna H. et al. The importance of replication in gene-gene interaction studies: multifactor dimensionality reduction applied to a two-stage breast cancer case-control study // *Carcinogenesis*. 2008. P. 1215–1218.
12. Oestergaard M.Z., Tyrer J., Cebrian A. et al. Interactions between genes involved in the antioxidant defence system and breast cancer risk // *Br. J. Cancer*. 2006. P. 525–531.
13. Tulsyan S., Chaturvedi P., Singh A.K. et al. Assessment of clinical outcomes in breast cancer patients treated with taxanes: multi-analytical approach // *Gene*. 2014. P. 69–75.
14. Tulsyan S., Chaturvedi P., Agarwal G. et al. Pharmacogenetic influence of *GST* polymorphisms on anthracycline-based chemotherapy responses and toxicity in breast cancer patients: a multi-analytical approach // *Mol. Diagn. Ther.* 2013. P. 371–379.
15. Milne R.L., Fagerholm R., Nevanlinna H. The importance of replication in gene-gene interaction studies: multifactor dimensionality reduction applied to a two-stage breast cancer case-control study // *Carcinogenesis*. 2008. P. 1215–1218.
16. Zhou Y., Zhou W., Liu Q. et al. *XRCC1* R399Q polymorphism and risk of normal tissue injury after radiotherapy in breast cancer patients // *Tumour. Biol.* 2014. P. 35 (1). P. 21–25.
17. Castro E., Olmos D., Garcia A. et al. Role of *XRCC3*, *XRCC1* and *XPB* single-nucleotide polymorphisms in survival outcomes following adjuvant chemotherapy in early stage breast cancer patients // *Clin. Transl. Oncol.* 2014. V. 16 (2). P. 158–165.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ – ВКЛАД ГЕНОВ *XRCC1*, *XRCC3* И *PALB2*

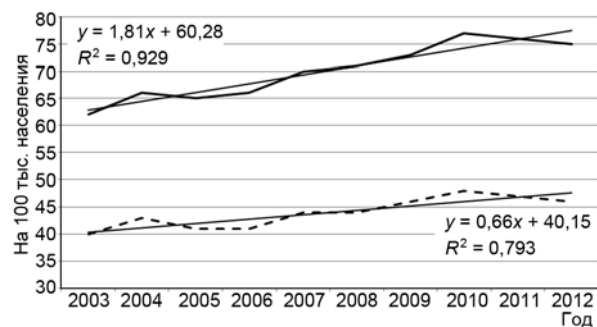
В.Н. Кипень, С.Б. Мельнов

Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова,
НИИ экологических проблем, г. Минск, Республика Беларусь

Введение

В структуре всех злокачественных новообразований женского населения Республики Беларусь частота злокачественных новообразований молочной железы в 2012 г. составила 17,7%. Так, по данным Белорусского канцер-регистра, интенсивные показатели заболеваемости (на 100 тыс. женского населения) демонстрируют ежегодное увеличение частоты выявления новых случаев заболевания. За период 2003–2012 гг. отмечено увеличение первичной заболеваемости с 61,7 до 76,6 (рис. 1).

Рак молочной железы (РМЖ) чрезвычайно редко встречается в возрасте до 20 лет. Число случаев его значительно возрастает между 25 и 60 годами, после чего рост продолжается, но медленнее. Риск развития рака молочной железы в возрасте после 65 лет приблизительно в 6 раз выше, чем до 65 лет, и почти в 150 раз выше, чем в возрасте до 30 лет. Поздняя менопауза (после 55 лет) также увеличивает риск развития РМЖ.



— Интенсивные показатели — Стандартизированные показатели

Рис. 1. Динамика интенсивных и стандартизованных показателей заболеваемости злокачественными новообразованиями молочной железы на 100 тыс. женского населения (по данным Белорусского канцер-регистра, сборник «Статистика онкологических заболеваний», 2013)

Одним из приоритетных направлений исследования патогенеза РМЖ является выявление предрасполагающих к раннему развитию данной онкопа-

тологии генотипов и их ассоциаций. В то же время генотипирование по ключевым генам систем поддержания стабильности генома (в частности, систем репарации повреждений ДНК) позволяет адекватно выбирать курсы лучевой и адъювантной химиотерапии в рамках персонифицированного подхода в медицине.

В 2000 г. Penu и соавторы использовали молекулярные микрочипы, содержащие гибридационные пробы к более чем 8 тыс. мРНК, чтобы получить индивидуальные экспрессионные профили опухолей РМЖ [1]. Использование кластерного анализа позволило выделить панель из приблизительно 400 генов, которые координированно варьировали по уровню экспрессии между образцами, детерминируя пять различных базовых экспрессионных профилей. Впоследствии существование этих молекулярных подтипов неоднократно было подтверждено в независимых исследованиях [2, 3]. Более того, оказалось, что профиль экспрессии сохраняется схожим между первичной и метастатической опухолью, даже если последняя развивается несколько лет спустя [4].

Жизнеспособность экспрессионной классификации и повсеместное ее признание обеспечил тот факт, что разные подтипы РМЖ не просто имели отличные друг от друга наборы молекулярных маркеров. Оказалось, что они характеризуются специфической биологией, прогнозом и требуют особых терапевтических подходов. Пациенты с опухолями люминального А типа имеют самое длительное время выживаемости. Базальные и Her-2/neu-позитивные РМЖ характеризуются наихудшим прогнозом и наименьшей выживаемостью. Люминальные В опухоли занимают промежуточное место. Доказано, что молекулярный подтип является независимым прогностическим признаком и с высокой точностью предсказывает эффективность проводимой терапии [5].

Нами была предпринята попытка проанализировать связь данных генотипирования с возрастом постановки диагноза РМЖ, оценить возможный вклад молекулярных маркеров (исследуемые в данной работе однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП)) РМЖ в контексте гистологического типа опухоли, а также дать оценку их вклада в формирование молекулярных подтипов РМЖ (согласно вышеприведенной классификации).

Материал и методы

В исследование были включены 146 пациентов с молатеральным РМЖ. Группа билатерального РМЖ составила: 2 случая синхронного билатерального РМЖ (временной критерий синхронности билатеральных форм составил не более 12 мес [7]) и 7 случаев метахронного билатерального РМЖ. Средний возраст пациентов с молатеральным РМЖ на момент возникновения опухоли составил (43,2 ± 5,9) года (возрастной интервал – 24–54 лет), пациентов с билатеральными формами РМЖ – (39,8 ± 5,0) года (возрастной интервал 33–48 лет).

В группу сравнения вошли 123 условно здоровых пациента без онкологической патологии в анамнезе на момент забора крови, средний возраст составил (39,6 ± 5,1) года (возрастной интервал 25–52 года). Группа сравнения соответствовала по возрасту и этническому составу выборке больных РМЖ.

Все участники исследования подписали информированное согласие на проведение молекулярно-генетических исследований.

Все образцы ДНК были выделены из лейкоцитов периферической крови с помощью наборов «ДНК-экспресс кровь» НПФ «Литех» (Россия), а также с помощью метода водно-карбинольной экстракции по протоколу Helene C. Johanson с модификациями [7].

Анализ ОНП T1100T и R559Q в гене *PALB2*, а также Q399R в гене *XRCC1* и T241M в гене *XRCC3* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на приборе PeqLab Primus 96 Advanced (Германия) с последующей обработкой соответствующими рестриктазами (метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)). Последовательности олигонуклеотидов и характеристики ПЦР-продуктов и рестриктов (с указанием температуры отжига T_a и используемых рестриктаз фирмы NEB) представлены в табл. 1.

Разделение аллелей осуществляли в 10%-м неденатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей окраской бромистым этидием (рис. 2).

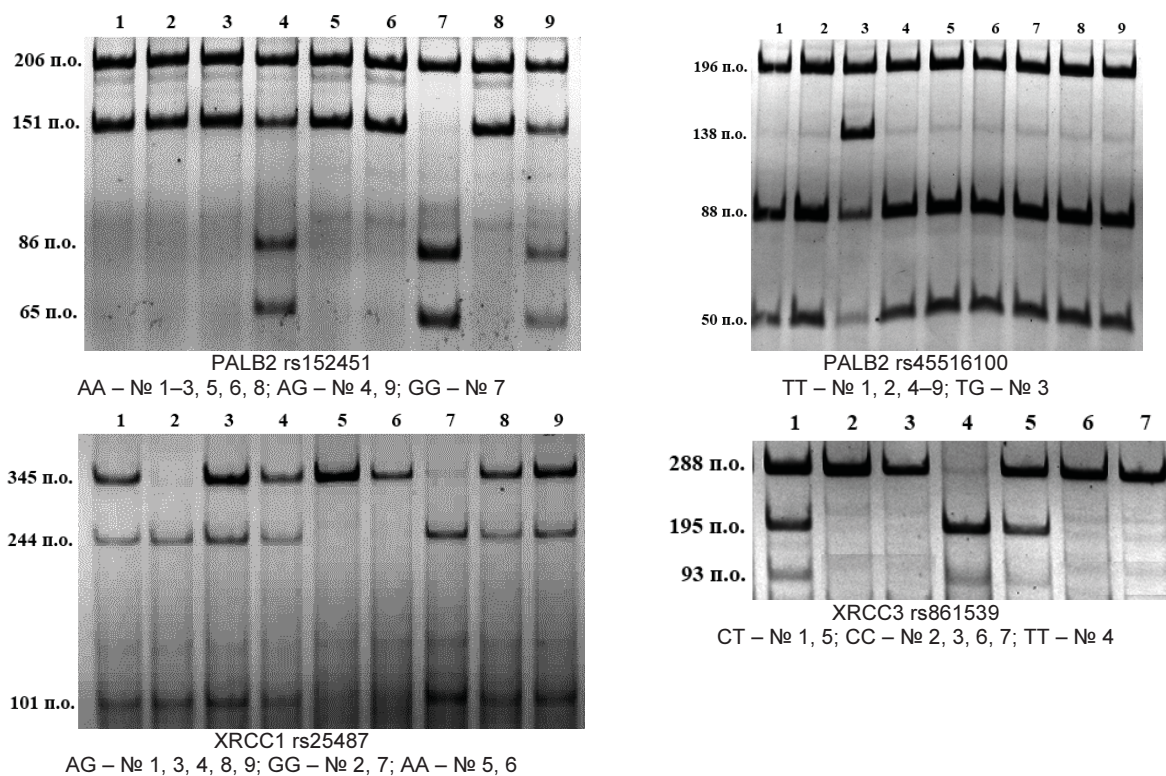
Обработка полученных данных выполнялась с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics 20 for Windows. Применялся критерий χ^2 (при $n < 5$ – точный критерий Фишера). Обсуждаются результаты со статистической значимостью различий при $p < 0,05$ и с тенденцией различий при $p < 0,1$.

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидов, используемых в ПЦР

| Ген/полиморфизм (rs) | Последовательность праймера 5'>3' | T_a , °C | Метод* | Размер рестриктов (п.о.) |
|----------------------------------|--|------------|---------------|---|
| <i>PALB2</i> T1100T (rs45516100) | F 5'-TGTCACCCATAGAGTAGCA-3' R 5'-CTCAACAGTTCCTAGACGGCA-3' | 56 | ПДРФ (HinfI) | TT (25,50,88,196) TG (25,50,88,138,196) GG (25,138,196) |
| <i>PALB2</i> R559Q (rs152451) | F 5'-AAAAGGAAGTGCCAGGCAAATAGT-3' R 5'-TGCACAGGACAACCAAGTTC-3' | 56 | ПДРФ (TaqI) | GG (65,86,206) AG (65,86,151,206) AA (151,206) |
| <i>XRCC1</i> Q399R (rs25487) | F 5'-ACTGCTCCTCCAGCCTTTTC-3' R 5'-CAACACCCCAAGTACAGCC-3' | 56 | ПДРФ (MspI) | AA (345) AG (101,244,345) GG (101,244) |
| <i>XRCC3</i> T241M (rs861539) | F 5'-TGGTCATCGACTCGGTGGCA-3' R 5'-TTCTCGATGGTTAGGCACAGGCT-3' | 64 | ПДРФ (NlaIII) | CC (288) CT (93,195,288) TT (93,195) |

* ПДРФ (приведена эндонуклеаза рестрикции).



Результаты и обсуждение

Связь данных генотипирования с возрастом верификации диагноза РМЖ

Группа пациентов с РМЖ была разделена на четыре подгруппы в зависимости от возраста постановки диагноза. В качестве пограничных значений использовали возраст 30, 35, 40 и 45 лет. Отдельно была исследована группа пациентов с моностеральным РМЖ. Результаты статистического анализа приведены в табл. 2.

Таблица 2

Связь данных генотипирования с возрастом постановки диагноза РМЖ

| Группа | Полиморфизм | | | |
|------------------------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | PALB2 T1100T | PALB2 R559Q | XRCC1 Q399R | XRCC3 T241M |
| Все случаи РМЖ (156 человек) | | | | |
| Возраст диагноза (до/после 30 лет) | NS | NS | NS | NS |
| Возраст диагноза (до/после 35 лет) | NS | NS | 0,063 | NS |
| Возраст диагноза (до/после 40 лет) | NS | NS | NS | NS |
| Возраст диагноза (до/после 45 лет) | NS | NS | NS | 0,081 |
| Моностеральный РМЖ (146 человек) | | | | |
| Возраст диагноза (до/после 30 лет) | NS | NS | NS | NS |
| Возраст диагноза (до/после 35 лет) | NS | NS | NS | NS |
| Возраст диагноза (до/после 40 лет) | NS | NS | NS | NS |
| Возраст диагноза (до/после 45 лет) | NS | NS | NS | 0,067 |

Так, при исследовании связи данных генотипирования с возрастом постановки диагноза в группе

«Все случаи РМЖ» была обнаружена статистически значимая связь на уровне тенденции ($p < 0,1$) между ОНП Q399R гена XRCC1 с возрастной группой «до/после 35 лет» ($p = 0,063$), а также ОНП T241M гена XRCC3 с возрастной группой «до/после 45 лет» ($p = 0,081$) (рис. 3, 4). В группе «Моностеральный РМЖ» была обнаружена статистически значимая связь на уровне тенденции ($p < 0,1$) между ОНП T241M гена XRCC3 с возрастной группой «до/после 45 лет» ($p = 0,067$) (рис. 4).

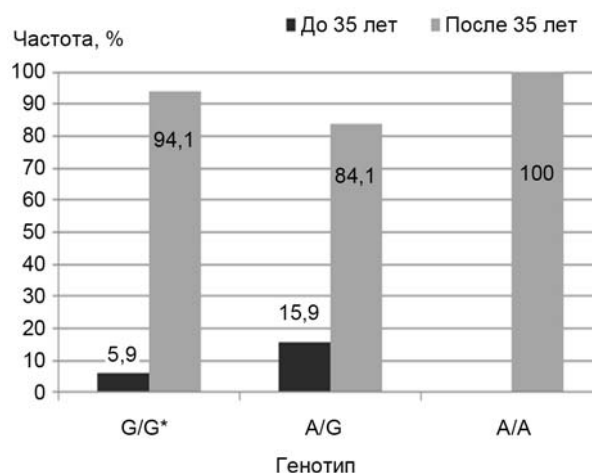


Рис. 3. Наличие связи между ОНП Q399R гена XRCC1 и возрастом манифестации

Полученные данные свидетельствуют, что минорный аллель G (Q399R, ген XRCC1) встречается только у пациентов моложе 35 лет. Относительно полиморфизма T241M (ген XRCC3) следует отметить, что более чем у 80% пациентов с РМЖ с генотипом ТТ диагноз был верифицирован до 45 лет.

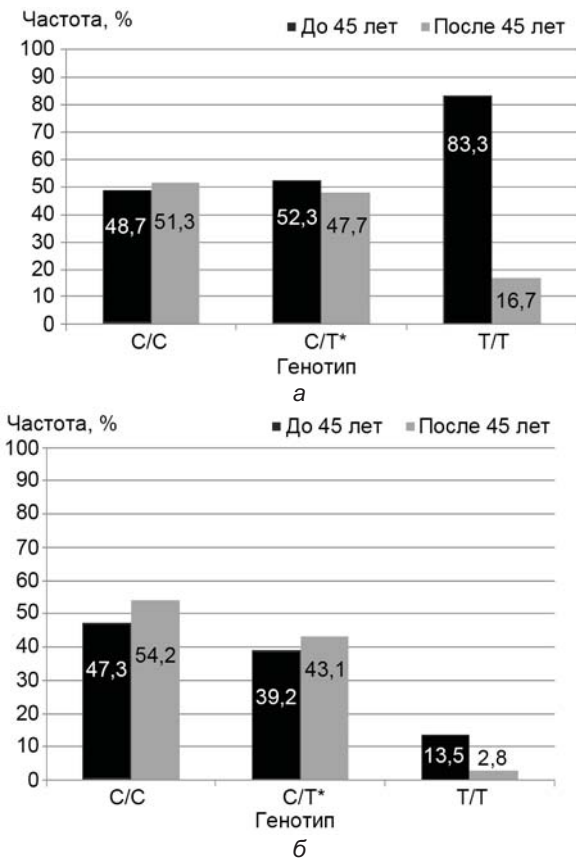


Рис. 4. Наличие связи между ОНП T241M гена XRCC3 и возрастом манифестации: а – все случаи РМЖ; б – монилатеральный РМЖ

Более детальный анализ с использованием алгоритма доминантной модели наследования позволил выявить статистически значимые различия (с уровнем значимости $p = 0,03$) (табл. 3).

Таблица 3

Доминантная модель наследования для полиморфизма Q399R в гене XRCC1

| Генотип | Случаи (156 человек) | Группа сравнения (123 человека) | χ^2 | p | OR | |
|---------|----------------------|---------------------------------|----------|------|-------|-----------|
| | | | | | знач. | 95%-й CI |
| A/A | 0,103 | 0,195 | 4,80 | 0,03 | 0,47 | 0,24–0,93 |
| A/G+G/G | 0,897 | 0,805 | | | 2,12 | 1,07–4,20 |

В то же время при анализе таблиц сопряженности для данных генотипирования, разделенных на группы согласно табл. 2 (A/A и A/G+G/G), и возраст-

том постановки диагноза РМЖ статистически значимых различий выявлено не было.

Анализ роли исследуемых ОНП в контексте гистологического типа РМЖ

В настоящее время в клинической онкологии ведется интенсивный поиск прогностических молекулярно-биологических маркеров. Клиническая значимость определения молекулярных маркеров РМЖ заключается в выявлении группы риска, требующей дополнительного лечения или более тщательного наблюдения среди больных ранними стадиями или не подлежащих адъювантной терапии по другим клиническим и лабораторным показателям. Таким образом, оценка чувствительности к определенным видам терапии в контексте гистологического типа опухоли позволяет индивидуализировать схемы адъювантного лечения больных с распространенным процессом.

В гистологическом плане среди раковых опухолей молочной железы выделяют следующие типы: неинвазивный рак (*in situ*), инвазивный рак (инфильтрирующая карцинома) и особые (анатомо-клинические) формы. Случаи инвазивного рака принято делить на протоковую форму (50–70% всех случаев), дольковую (около 20%), медуллярную (5–10%) и другие формы.

В исследуемой группе пациентов с РМЖ диагноз «инфильтрирующая протоковая карцинома» на основании гистологического исследования был верифицирован приблизительно в половине всех случаев (50,97%), дольковая карцинома – почти в 26% случаев, на оставшиеся 23% приходятся остальные, менее распространенные формы РМЖ, такие как фибросаркома БДУ, тубулярная аденокарцинома, солидная карцинома, медуллярная карцинома и др. (рис. 5).

Была предпринята попытка сравнить подгруппы пациентов с РМЖ между собой в зависимости от данных генотипирования, а также учитывая гистологический тип опухолевого узла. Анализировали таблицы сопряженности с помощью метода χ^2 (двусторонний). Были выделены три подгруппы в зависимости от гистологического заключения: 1) пациенты с инфильтрирующей протоковой карциномой; 2) пациенты с дольковой карциномой и 3) другие типы.

Первичный статистический анализ не выявил какие-либо зависимости между результатами генотипирования и гистологическим типом опухоли (табл. 4).

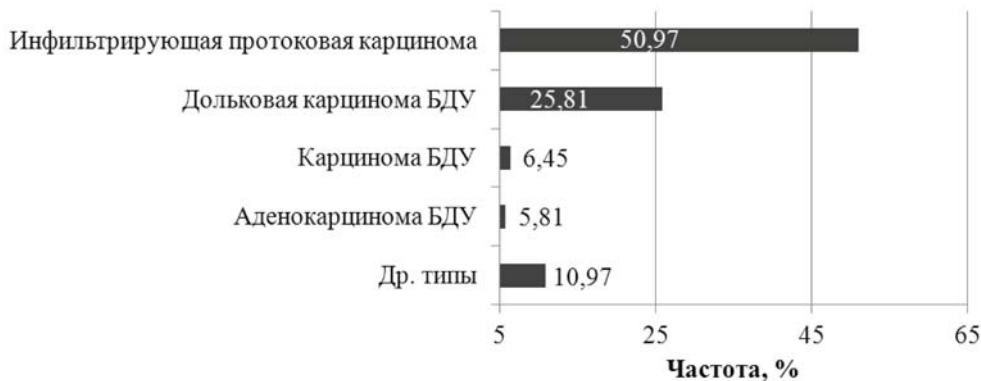


Рис. 5. Распределение частот встречаемости типов РМЖ в основной группе

Связь данных генотипирования с гистологическим типом РМЖ

| Генотип | Гистологический тип опухоли (155 человек) | | | p |
|---------------------------|---|--------------------------------------|--------------------------|----|
| | Инфильтрирующая протоковая карцинома (79 человек) | Дольковая карцинома БДУ (40 человек) | Другие типы (36 человек) | |
| T1100T PALB2 (rs45516100) | | | | |
| T/T | 92,4% (73/79) | 95,0% (38/40) | 97,2% (35/36) | NS |
| T/G | 6,3% (5/79) | 2,5% (1/40) | 2,8% (1/36) | NS |
| G/G | 1,3% (1/79) | 2,5% (1/40) | – | NS |
| Q399R XRCC1 (rs25487) | | | | |
| A/A | 11,4% (9/79) | 10,0% (4/40) | 8,3% (3/36) | NS |
| A/G | 60,8% (48/79) | 57,5% (23/40) | 47,2% (17/36) | NS |
| G/G | 27,8% (22/79) | 32,5% (13/40) | 44,4% (16/36) | NS |
| R559Q PALB2 (rs152451) | | | | |
| A/A | 82,3% (65/79) | 75,0% (30/40) | 77,8% (28/36) | NS |
| A/G | 16,5% (13/79) | 25,0% (10/40) | 22,2% (8/36) | NS |
| G/G | 1,3% (1/79) | – | – | NS |
| T241M XRCC3 (rs861539) | | | | |
| C/C | 45,6% (36/79) | 60,0% (24/40) | 50,0% (18/36) | NS |
| C/T | 48,1% (38/79) | 32,5% (13/40) | 38,9% (14/36) | NS |
| T/T | 6,3% (5/79) | 7,5% (3/40) | 11,1% (4/36) | NS |

Примечание. Здесь и в табл. 5: NS – not significant, статистически значимых различий не выявлено; использовали критерий χ^2 , при $n < 5$ точный критерий Фишера.

На основании проведенного анализа можно сделать предположение, что отсутствие статистически значимых различий может быть отчасти объяснено неиспользованием в данной работе мощных профессиональных многофакторных алгоритмов статистического анализа, в частности ввиду сложности в интерпретации результатов многофакторного дисперсионного анализа. Так, в исследовании проводился только однофакторный анализ, т.е. исследовалась связь одного ОНП (каждого из четырех ОНП по отдельности).

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что гистологический тип опухоли зависит от множества факторов и их взаимодействий. В перспективе планируется рассмотреть данный вопрос более подробно.

Анализ вклада ОНП систем репарации в формирование молекулярных подтипов РМЖ

Все карциномы молочной железы можно условно разделить на несколько молекулярных подтипов [5]:

- 1) две группы с положительным статусом по экспрессии эстрогеновых рецепторов (ER), относящиеся к люминальным подтипам А и В;
- 2) группа, в избытке экспрессирующая рецепторы Her-2/neu;
- 3) группа, в которой экспрессия маркерных генов молочной железы остается в норме и включает базальные или трижды негативные опухоли (рис. 6).

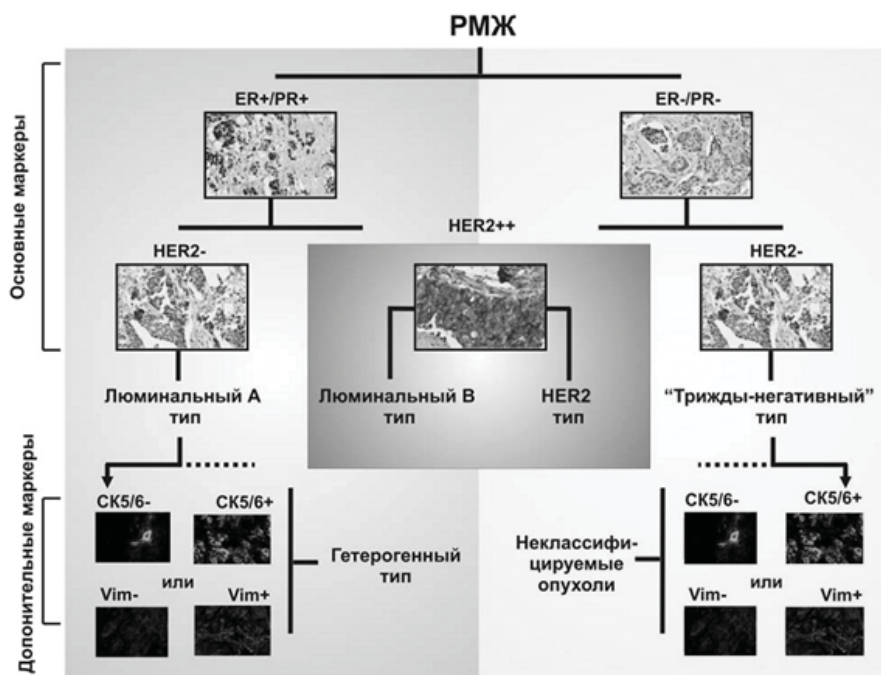


Рис. 6. Молекулярные подтипы карцином молочной железы (адаптировано из Кулигина и соавт. [8])

Ниже приведены характеристики выделенных Рерu и соавт. типов РМЖ.

1) Люминальный А (luminal A).

Частота: 30–5%. *Кластер генов, высоко экспрессированных в опухолях:* эстрогеновый рецептор (*ESR1*) *XBP1, FOXA1, GATA3, TTF3, LIV3, HER4, PIK3R1*, люминальные цитокератины (*KRT8/18*) [9]. *Иммуногистохимические (ИГХ) маркеры:* ER/PR+, HER2-, KRT8/18+. *Активированные пути и процессы:* ER сигнальный путь, метаболизм жирных кислот. *Клинико-патологические и прогностические особенности:* эстрогензависимые опухоли; характерен более поздний возраст на момент диагноза, высокая степень дифференцировки, низкий пролиферативный индекс. Опухоли этого типа менее агрессивны, характеризуются лучшим прогнозом по сравнению с рецепторнегативными раками [10, 11].

2) Люминальный В (luminal B).

Частота: 14–18%. *Кластер генов, высоко экспрессированных в опухолях:* *ESR1, CCNB1, MKI67 (Ki-67), MYBL, CCNE1, ERBB2, GRB7, HRAS* [12]. *ИГХ маркеры:* ER/PR+; HER+; Ki-67 >13% [13]. *Активированные пути и процессы:* HER2-сигнальный путь, пролиферация. *Клинико-патологические и прогностические особенности:* эстрогензависимые агрессивные опухоли; характерен ранний возраст диагноза, низкая дифференцировка, высокий пролиферативный индекс, большой размер опухоли, вовлечение лимфатических узлов. Опухоли этого типа имеют значительно худший прогноз и большую вероятность рецидивов, чем другие рецепторпозитивные опухоли. Они часто не чувствительны к тамоксифену и ингибиторам ароматазы, но обладают чувствительностью к трастузумабу [13].

3) Базальный, или трижды негативный (basal-like, triple-negative).

Частота: 27–39%. *Кластер генов, высоко экспрессированных в опухолях:* онкогены *NRAS, KRAS, C-KIT*, кадгерин Р (*CDH3*), ламинин-альфа/гамма (*LAMA5, LAMC1*), *MCM3/4/7*, базальные цитокератины (*KRT5/6/17*) [12]. *ИГХ маркеры:* ER-/PR-; HER2-; CK5/6+, EGFR (HER1)+, cadherin-P+; виментин+; c-kit+ [3, 14]. *Активированные пути и процессы:* p21-, p53-, FAS-сигнальные пути, фосфорилирование белков, стимуляция клеточного цикла и пролиферации, дедифференцировка. *Клинико-патологические и прогностические особенности:* эстрогеннезависимые агрессивные опухоли. Характерен ранний возраст диагноза, протоковый или метастатический гистологический тип, низкая дифференцировка, высокий пролиферативный индекс, большой размер опухоли, вовлечение лимфатических узлов, ядерный плеоморфизм, некрозы, стромальный лимфатический ответ [11, 15, 16].

4) ERBB2 (HER2) позитивный.

Частота: 8–15%. *Кластер генов, высоко экспрессированных в опухолях:* *ERBB2 (HER2), GRB7, HRAS, MEK1/MEK2, AKT1* [17]. *ИГХ маркеры:* ER-/PR-; HER2+; Ki-67 >13% [13]. *Активированные пути и процессы:* EGFR/HER2-сигнальный путь, пролиферация. *Клинико-патологические и прогностические особенности:* эстрогеннезависимые агрессивные опухоли с высоким пролиферативным индексом. Характерна низкая дифференцировка, большой размер опухоли, вовлечение лимфатических узлов. Эффективно адъювантное назначение трастузумаба; не чувствительны к гормонотерапии.

Высокая вероятность негативного исхода заболевания [10, 17].

В исследуемой выборке пациентов с РМЖ распределение по молекулярным подтипам оказалось следующим: 46% случаев составил трижды негативный тип, 27,0% – люминальный А тип, около 16,9% – люминальный В тип (что в сумме с типом А составило 43,9%), 10,1% – HER2 тип (рис. 7). Следует отметить, что определить молекулярный подтип опухоли представлялось возможным лишь приблизительно в 60% всех случаев ввиду отсутствия данных ИГХ-анализа в анамнезе. Возрастная характеристика каждой группы следующая: люминальный А тип – (43,9 ± 6,5) года, люминальный В тип – (44,5 ± 4,3) года, HER2 тип – (40,9 ± 8,8) года, трижды негативный тип – (44,5 ± 5,6) года. Статистически значимых различий при сравнении возраста постановки диагноза в зависимости от молекулярного подтипа опухоли выявлено не было.

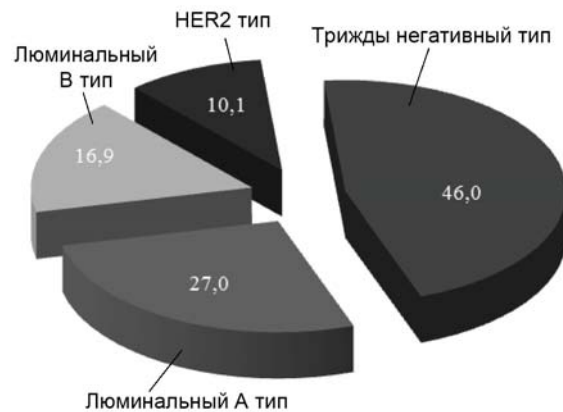


Рис. 7. Частота встречаемости молекулярных подтипов опухоли

Сравнительный анализ (с помощью таблиц сопряженности и точных двусторонних критериев) частот встречаемости генотипов по исследуемым ОНП среди подгрупп, сформированных на основании данных ИГХ анализа, а именно статуса РЭ, РП и Her-2/neu, не выявил статистически значимых различий. Однако следует отметить, что минорный аллель G (полиморфизм T1100T в гене *PALB2*) чаще встречался в группе трижды негативного РМЖ, а пациенты с генотипом GG встречались исключительно в данной группе (табл. 5).

Аналогичное сравнение для полиморфизма Q399R в гене *XRCC1* и R559Q в гене *PALB2* также не выявило различий. Так, все генотипы по данным ОНП распределены в подгруппах РМЖ схожим образом: например, гетерозиготное носительство по полиморфизму Q399R в гене *XRCC1* колеблется в пределах от 53,3% в подгруппе «Люминальный В тип» до 66,7% в подгруппе «Люминальный А тип» и «HER2 тип». Подгруппа «Трижды негативный тип» характеризуется промежуточным значением и частота данного генотипа составляла 56,1%.

Стоит отметить, что в течение многих лет онкологи пытаются классифицировать опухоли молочной железы, стремясь за цитологическими и гистологическими подобиями обнаружить общие биологические механизмы, однако попытки сгруппировать РМЖ, опираясь на особенности клинико-патологических параметров, оказываются неубедительными.

Связь данных генотипирования с молекулярным подтипом РМЖ

| Генотип | Молекулярный подтип РМЖ (89 человек) | | | | p |
|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|----------------------|------------------------------------|----|
| | Люминальный А тип (24 человек) | Люминальный Б тип (15 человек) | HER2 тип (9 человек) | Трижды негативный тип (41 человек) | |
| T1100T <i>PALB2</i> (rs45516100) | | | | | |
| T/T | 91,7% (22/24) | 100% (15/15) | 100% (9/9) | 90,2% (37/41) | NS |
| T/G | 8,3% (2/24) | – | – | 7,3% (3/41) | NS |
| G/G | – | – | – | 2,4% (1/41) | NS |
| Q399R <i>XRCC1</i> (rs25487) | | | | | |
| A/A | 8,3% (2/24) | 20,0% (3/15) | – | 12,2% (5/41) | NS |
| A/G | 66,7% (16/24) | 53,3% (8/15) | 66,7% (6/9) | 56,1% (23/41) | NS |
| G/G | 25,0% (6/24) | 26,7% (4/15) | 33,3% (3/9) | 31,7% (13/41) | NS |
| R559Q <i>PALB2</i> (rs152451) | | | | | |
| A/A | 70,8% (17/24) | 73,3% (11/15) | 88,9% (8/9) | 82,9% (34/41) | NS |
| A/G | 29,2% (7/24) | 26,7% (4/15) | 11,1% (1/9) | 17,1% (7/41) | NS |
| G/G | – | – | – | – | NS |
| T241M <i>XRCC3</i> (rs861539) | | | | | |
| C/C | 62,5% (15/24) | 40,0% (6/15) | 55,6% (5/9) | 56,1% (23/41) | NS |
| C/T | 37,5% (9/24) | 53,3% (8) | 33,3% (3/9) | 39,0% (16/41) | NS |
| T/T | – | 6,7% (1/15) | 11,1% (1/9) | 4,9% (2/41) | NS |

Описанная выше экспрессионная классификация РМЖ по Sorlie была принята повсеместно, но не безоговорочно. До сих пор ведутся дискуссии о том, какую панель генов следует использовать для наиболее аккуратной классификации опухолей, насколько гомогенны описанные подтипы и не надо ли вычлнить дополнительные группы (например, группу с низкой экспрессией клаудина (*claudin low*)) [18]. Кроме того, 10–30% опухолей вообще не удается с уверенностью отнести ни к одной из групп [19].

Таким образом, предпринятая авторами попытка сравнения частот распределения исследуемых ОНП генов систем репарации в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ не выявила статистически значимых различий: генотипы распределены с равной вероятностью. Ссылок на аналогичные исследования обнаружить не удалось. Предположительно более глубокий статистический анализ (многофакторные анализы – кластерный, дискриминационный, многофакторный дисперсионный, нейронные сети и др.) в дальнейшем позволит выявить скрытые закономерности.

Выводы

1. Обнаружена статистически значимая связь на уровне тенденции ($p < 0,1$) между ОНП Q399R гена *XRCC1*, а также ОНП T241M гена *XRCC3* и возрастом верификации диагноза РМЖ.

2. Не выявлено статистически значимых различий между результатами генотипирования по ОНП T1100T и R559Q (ген *PALB2*), Q399R (ген *XRCC1*) и T241M (ген *XRCC3*) и гистологическим типом опухоли.

3. Сравнительный анализ частот встречаемости генотипов по исследуемым ОНП среди подгрупп, сформированных на основании данных ИГХ анализа, а именно статуса РЭ, РП и Her-2/neu, не выявил статистически значимых различий.

Литература

1. Mullins M., Perreard L., Quackenbush J.F. et al. Agreement in breast cancer classification between microarray and quantitative reverse transcription PCR from fresh frozen and formalin fixed, paraffin embedded tissues // Clin. Chem. 2007. V. 53. P. 1273–1279.

2. Nathanson K.L. Breast cancer genetics: what we know and what we need // Nat. Med. 2001. V. 7. P. 552–556.

3. Nielsen T.O., Hsu F.D., Jensen K. et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma // Clin. Cancer Res. 2004. V. 10, № 16. P. 5367–5374.

4. O'Day E., Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer // Breast Cancer Res. 2010. V. 12, № 2. P. 201.

5. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. et al. Molecular portraits of human breast tumours // Nature. 2000. V. 406. P. 747–752.

6. Kheirifeld E.A., Jumustafa H., Miller N. et al. Bilateral breast cancer: analysis of incidence, outcome, survival and disease characteristics // Breast Cancer Res Treat. 2011. V. 126. P. 131–140.

7. Johanson H.C., Hyland V., Wicking C., Sturm R.A. DNA elution from buccal cells stored on Whatman FTA Classic Cards using a modified methanol fixation method // Biotechniques. 2009. V. 46 (4). P. 309–311.

8. Кулигина Е.Ш. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы // Практическая онкология, Т. 11, № 4. 2010. С. 203–216.

9. Hoadley K.A., Weigman V.J., Fan C. et al. EGFR associated expression profiles vary with breast tumor subtype // BMC Genomics. 2007. V. 8. P. 258.

10. Carey L.A., Perou C.M., Livasy C.A. et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study // JAMA. 2006. V. 295. P. 2492–2502.

11. Parker J.S., Mullins M., Cheang M.C. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes // J. Clin. Oncol. 2009. V. 27. P. 1160–1167.

12. Ferrer-Soler L., Vazquez-Martin A., Brunet J. et al. An update of the mechanisms of resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in breast cancer: Gefitinib (Iressa) - induced changes in the expression and nucleo-cytoplasmic trafficking of HER-ligands // Int. J. Mol. Med. 2007. V. 20 (1). P. 3–10.

13. Cheang M.C., Chia S.K., Voduc D. et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer // J. Natl. Cancer. Inst. 2009. V. 101. P. 736–750.

14. Livasy C.A., Karaca G., Nanda R. et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma // Mod. Pathol. 2006. V. 19. P. 264–271.

15. Jumppanen M., Gruvberger S., Kauraniemi P. et al. Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers // Breast Cancer Res. 2007. V. 9, № 1. P. 16.

16. Rakha E.A., El-Sheikh S.E., Kandil M.A. et al. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer // *Histopathology*. 2008. V. 52, № 1. P. 67–81.
17. Theillet C. What do we learn from HER2-positive breast cancer genomic profiles? // *Breast Cancer Res.* 2010. V. 12, № 3. P. 107.
18. Prat A., Parker J.S. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer // *Breast Cancer Res.* 2010. V. 12, № 5. P. 68.
19. Weigelt B., Mackay A., A'hem R. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis // *Lancet Oncol.* 2010. V. 11, № 4. P. 339–349.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ЦИТОКИНОВ И УРОВЕНЬ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

И.В. Кривошей, Н.И. Жернакова

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород

Согласно современным представлениям, гипертоническая болезнь (ГБ) наряду с ожирением, гиперинсулинемией, дислипидемией входит в состав метаболического синдрома [1]. Данные патологические состояния имеют общие этиопатогенетические механизмы: активация симпатоадреналовой системы, ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, блокада трансмембранных ионообменных механизмов, повышение реабсорбции Na в проксимальных и дистальных канальцах нефрона [2]. У 60% пациентов, страдающих только ГБ и не имеющих других клинических симптомов, на основе лабораторных тестов диагностируют метаболический синдром [3]. Риск сердечно-сосудистых заболеваний увеличивается у женщин в 5,9 раза, у мужчин – в 2,3 раза при сочетании ГБ с метаболическими нарушениями. Кроме того, ГБ у индивидов с метаболическим синдромом отличается ранней манифестацией заболевания и более высокими цифрами артериального давления (АД) [4].

Важную роль в патогенезе ГБ играют цитокины, в частности факторы некроза опухолей и их рецепторы, которые обладают рядом патогенетически значимыми для ГБ медико-биологическими эффектами (оказывают провоспалительное, иммуномодулирующее, цитотоксическое действие, активируют систему гемостаза, индуцируют апоптоз и др.) [5–7]. Поскольку активность цитокинов находится под контролем соответствующих генов, представляется целесообразным поиск генетических маркеров, ответственных за особенности клинического течения ГБ.

Цель исследования – изучить связи генетических полиморфизмов факторов некроза опухолей и

их рецепторов с уровнем АД у больных ГБ, имеющих метаболический синдром.

Материал и методы

Проведен анализ результатов наблюдений 145 больных метаболическим синдромом. В группу исследования включались русские жители Центрально-Черноземного региона России, не имеющие родственных связей между собой. Пациенты относились к соответствующей группе больных после установления диагноза, который подтверждался клиническими и лабораторно-инструментальными методами обследования. Клинико-лабораторное и инструментальное обследование больных осуществлялось на базе кардиологического отделения Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа.

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 8–9 мл, взятая из локтевой вены пробанда. Забор венозной крови производили в пробирки с консервантом, содержащим раствор ЭДТА концентрацией 0,5 моль (рН 8,0). Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществлялось методом фенольно-хлороформной экстракции [8].

Генотипирование локусов –308G/A *TNFα*, +250A/G *Lta*, +36A/G *TNFR1*, +1663A/G *TNFR2* осуществлялось методом детекции TagMan зондов по данным величин RFU (уровень относительной флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе IQ5 с детектирующей системой в режиме реального времени. Для дискриминации аллелей использовалась программа Bio-Rad IQ5-Standard Edition (табл. 1).

Таблица 1

Структура праймеров и зондов, использованных для генотипирования ДНК-маркеров методом ПЦР

| Ген | Полиморфизм и его локализация в гене | Структура праймеров и зондов | Температура отжига праймеров, °С | Литература |
|--------------|--------------------------------------|---|----------------------------------|------------|
| <i>TNFα</i> | –308G/A (промотор) | F: 5'-AAATGGAGGCAATAGGTTTTGAG-3' R: 5'-GGCCACTGACTGATTTGTGTGTAG-3' 5'-6FAM-CCGTCCTCATGCC- RTQ1-3' 5'-ROX-CCGTCCCCATGCC - RTQ1-3' | 52 | [8] |
| <i>Lta</i> | +250A/G (1 интрон) | F: 5'-CAG TCTCATTGTCTCTGTACACATT-3' R: 5'-ACAGAGAGACAGG AAGGGAACA-3' 5'-6FAM:CCATGGTTCCTCTC-RTQ1-3' 5'-ROX:CTGCCATGATTCC-RTQ1-3' | 50 | [9] |
| <i>TNFR1</i> | +36A/G (1 экзон) | F: 5'-AGCCACTCTCCCTTTGTC-3' R: 5'-CCACCGTGCCTGACCTG-3' 5'-6FAM: CTGCTGCCACTGGT-RTQ1 -3' 5'-ROX: CTGCTGCCGCTGGT-BHQ2 -3' | 62 | [10] |
| <i>TNFR2</i> | +1663G/A (3'UTR) | F: 5'-TGACCTGCAGGCCAAGAG-3' R: 5'-CCATGGCAGCAGAGGCTTT-3' 5'-6FAM: CACAACCCGCTGCC - RTQ1-3' 5'-ROX: CCACAACCTCGCTGCC - BHQ2-3' | 59 | [11] |

Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики. Так как распределение изучаемых количественных показателей, оцененное с помощью критерия Шапиро–Уилки, не соответствует закону нормального распределения ($p < 0,05$), то для их описания применяли медиану Me и интерквартильный размах ($Q_{25}–Q_{75}$), а при сравнительном анализе применяли критерий Манна–Уитни [12].

Группу гетерозигот объединяли с той группой гомозигот, у которой отсутствовали отличия значений медиан и интерквартильных интервалов от гетерозиготных носителей или они были минимальные. При данном подходе к анализу материала мы, во-первых, увеличивая объем одной из сравниваемых групп, снижаем вероятность ошибки второго рода, т.е. ошибки, связанной с получением ложноотрицательных результатов (при небольшом объеме выборки). Во-вторых, изначально нивелируя проблему множественных сравнений, снижаем вероятность ошибки первого рода, т.е. ошибки, связанной с получением ложноположительных результатов.

Результаты и обсуждение

Было изучено влияние рассматриваемых генетических полиморфизмов цитокинов на уровень максимального систолического, диастолического, пульсового и среднего АД, которое регистрировалось при поступлении в стационар, а также на при-

вычный уровень АД у 145 пациентов с ГБ и метаболическим синдромом. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Установлены ассоциации генетических вариантов локуса $-308G/A$ фактора некроза опухоли α с показателями АД при поступлении в стационар у больных ГБ с метаболическим синдромом (табл. 2). Индивидуумы, имеющие генотипы $-308AA$ и $-308GA$ $TNF\alpha$, характеризуются более высокими показателями медиан систолического (180 мм рт. ст.), диастолического (105 мм рт. ст.), пульсового (75 мм рт. ст.) и среднего (129 мм рт. ст.) АД по сравнению с больными с генотипом $-308GG$ $TNF\alpha$ (медиана систолического АД – 170 мм рт. ст., $p = 0,004$, диастолического – 100 мм рт. ст., $p = 0,005$, пульсового – 70 мм рт. ст., $p = 0,013$ и среднего АД – 124,15 мм рт. ст., $p = 0,003$).

Также значимые ассоциации с уровнем АД при поступлении в стационар у больных ГБ, имеющих метаболический синдром, выявлены и для полиморфизма $+250A/G$ гена лимфотоксина α (табл. 2). Получено, что у пациентов с генотипами $+250GG$ и $+250AG$ Lta медиана систолического АД составила 190 мм рт. ст., диастолического – 110 мм рт. ст., пульсового – 80 мм рт. ст. и среднего АД – 133,5 мм рт. ст. и превышает аналогичные показатели индивидуумов с генотипом $+250AA$ Lta (САД – 165 мм рт. ст., $p = 0,000004$; ДАД – 100 мм рт. ст.; $p = 0,00006$; ПД – 60 мм рт. ст., $p = 0,000002$; АД ср. – 123 мм рт. ст.; $p = 0,00003$).

Таблица 2

Ассоциации генетических полиморфизмов генов факторов некроза опухолей с показателями АД у больных ГБ с метаболическим синдромом (Me ($Q_{25}–Q_{75}$))

| Локус | Показатель АД, мм рт. ст. | | Генотип | | p |
|-----------------------|---------------------------|----------------|------------------------|------------------------|----------|
| | | | AA + GA (37 человек) | GG (108 человек) | |
| $-308G/A$ $TNF\alpha$ | При поступлении | Систолическое | 180,00 (165,00–200,00) | 170,00 (157,50–190,00) | 0,004 |
| | | Диастолическое | 105,00 (100,00–110,00) | 100,00 (95,00–110,00) | 0,005 |
| | | Пульсовое | 75,00 (65,00–85,00) | 70,00 (60,00–80,00) | 0,013 |
| | | Среднее | 129,00 (122,00–142,00) | 124,15 (115,00–133,00) | 0,003 |
| | Привычное | Систолическое | 140,00 (130,00–140,00) | 140,00 (130,00–140,00) | 0,71 |
| | | Диастолическое | 90,00 (85,00–90) | 90,00 (80,00–90) | 0,93 |
| | | Пульсовое | 50,00 (45,00–50,00) | 50,00 (45,00–50,00) | 0,84 |
| | | Среднее | 106,60 (100,00–107,00) | 106,60 (97,00–107,00) | 0,60 |
| | | | GG + AG (68 человек) | AA (77 человек) | |
| $+250A/G$ Lta | При поступлении | Систолическое | 190,00 (165,00–202,50) | 165,00 (150,00–175,00) | 0,000004 |
| | | Диастолическое | 110,00 (100,00–112,00) | 100,00 (95,00–105,00) | 0,00006 |
| | | Пульсовое | 80,00 (65,00–90,00) | 60,00 (55,00–72,00) | 0,000002 |
| | | Среднее | 133,00 (122,00–141,00) | 123,00 (113,00–128,00) | 0,00003 |
| | Привычное | Систолическое | 140,00 (130,00–140,00) | 140,00 (130,00–140,00) | 0,20 |
| | | Диастолическое | 90,00 (80,00–90,00) | 90,00 (85,00–90,00) | 0,59 |
| | | Пульсовое | 50,00 (45,00–50,00) | 50,00 (45,00–50,00) | 0,29 |
| | | Среднее | 106,60 (97,00–107,00) | 106,60 (100,00–107,00) | 0,09 |
| | | | AA + AG (106 человек) | GG (39 человек) | |
| $+36A/G$ $TNFR1$ | При поступлении | Систолическое | 175,00 (160,00–195,00) | 165,00 (150,00–175,00) | 0,006 |
| | | Диастолическое | 105,00 (100,00–110,00) | 100,00 (90,00–105,00) | 0,012 |
| | | Пульсовое | 72,50 (60,00–85,00) | 65,00 (55,00–75,00) | 0,010 |
| | | Среднее | 128,00 (120,00–138,00) | 122,00 (113,00–128,00) | 0,007 |
| | Привычное | Систолическое | 140,00 (130,00–140,00) | 140,00 (130,00–140,00) | 0,19 |
| | | Диастолическое | 90,00 (80,00–90,00) | 90,00 (80,00–90,00) | 0,33 |
| | | Пульсовое | 50,00 (45,00–50,00) | 50,00 (40,00–50,00) | 0,19 |
| | | Среднее | 106,60 (97,00–107,00) | 106,60 (97,00–107,00) | 0,23 |
| | | | AA + AG (89 человек) | GG (56 человек) | |
| $+1663A/G$ $TNFR2$ | При поступлении | Систолическое | 175,00 (160,00–195,00) | 175,00 (160,00–192,50) | 0,88 |
| | | Диастолическое | 105,00 (100,00–110,00) | 100,00 (100,00–110,00) | 0,70 |
| | | Пульсовое | 70,00 (60,00–85,00) | 70,00 (60,00–80,00) | 0,85 |
| | | Среднее | 125,00 (120,00–138,00) | 125,00 (120,00–137,00) | 0,82 |
| | Привычное | Систолическое | 140,00 (130,00–140,00) | 140,00 (130,00–140,00) | 0,98 |
| | | Диастолическое | 90,00 (80,00–90,00) | 90,00 (80,00–90,00) | 0,83 |
| | | Пульсовое | 50,00 (45,00–50,00) | 50,00 (45,00–50,00) | 0,77 |
| | | Среднее | 106,60 (97,00–107,00) | 106,60 (97,00–107,00) | 0,95 |

Анализ связей полиморфизма +36A/G *TNFR1* с показателями АД у больных ГБ с метаболическим синдромом при поступлении в стационар (табл. 2) выявил, что у индивидуумов с генотипами +36AA и +36AG *TNFR1* уровень систолического (175 мм рт. ст.), диастолического (105 мм рт. ст.), пульсового (72,5 мм рт. ст.) и среднего (128 мм рт. ст.) АД достоверно превышает аналогичные показатели пациентов с генотипом +36GG *TNFR1* (САД – 165 мм рт. ст., $p = 0,006$; ДАД – 100 мм рт. ст.; $p = 0,012$; ПД – 65 мм рт. ст., $p = 0,010$; АД ср. – 122 мм рт. ст.; $p = 0,007$).

У индивидуумов с ГБ и метаболическим синдромом значимых ассоциаций генетических вариантов локуса +1663A/G *TNFR2* с показателями АД при поступлении установлено не было (табл. 2). Также генетические полиморфизмы –308G/A *TNFA*, +250A/G *Lta*, +36A/G *TNFR1* и +1663A/G *TNFR2* не связаны с уровнем привычного АД у пациентов с ГБ и метаболическим синдромом (табл. 2).

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено важное патогенетическое значение генетических полиморфизмов –308G/A *TNFA*, +250A/G *Lta* и +36A/G *TNFR1* в формировании уровня АД у больных ГБ с метаболическим синдромом. Молекулярно-генетические маркеры –308AA и –308GA *TNFA*, +250GG и +250AG *Lta*, +36AA и +36AG *TNFR1* ассоциированы с повышенными значениями систолического, диастолического, пульсового и среднего АД у индивидуумов с ГБ и метаболическим синдромом при поступлении в стационар.

Литература

1. *Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Рекомендации Российского медицинского общества по артериальной гипертензии и Всероссийского научного общества кардиологов // Кардиоваск. терапия и профилактика, прил. 2. 2008. Т. 7, № 6. С. 32.*
2. *Верткин А.Л., Зайратьянц О.В., Звягинцева Е.И. и др. Место метаболического синдрома в сердечно-сосудистом континууме // Лечащий врач. 2008. № 3. С. 70–74.*

3. *Остроумова О.Д., Зыкова А.А., Жижина С.А. и др. // Consilium medicum. 2008. Т. 10, № 5. С. 73–79.*
4. *Чазова И.Е., Жернакова Ю.В., Мычка В.Б. Место комбинированной терапии в лечении больных с метаболическим синдромом // Кардиоваскуляр. терапия и профилактика. 2010. № 4. С. 104–106.*
5. *Елисеев М.С. Роль фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) в развитии обменных нарушений и атеросклероза и влияние на них ингибиторов ФНО- α у больных ревматическими заболеваниями // Научно-практическая ревматология. 2009. № 2. С. 67–72.*
6. *Karunakaran I., Jayagopi S., Viswanathan M. High Sensitivity C-Reactive Protein, Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-6, and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Levels in Asian Indians with Metabolic Syndrome and Insulin Resistance (CURES-105) // Journal of Diabetes Science and Technology. 2011. V. 5 (4). P. 982–988.*
7. *Yan-yan Li. Tumor Necrosis Factor-Alpha G308 α Gene Polymorphism and Essential Hypertension: A Meta-Analysis Involving 2244 Participants // PLoS One. 2012. V. 7 (4). P. 792–805.*
8. *Hulkkonen J. Inflammatory Cytokines and Cytokine Gene Polymorphisms in Chronic Lymphocytic Leukaemia, in Primary Sjögren's Syndrome and Healthy Subjects // Tampere. 2012. P. 81–86.*
9. *Mirjam M. de Jong, Ilja M. Nolte, Elisabeth G. E. de Vries1 et al. The HLA class III subregion is responsible for an increased breast cancer risk // Hum. Mol. Genet. First published online 22 Jul 2013. 2013. P. 13–16.*
10. *Soo Jin Chae, Hoon Kim, Byung Chul Jee, Chang Suk Suh, Seok Hyun Kim, Jung Gu Kim. Tumor Necrosis Factor (TNF) – TNF Receptor Gene Polymorphisms and Their Serum Levels in Korean Women with Endometriosis // Am. J. Reprod. Immunol. 2008. P. 434–449.*
11. *Lynnette R. Ferguson, Dug Yeo Han, Claudia Huebner et al. Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1B Haplotypes Increase or Decrease the Risk of Inflammatory Bowel Diseases in a New Zealand Caucasian Population // Hindawi Publishing Corporation Gastroenterology Research and Practice. 2009. P. 3–10.*
12. *Рябова О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. М.: Медиа Сфера, 2006.*

СОВРЕМЕННАЯ ЕВГЕНИКА И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ РИСКИ РЕПРОДУКТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

И.Н. Лебедев

НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

Введение

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) – относительно молодая и стремительно развивающаяся область репродуктивной медицины, основной целью которой является преодоление бесплодия и рождение здорового ребенка. Последнее часто достигается с помощью современных молекулярно-генетических технологий анализа эмбрионов на самых ранних этапах развития, позволяющих проводить отбор тех зародышей, которые несут те или иные наследственные дефекты – числовые или структурные нарушения хромосом, мутации в отдельных генах, и исключать их перенос в организм будущей матери. Такой подход обеспечивает очевидные преимущества комбинации ВРТ и преимплантационной генетической диагностики (ПГД) в плане профилактики наследственных заболеваний перед традиционно используемыми и широко распространенными технологиями пренатальной диа-

гностики. Эти преимущества заключаются как в позитивном разрешении многих медицинских, этических и психологических вопросов, связанных с принятием решения о необходимости прерывания уже наступившей беременности в случае обнаружения наследственного дефекта у плода, так и в уникальной возможности элиминации наследственных мутаций из родословной при тестировании эмбрионов или даже ооцитов, если носителем мутации является мать.

На сегодняшний день уже не вызывают удивления сообщения о преимплантационной генетической диагностике наследственных форм онкологических заболеваний, неврологических и психиатрических расстройств, некоторых болезней с поздним проявлением. Удивительно то, что фактически ПГД вышла далеко за пределы изначальных задач ВРТ (преодоление бесплодия), предлагая возможности для исключения передачи потомству наследственных заболеваний, не связанных собственно с нару-

шениями репродукции у родителей. Иными словами, супружеские пары, которые не испытывают репродуктивных проблем, но имеют высокий риск рождения больного ребенка вследствие наличия тех или иных мутаций в своей родословной, получают возможность сделать осознанный выбор в пользу ВРТ и ПГД. Вполне очевидно, что такой выбор может трактоваться, по мнению некоторых авторов, как современный вариант негативной евгеники [1]. Однако евгеническая проблема ВРТ оказывается гораздо шире, чем это может показаться на первый взгляд. И эта проблема связана прежде всего с генетическими последствиями искусственного преодоления бесплодия в супружеских парах, делающих выбор в пользу ВРТ. Учитывая многофакторную природу бесплодия, было бы неуместно говорить о возможности накопления в популяции каких-то генетических вариантов, ассоциированных с нарушениями репродукции, вследствие применения ВРТ. Более того, процент беременностей, наступивших с помощью ВРТ (1–3%), все же остается небольшим даже в большинстве индустриально развитых стран. Однако именно проблема здоровья детей, родившихся с использованием репродуктивных технологий, заставила обратить внимание еще на один немаловажный фактор, влияющий на формирование нормальных и патологических признаков – на эпигенетические изменения.

Эпигенетические болезни у потомства как побочный результат ВРТ?

Первое сообщение о возможности ассоциации ВРТ с риском эпигенетических нарушений было сделано в 2002 г., когда впервые были описаны две девочки с синдромом Энгельмана, родившиеся после применения искусственного оплодотворения [2]. Данный синдром относится к классическим болезням геномного импринтинга, связанным с нарушениями моноаллельного характера экспрессии импринтированных генов в зависимости от их родительского происхождения. Подавляющее большинство случаев заболевания (до 70%) вызывается делециями в регионе 15q11–q13 на материнской хромосоме, затрагивающими импринтированный ген *UBE3A*, экспрессия которого возможна только с хромосомы материнского происхождения. Еще одним вариантом мутаций является однородительское наследование двух копий хромосомы 15 от отца, также приводящее к невозможности экспрессии гена. Некоторая часть случаев заболевания связана с точковыми мутациями в самом гене. Стоит отметить, что все эти мутации по своей природе не являются эпигенетическими нарушениями. И только лишь менее 1% случаев синдрома обусловлено собственно эпигенетическими изменениями, а именно нарушениями характера метилирования регуляторного центра импринтинга *SNURF-SNRPN* на хромосоме 15 материнского происхождения, делающими невозможными экспрессию гена с этого гомолога. Примечательно, что именно данное редкое эпигенетическое нарушение явилось причиной развития заболевания у обеих упомянутых девочек.

Позднее, в 2003 г., был описан еще один случай рождения ребенка с синдромом Энгельмана после применения искусственного оплодотворения [3]. И здесь причиной заболевания опять явились те же

самые редкие эпигенетические дефекты, связанные с нарушениями метилирования регуляторной последовательности центра импринтинга на хромосоме материнского происхождения. Если принять во внимание популяционную частоту синдрома Энгельмана и частоту эпигенетических дефектов при данном заболевании, то вероятность обнаружения трех детей с эпимутациями центра импринтинга должна составить 3 : 900 000. Учитывая, что к 2003 г. в мире было рождено около 1 млн детей с использованием ВРТ, наблюдаемые случаи вполне соответствуют ожидаемым расчетным цифрам [4]. Тем не менее факты рождения детей с редким наследственным заболеванием, обусловленным исключительно эпигенетическими нарушениями, индуцировал новое направление исследований в области анализа здоровья потомства, рожденного с использованием методов искусственного оплодотворения [4–7]. И внимание было обращено в первую очередь на другие болезни геномного импринтинга – синдромы Видеманна–Беквита, Рассела–Сильвера, Прадера–Вилли.

Наибольший массив данных удалось собрать по синдрому Видеманна–Беквита, по всей видимости, как самому распространенному из всех болезней геномного импринтинга. Основным источником информации стал ретроспективный анализ ряда национальных регистров с особым вниманием к тому, родились ли дети с синдромом Видеманна–Беквита естественным путем или с применением искусственного оплодотворения. Оказалось, что первые случаи рождения детей с таким заболеванием были датированы еще 1995 г. и были связаны с криоконсервацией эмбрионов [8]. На 2007 г. была собрана информация о 40 пациентах с синдромом Видеманна–Беквита, рожденных в результате применения ВРТ [9]. Относительный риск рождения больного ребенка после применения искусственного оплодотворения по сравнению с естественным зачатием варьировал от 3,12 до 17,8, составляя в среднем 5,14. К 2014 г. проведено уже восемь эпидемиологических исследований, результаты которых подтвердили полученные ранее оценки – относительный риск рождения ребенка с синдромом Видеманна–Беквита при использовании ВРТ по сравнению с естественным зачатием составил в среднем 5,2 (95%-й CI 1,6–7,4) [10].

Однако еще большего внимания здесь также заслуживает анализ мутаций, приводящих к данному заболеванию при использовании ВРТ. Как и в случае с синдромом Энгельмана, основной причиной заболевания, по крайней мере, у тех пациентов, для которых была проведена молекулярно-генетическая диагностика, явилось гипометилирование регуляторного центра импринтинга на хромосоме 11 материнского происхождения. Следует заметить, что в отличие от синдрома Энгельмана гипометилирование центра импринтинга *KCNQ1OT1* на материнском гомологе является самым распространенным (до 50% случаев заболевания) типом мутаций, а точнее, эпимутаций, приводящих к синдрому Видеманна–Беквита. Тем не менее показательным истораживающим моментом явился тот факт, что оба заболевания у детей, родившихся после искусственного оплодотворения, развивались вследствие дефектов метилирования импринтированных генов на хромосомах исключительно материнского происхождения.

Вероятные причины эпигенетических дефектов при использовании ВРТ

Этим наблюдениям достаточно быстро нашлось, как казалось, вполне рациональное объяснение. Дело в том, что получение ооцитов для искусственного оплодотворения требует проведения гормональной гиперстимуляции. Полученные таким образом яйцеклетки являются незрелыми в эпигенетическом отношении – они находятся в той стадии эпигенетического репрограммирования, когда их геном деметилирован и установления дифференциального метилирования импринтированных генов еще не произошло. Этот процесс протекает перед самым завершением созревания яйцеклетки. Таким образом, одна из ключевых стадий в установлении геномного импринтинга в женских половых клетках при использовании искусственного оплодотворения также «переносится» в искусственные условия. Это сразу ставит вопрос, насколько среды, используемые для культивирования гамет и эмбрионов, способны обеспечить протекание важнейших эпигенетических реакций. Следует сказать, что результаты многих исследований на модельных животных с использованием различных сред и сывороток в целом подтвердили гипотезу о возможности модификации эпигенетического статуса импринтированных генов условиями культивирования клеток [11, 12]. Однако оставался неизученным вопрос о распространенности таких дефектов метилирования в естественных репродуктивных циклах, не связанных с применением методов культивирования гамет и эмбрионов.

В 2008 г. авторами впервые было показано, что гипометилирование центра импринтинга *KCNQ1OT1* на хромосоме 11 материнского происхождения встречается с частотой 9,5% среди спонтанных абортусов от женщин, беременность у которых наступила естественным путем и никак не была связана с применением методов искусственного оплодотворения [13]. Это точно такая же эпимутация, которая была обнаружена у всех пациентов с синдромом Видеманна–Беквита, родившихся после применения ВРТ, и для которых была проведена молекулярно-генетическая диагностика причин заболевания. Позднее гипометилирование другого импринтированного гена *PLAGL1* на хромосоме 6 также материнского происхождения было выявлено у 10,5% спонтанных абортусов [14]. При этом оказалось примечательно, что частота привычного невынашивания беременности (три и более потерь беременности) была статистически значимо выше среди женщин, имевших спонтанный аборт с гипометилированием гена *PLAGL1*, по сравнению с женщинами, имевших спонтанный аборт с нормальным эпигенетическим статусом импринтированного гена (33 и 8% соответственно; $p < 0,05$). Важно подчеркнуть, что и в том и в другом случае ВРТ не использовались, а значит, эпимутации возникали в естественных репродуктивных циклах. Но тем не менее они также затрагивали хромосомы материнского происхождения. Позднее нарушения экспрессии и эпимутации импринтированных генов у спонтанных абортусов были найдены и в других исследованиях [15–19]. Причем они также обнаруживались как у выкидышей после естественного зачатия, так и у спонтанных абортусов после применения искусственного оплодотворения. Эти находки

позволили обосновать альтернативную точку зрения. Возможно, природа эпигенетических дефектов у потомства, рожденного с помощью ВРТ, является вовсе не результатом использования технологий, а связана каким-то образом с нарушениями репродукции у самих родителей. И этот вывод возвращает к евгеническим опасениям, связанным с возможным накоплением в популяции каких-либо наследственных дефектов, ассоциированных с репродуктивными проблемами [1].

Любопытно, что к такому же заключению приходят авторы исследований, изучавших распространенность пороков развития у детей, рожденных после применения ВРТ [10]. Оказывается, что по результатам ряда наблюдений частота врожденных пороков развития действительно оказывается несколько повышенной среди детей, рожденных после применения искусственного оплодотворения, по сравнению с естественным зачатием. Но если сопоставить частоты пороков развития среди новорожденных от бесплодных пар, выбравших ВРТ, и от супружеских пар, родивших после длительного лечения бесплодия без применения искусственного оплодотворения, то эти показатели фактически оказываются одинаковыми. Иными словами, не технология, а собственно природа бесплодия может предопределять повышенный риск рождения детей с врожденными пороками развития или эпигенетическими заболеваниями у супружеских пар с бесплодием.

Возвращаясь к болезням геномного импринтинга, следует отметить, что за последние годы появились сообщения о рождении детей с другими заболеваниями – синдромами Рассела–Сильвера [20], Прадера–Вилли [21], после применения методов ВРТ. Постоянное внимание к этой проблеме, анализ причин спонтанных абортусов после искусственного оплодотворения, а также методологическая революция в изучении характера метилирования импринтированных генов вследствие применения микрочиповых технологий [22, 23] дополнили, а по существу заставили пересмотреть сформулированное ранее положение о том, что эпимутации импринтированных генов у потомства (или спонтанных абортусов) после применения ВРТ связаны исключительно с нарушением метилирования на хромосомах материнского происхождения. Как оказалось, спектр эпимутаций является намного более широким. Эпимутации затрагивают точно также хромосомы, наследованные от отца. Эпимутации могут быть представлены не только гипо-, но и гиперметилированием импринтированных генов. Нарушения метилирования могут иметь герминативное и соматическое происхождение. Более того, неожиданным открытием явилось то, что у некоторых пациентов с классическими заболеваниями импринтинга наряду с эпимутациями в тех генах, которые отвечают за развитие конкретного синдрома, обнаруживаются нарушения метилирования и в ряде других генов, не имеющих очевидного прямого отношения к этому заболеванию [24, 25].

Генетический контроль эпигенетических модификаций генома в онтогенезе

Феномен множественных дефектов метилирования (multiple methylation defects) заставил в некоторой степени пересмотреть или, точнее, расширить представления об эпигенетической природе болез-

ней геномного импринтинга. История этого пересмотра началась с накопления уникальных находок о так называемом биродительском полном пузырном заносе [26]. Классический полный пузырный занос имеет андрогенетическую природу и развивается, когда в зиготе диплоидный хромосомный набор представлен двумя гаплоидными наборами отцовского происхождения. При биродительском пузырном заносе, как следует из названия, фенотип формируется при наличии в зиготе генов обоих родителей. Как оказалось, такая картина развивается вследствие наличия у матери мутаций в гене *NLRP7* (*NALP7*), который, как полагают, может быть вовлечен в установление импринтинга в женских половых генах [27]. Мутации гена приводят к невозможности записи дифференциального метилирования в ооцитах, что делает их геном в эпигенетическом отношении похожим на отцовский. Это и приводит в конечном итоге к формированию картины полного пузырного заноса при нормальном биродительском кариотипе зиготы.

Интересно, что продукт гена *NLRP7* не имеет в своем составе никаких известных ДНК-связывающих мотивов, и поэтому пока остается неясным, каким образом он может быть вовлечен в установление импринтинга в оогенезе. В связи с этим привлекает внимание альтернативная гипотеза, согласно которой вовлечение белка *NLRP7* в формирование пузырного заноса может быть связано с его участием в воспалении и аутоиммунном ответе. Так, было показано, что пациенты с мутациями в *NLRP7* не в состоянии установить соответствующую воспалительную реакцию на различные антигены [28]. Следовательно, у таких женщин андрогенетические бластоцисты, которые являются полными аллотрансплантатами, могут имплантироваться и развиваться, не отторгаясь. Возможно, что андрогенетические бластоцисты образуются спонтанно *de novo* с некоторой частотой. Тем не менее у женщин с активной иммунной системой андрогенетические эмбрионы, скорее всего, погибают или останавливаются в развитии. Однако эта гипотеза не объясняет происхождения биродительского полного пузырного заноса.

Тем не менее после обнаружения гена *NLRP7* был открыт целый новый класс генов (*NLRP2*, *KHDC3L*, *ZFP57*), мутации в которых оказались ассоциированными с возникновением аномалий дифференциального метилирования импринтированных генов, в том числе и с появлением множественных эпимутаций. Это и позволило пересмотреть эпигенетическую природу геномного импринтинга. Оказалось парадоксальным, что заболевания с нетрадиционным типом наследования могут фактически быть обусловленными обычными точковыми мутациями в неимпринтированных генах, контролирующими процессы локус-специфического метилирования ДНК. По всей видимости, не случайно, что уже сейчас в интернет-версии Каталога наследственных болезней человека под редакцией В. Мак-Кьюсика одна из форм классической болезни геномного импринтинга – транзиторийный неонатальный сахарный диабет (MIM 601410) – обозначена как результат мутаций в неимпринтированном гене *ZFP57* [29].

Заключение

Возвращаясь к эпигенетическим проблемам репродуктивных технологий, следует сказать, что на

сегодняшний день в литературе отсутствуют сообщения об обнаружении носительства мутаций в генах «контроля» импринтинга в супружеских парах, имеющих детей с болезнями геномного импринтинга либо выкидыши с эпигенетическими нарушениями после применения искусственного оплодотворения. Тем не менее сообщения о множественных эпимутациях, за которыми может стоять носительство подобных мутаций, уже не редки. А раз так, то остается пока еще совсем не оцененный риск неконтролируемой передачи потомству наследственных мутаций, влияющих, с одной стороны, на эпигенетический профиль его генома, а с другой стороны, на его репродуктивные способности. ВРТ – сравнительно молодая область репродуктивной медицины и пока еще рано ожидать эпидемиологических исследований о репродуктивном потенциале потомства, рожденного с помощью искусственного оплодотворения. Хотя исследования на модельных животных и не поддерживают данные опасения, а рассуждения о возможности трансгенерационного наследования эпигенетических изменений остаются дискуссионными, всестороннее изучение эпигенетических аспектов репродукции человека призвано обеспечить безопасное в генетическом отношении использование технологий современной репродуктивной медицины.

Литература

1. *Macintosh K.L.* Brave New Eugenics: Regulating assisted reproductive technologies in the name of better babies. University of Illinois: J.L. Tech & Pol'y. 2010 (available at: <http://digitalcommons.law.scu.edu/facpubs/42>).
2. *Cox G.F., Bürger J., Lip V. et al.* Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. V. 71. P. 162–164.
3. *Örstavik K.H., Eiklid K., van der Hagen C.B. et al.* Another case of imprinting defects in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. V. 72. P. 218–219.
4. *Maher E.R.* Imprinting and assisted reproductive technology // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. Review issue 1. R133–R138.
5. *Maher E.R., Afnan M., Barratt C.L.* Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: Epigenetics, Imprinting, ART and Icebergs? // *Hum. Reprod.* 2003. V. 18. P. 2508–2511.
6. *Niemitz E.L., Feinberg A.* Epigenetics and assisted reproductive technology: A call for investigation // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 74. P. 599–609.
7. *Horsthemke B., Ludwig M.* Assisted reproduction: The epigenetic perspective // *Hum. Reprod. Upd.* 2005. V. 11. P. 473–482.
8. *Sutcliffe A.G., D'Souza S.W., Cadman J. et al.* Outcome in children from cryopreserved embryos // *Arch. Dis. Child.* 1995. V. 72. P. 290–293.
9. *Лебедев И.Н., Пузырёв В.П.* Эпигенетические аспекты безопасности вспомогательных репродуктивных технологий // *Генетика.* 2007. Т. 43, № 9. С. 1157–1171.
10. *ESHRE Capri Workshop Group.* Birth defects and congenital health risks in children conceived through assisted reproduction technology (ART): a meeting report // *J. Assist. Reprod. Genet.* doi 10.1007/s10815-014-0255-7. Published online: 29 May 2014.
11. *Khosla S., Dean W., Reik W., Feil R.* Epigenetic and experimental modifications in early mammalian development: Part II. Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype // *Hum. Reprod. Upd.* 2001. V. 7. P. 419–427.
12. *Young L.E., Fernandes K., McEvoy T.G. et al.* Epigenetic changes in *Igf2r* is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture // *Nat. Genet.* 2001. V. 27. P. 153–154.

13. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Эпимутации центра импринтинга *KCNQ1OT1* хромосомы 11 при ранней эмбриональной гибели у человека // Генетика. 2008. Т. 44, № 12. С. 1609–1616.
14. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Эпимутации импринтированного гена *PLAGL1* при привычном невынашивании беременности // Медицинская генетика. 2010. Т. 9, № 11. С. 34–39.
15. *Diplas A.I., Lambertini L., Lee M.J. et al.* Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas // Epigenetics. 2009. V. 4, № 4. P. 235–240.
16. *Dória S., Sousa M., Fernandes S. et al.* Gene expression pattern of *IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* and *CDKN1C* imprinted genes in spontaneous miscarriages or fetal deaths // Epigenetics. 2010. V. 5, № 5. P. 444–450.
17. *Pliushch G., Schneider E., Weise D. et al.* Extreme methylation values of imprinted genes in human abortions and stillbirths // Am. J. Pathol. 2010. V. 176, № 3. P. 1084–1090.
18. *Zechner U., Pliushch G., Schneider E. et al.* Quantitative methylation analysis of developmentally important genes in human pregnancy losses after ART and spontaneous conception // Mol. Hum. Reprod. 2010. V. 16, № 9. P. 704–713.
19. *Zheng H.Y., Tang Y., Niu J. et al.* Aberrant DNA methylation of imprinted loci in human spontaneous abortions after assisted reproduction techniques and natural conception // Hum. Reprod. 2013. V. 28, № 1. P. 265–273.
20. *Kagami M., Nagai T., Fukami M. et al.* Silver-Russell syndrome in a girl born after *in vitro* fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of *PEG1/MEST* // J. Assist. Reprod. Genet. 2007. V. 24. P. 131–136.
21. *Gold J.A., Ruth C., Osann K. et al.* Frequency of Prader-Willi syndrome in births conceived via assisted reproductive technologies // Genet. in Medicine. 2014. V. 16. P. 164–169.
22. Саженова Е.А., Скрябин Н.А., Суханова Н.Н., Лебедев И.Н. Мультилокусные эпимутации импринтома при патологии эмбрионального развития человека // Молекулярная биология. 2012. Т. 46, № 2. С. 204–213.
23. *Court F., Martin-Trujillo A., Romanelli V. et al.* Genome-wide allelic methylation analysis reveals disease-specific susceptibility to multiple methylation defects in imprinting syndromes // Hum. Mutat. 2013. V. 34, № 4. P. 595–602.
24. *Eggermann T., Leisten I., Binder G. et al.* Disturbed methylation at multiple imprinting loci: an increasing observation in imprinting disorders // Epigenomics. 2011. V. 3, № 5. P. 625–637.
25. Лепшин М.В., Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Множественные эпимутации импринтированных генов в геноме человека и наследственная патология // Генетика. 2014. Т. 50, № 3. С. 253–272.
26. *Van den Veyver I.B., Al-Hussaini T.K.* Biparental hydatidiform moles: a maternal effect mutation affecting imprinting in the offspring // Hum. Reprod. Upd. 2006. V. 12. P. 233–242.
27. *Murdoch S., Djuric U., Mazhar B. et al.* Mutations in *NALP7* cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans // Nat. Genet. 2006. V. 38. P. 300–302.
28. *Deveault C., Qian J.H., Chebaro W.A. et al.* *NLRP7* mutations in women with diploid androgenetic and triploid moles: a proposed mechanism for mole formation // Hum. Mol. Genet. 2009. V. 18, № 5. P. 888–897.
29. <http://omim.org>.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И АТЕРОСКЛЕРОЗ

А.В. Марков^{1, 2}, М.С. Назаренко^{1, 2, 3}

¹ НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

³ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Метилирование ДНК является наиболее изученным эпигенетическим механизмом и представляет собой ферментативный процесс ковалентного присоединения метильных групп к остаткам цитозина, входящих в состав CpG-динуклеотидов (CpG-сайтов). Регионы генома протяженностью не менее 200 пар нуклеотидов с высокой плотностью CpG-сайтов (более 60%) называются CpG-островками. Недавно было показано, что существуют регионы, окружающие CpG-островки (CpG-берега) [1]. Они характеризуются значительной межтканевой вариабельностью метилирования CpG-сайтов.

Перенос метильных групп к 5'-позиции цитозина катализируется ферментами ДНК-метилтрансферазами (DNMTs). Ферменты DNMT3a и DNMT3b устанавливают паттерн метилирования ДНК *de novo*, а DNMT1 поддерживает уровень метилирования при делении клеток. Механизмы, ответственные за удаление метильных групп, изучены недостаточно. Предполагают, что данный процесс происходит как активно, так и пассивно.

В геноме соматических клеток метилированы около 70–90% CpG-сайтов. Плотность метилирования различных участков ДНК варьирует (рис. 1). В частности, CpG-островки, расположенные в промоторных регионах генов, и CpG-берега обычно находятся в неметилированном состоянии, позволяя осуществлять транскрипцию. Метилирование CpG-сайтов,

которые группируются в промоторах генов, и CpG-берегах связано с репрессией их функциональной активности. При метилировании ДНК в экзонах и интронах ген активно функционирует, а их деметилирование приводит к активации транскрипции в нескольких регионах одновременно. Существенная доля CpG-сайтов локализована в межгенных, повторяющихся последовательностях ДНК, таких как ретротранспозоны (элементы LINE и Alu). В данных областях CpG-сайты обычно метилированы, обеспечивая транскрипционную репрессию мобильных элементов и стабильность генома.

Метилирование ДНК является митотически стабильным и передается при делении клеток, в том числе для некоторых локусов, идентифицированных у экспериментальных животных, трансгенерационно. Данная эпигенетическая модификация играет важную роль в эмбриональном развитии, дифференцировке клеточных линий, инактивации X-хромосомы, геномном импринтинге и т.д. Хорошо известно, что aberrantный статус метилирования цитозиновых остатков ДНК является частым феноменом, регистрируемым в тканях злокачественных новообразований различной локализации [2]. Некоторые локусы генома обладают свойством сохранять относительно стабильный уровень метилирования ДНК на протяжении достаточно продолжительного времени наблюдения, и, более того, их уровень метилирования коррелирует с наличием ряда клинических при-

знаков, значимых для развития многофакторной патологии, в частности ожирения [3].

Гипотеза о связи метилирования ДНК и атеросклероза впервые высказана Р.Е. Newman в 1999 г. Автор основывался на том, что дефицит фолатов, витаминов В₆ и В₁₂ вызывает атеросклероз. Учитывая важную роль данных веществ в генерации S-аденозилметионина (SAM) – донора метильных групп для реакций метилирования, гипометилирование ДНК

может быть механизмом, связывающим дефицит витаминов и сердечно-сосудистые заболевания. В настоящее время активно обсуждается вопрос участия гипергомоцистеинемии, гиперлипидемии, воспалительных агентов и гипоксии в индукции изменений уровня метилирования ДНК при атеросклерозе [4].

Экспериментальные исследования, связанные с изучением вариабельности метилирования ДНК при атеросклерозе *in vivo*, немногочисленны (рис. 2).

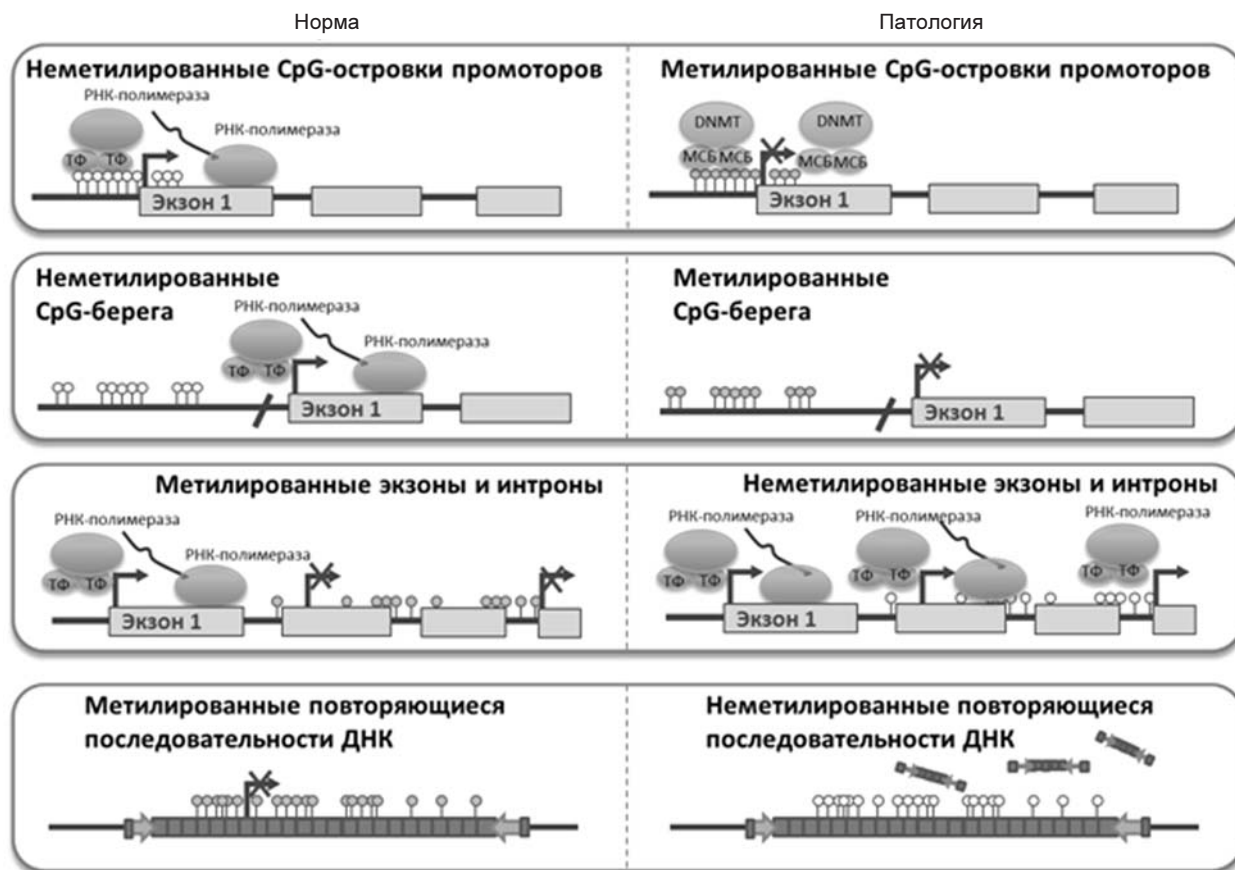


Рис. 1. Функциональные последствия метилирования ДНК: ТФ – транскрипционный фактор; МСБ – метилсвязывающий белок; DNMT – ДНК-метилтрансфераза

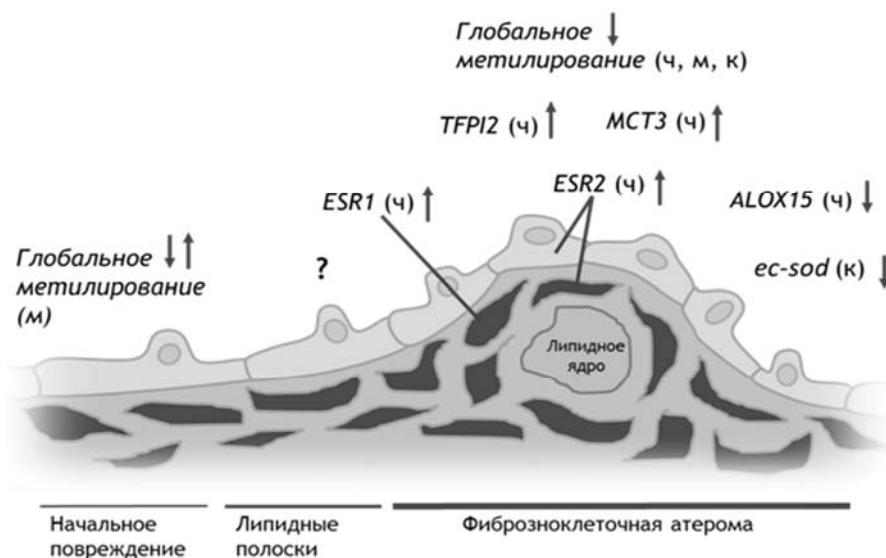


Рис. 2. Изменения метилирования ДНК в сосудистой стенке при развитии атеросклероза у модельных животных и человека: стрелки вверх и вниз указывают гипер- и гипометилирование соответственно; ч – человек; м – мышь; к – кролик. Сосудистая стенка состоит из верхнего монослоя эндотелиальных клеток и подлежащего слоя гладкомышечных клеток

Начальные стадии атерогенеза ассоциированы с перераспределением паттерна метилирования ДНК. В частности, относительно умеренная степень геномного гипометилирования сосуществовала с гиперметилированием ДНК в аорте перед появлением гистологически выявляемых бляшек у молодых мышей с гиперлипидемией, обусловленной нокаутом гена *ApoE*-/- [5]. Дефицит фермента 5,10-метилентетрагидрофолат редуктазы (*MTHFR*), который генерирует метильные группы, связан с геномным гипометилированием и формированием «липидных полосок» в аорте у мыши [6].

На поздних стадиях патологического процесса выявлено существенное глобальное гипометилирование ДНК, степень которого достигает значений, характерных для некоторых типов злокачественных новообразований. В том числе гипометилирование ДНК зарегистрировано в атеросклеротических бляшках человека и модельных животных, включая кроликов и мышей с нокаутом гена *ApoE*-/- [7, 8]. Значительное гипометилирование CpG-динуклеотидов, локализованных в кодирующей последовательности гена внеклеточной супероксид дисмутазы (*Ec-sod*), обнаружено в атеросклеротических бляшках аорты кролика по сравнению с неизменной тканью сосуда [9].

Исследования, посвященные характеристике вариабельности метилирования ДНК при атеросклерозе у человека *in vivo*, единичны. Как правило, при обследовании используется относительно легкодоступный биологический материал – лейкоциты периферической крови. Результаты данных работ противоречивы. Например, глобальное гиперметилирование ДНК выявлено при атеросклерозе коронарных артерий, в том числе и при гипергомоцистеинемии [10]. В другом исследовании гипометилирование элемента LINE-1 было связано с увеличением риска развития и неблагоприятным исходом от ишемической болезни сердца и инсульта [11].

Ткани сосудистой стенки, как пораженные патологическим процессом, так и здоровые, анализировались лишь в нескольких исследованиях, а статус метилирования ДНК оценивался для небольшого количества генов-кандидатов (рис. 3). Это гены 15-липоксигеназы (*ALOX15*), рецепторов эстрогена α и β (*ESR1* и *ESR2*), транспортера 3 монокарбонилата (*MCT3*) и ингибитора 2 пути активации тканевого фактора (*TFPI2*) [8, 11–14]. В частности, в гене *ALOX15* обнаружено гипометилирование CpG-динуклеотидов в тканях атеросклеротических бляшек на поздних стадиях заболевания. Напротив, высокий уровень метилирования ДНК регистрировался в генах *ESR1*, *ESR2*, *MCT3* и *TFPI2* в атеросклеротических бляшках артерий различной локализации по сравнению с непораженными сосудами. Причем гиперметилирование гена *ESR1* приводило к изменению фенотипа гладкомышечных клеток с «сократительного» на «секреторный».

Современные микрочиповые технологии позволяют проводить скрининг уровня метилирования отдельных CpG-сайтов широкого спектра генов одновременно в нескольких образцах. Существует лишь несколько работ, в которых применялся данный методический подход, в отношении исследования тканей сосудистой стенки при атеросклерозе у человека.

Castillo-Diaz и соавт. (2010) выполнили анализ статуса метилирования 10 367 CpG-островков в тка-

нях коронарных артерий больных с выраженным атеросклерозом (45 человек) и в контрольных образцах аорты, взятых у здоровых лиц (16 человек). Возраст индивидов составил 22–79 лет, соотношение полов было 0,5. Исследование проводилось с помощью микрочипа, содержащего 14 923 клон CpG-островков с наборами HCG18.1K и 6.8K (UHN Microarray Centre, Канада). В тканях коронарных артерий больных с выраженным атеросклерозом выявлено деметилирование некоторых CpG-островков по сравнению с контрольными образцами аорты, взятыми у здоровых лиц. Основные функциональные категории продуктов генов, связанных с дифференциально метилированными CpG-островками, представлены транскрипционными и сигнальными факторами, в том числе генами семейства *HOX*, *PROM1*, *NOTCH1* и *FOXP1* [15].

В другой работе был проведен сравнительный анализ уровня метилирования 1 505 CpG-сайтов 807 генов в тканях из области атеросклеротических бляшек аорты и сонной артерии с использованием микрочипа на платформе GoldenGate Methylation Cancer Panel I (Illumina, США). Биоптаты тканей получены в результате оперативных вмешательств у двух русских мужчин, больных выраженным атеросклерозом. В результате установлено дифференциальное метилирование 103 CpG-сайтов 90 генов, белковые продукты которых участвуют в различных биологических процессах [16].

При сравнении образцов тканей из сонной (область атеросклеротических бляшек и подлежащей макрокопической неизменной стенки) и внутренней грудной артерий, а также большой подкожной вены нижней конечности девяти мужчин, больных атеросклерозом, с использованием микрочипа Infinium HumanMethylation27 BeadChip (Illumina, США) установлено дифференциальное метилирование 314 CpG-сайтов 286 генов. Наиболее существенные изменения уровня метилирования зарегистрированы в отношении CpG-динуклеотидов гомеобоксных генов *HOXA2* и *HOXD4*, а также импринтированного гена *MEST*. В частности, в тканях из области атеросклеротических бляшек сонных артерий отмечалось гипометилирование данных генов по сравнению с внутренней грудной артерией, а также большой подкожной веной нижней конечности [17]. Особый интерес представляет тот факт, что *MEST* относится к группе импринтированных генов, которые чаще по сравнению с другими локусами генома подвержены нарушениям, что приводит к существенным последствиям, поскольку они экспрессируются только с одного из родительских аллелей.

Эпигенетическая изменчивость генов, вовлеченных в процессы развития, возможно, не только обеспечивает наилучшую адаптацию организмов к изменяющимся условиям среды [3], но и обуславливает подверженность к многофакторным заболеваниям. Гомеобоксодержащие гены *HOX* также представляют интерес, так как они являются ключевыми регуляторами клеточной и тканевой принадлежности при процессах морфогенеза и ремоделирования сосудистого русла. При сравнении участков артериального русла, подверженных и устойчивых к атерогенезу, была обнаружена дифференциальная экспрессия генов кластеров *HOXA* (4, 5, 7, 10, 11), *HOXB* (5, 6, 7, 13) и *HOXD10* [18], которая соотносилась с различиями в паттерне их метилирования.

Ранее было показано, что гены группы *HOX-3*, а также *HOXA9* и *HOXB5* регулируют пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, а гены *HOXA5* и *HOXD10*, наоборот, поддерживают «покоящийся фенотип» эндотелия. Для гена *HOXA5* была доказана связь между его метилированием и экспрессией *in vivo* в условиях нарушенного кровотока [19]. Более детальное исследование статуса метилирования группы гомеобоксодержащих и импринтированных генов при атеросклерозе позволит получить ценную информацию о механизмах формирования патологического процесса, а также их регионарной специфичности.

Таким образом, исследование тканей сосудистой стенки человека и модельных животных дает основание предположить, что на ранних и поздних стадиях патологического процесса в области атеросклеротических бляшек регистрируется изменение паттерна метилирования ДНК. Уровень метилирования ДНК коррелирует с изменением транскрипционной активности генов, белковые продукты которых выполняют различные функции (пролиферация гладкомышечных клеток, ремоделирование внеклеточного матрикса, реакции окислительно-восстановительного стресса и т.д.). В итоге фенотип клеток обретает свойства, обуславливающие подверженность к развитию атеросклеротического процесса.

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ (соглашение № 14.120.14.5096-НШ).

Литература

1. Irizarry R.A., Ladd-Acosta C., Wen B. et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores // *Nat. Genet.* 2009. V. 41, № 2. P. 178–186.
2. Ballestar E., Esteller M. Epigenetic gene regulation in cancer // *Adv. Genet.* 2008. V. 61. P. 247–267.
3. Feinberg A.P. Genome-scale approaches to the epigenetics of common human disease // *Virchows Arch.* 2010. V. 456, № 1. P. 13–21.
4. Newman P.E. Can reduced folic acid and vitamin B12 levels cause deficient DNA methylation producing mutations which initiate atherosclerosis? // *Med. Hypotheses.* 1999. V. 53, № 5. P. 421–424.
5. Lund G., Andersson L., Lauria M. et al. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279, № 28. P. 29147–29154.
6. Chen Z., Karaplis A.C., Ackerman S.L. et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10, № 5. P. 433–443.
7. Laakkonen M.O., Mannermaa S., Hiltunen M.O. et al. Local hypomethylation in atherosclerosis found in rabbit eosod gene // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999. V. 19, № 9. P. 2171–2178.
8. Hiltunen M.O., Turunen M.P., Hakkinen T.P. et al. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions // *Vasc. Med.* 2002. V. 7, № 1. P. 5–11.
9. Sharma P., Kumar J., Garg G. et al. Detection of altered global DNA methylation in coronary artery disease patients // *DNA Cell. Biol.* 2008. V. 27, № 7. P. 357–365.
10. Baccarelli A., Rienstra M., Benjamin E.J. Cardiovascular epigenetics: basic concepts and results from animal and human studies // *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2010. № 3. P. 567–573.
11. Post W.S., Goldschmidt-Clermont P.J., Wilhide C.C. et al. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system // *Cardiovasc. Res.* 1999. V. 43, № 4. P. 985–991.
12. Kim J., Kim J.Y., Song K.S. et al. Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro vascular senescence // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1772, № 1. P. 72–80.
13. Zhu S., Goldschmidt-Clermont P.J., Dong C. Inactivation of monocarboxylate transporter MCT3 by DNA methylation in atherosclerosis // *Circulation.* 2005. V. 112, № 9. P. 1353–1361.
14. Zawadzki C., Chatelain N., Delestre M. et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 gene methylation is associated with low expression in carotid atherosclerotic plaques // *Atherosclerosis.* 2009. V. 204, № 2. P. e4–14.
15. Castillo-Diaz S.A., Garay-Sevilla M.E., Hernández-González M.A. et al. Extensive demethylation of normally hypermethylated CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries // *Int. J. Mol. Med.* 2010. V. 26, № 5. P. 691–700.
16. Назаренко М.С., Пузырёв В.П., Лебедев И.Н. и др. Профиль метилирования ДНК в области атеросклеротических бляшек человека // *Мол. биол.* 2011. Т. 45, № 4. С. 610–616.
17. Назаренко М.С., Марков А.В., Лебедев И.Н. и др. Профиль метилирования ДНК в тканях сосудистого русла при атеросклерозе // *Мол. биол.* 2013. Т. 47, № 3. С. 398–404.
18. Passerini A.G., Polacek D.C., Shi C. et al. Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profiles in a disturbed flow region of the adult porcine aorta // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101, № 8. P. 2482–2487.
19. Davies P.F., Manduchi E., Stoeckert C.J. et al. Emerging topic: Flow-related epigenetic regulation of endothelial phenotype through DNA methylation // *Vascul. Pharmacol.* 2014 (в печати; электронный ресурс: S1537189114000949).

ПРИВЫЧНОЕ НЕВЫНАШИВАНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ В СВЕТЕ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА

Т.В. Никитина, Е.А. Саженова, Е.Н. Толмачева, А.А. Кашеварова, Н.Н. Суханова, И.Н. Лебедев

НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

Введение

Человек как биологический вид отличается максимальным среди позвоночных уровнем эмбриональных потерь. Эти потери складываются из доклинических, проявляющихся как низкая вероятность зачатия в течение одного репродуктивного цикла, и из потерь клинически установленных беременностей, происходящих в форме спонтанных аборт.

Причиной этих потерь является высокая частота цитогенетических нарушений в ооцитах и эмбрионах человека на ранних стадиях развития, которая значительно превышает соответствующие показатели для других видов. Так, у дрожжей *Saccaromyces cerevisiae* и у нематоды *Caenorhabditis elegans* мейотическое нерасхождение происходит с частотой примерно 1 на 10 000. У самок *Drosophila melanogaster* оценки варьируют от 1 на 1 700 до 1 на 6 000, а у

мышей эта частота достигает 1% [1, 2]. Анализ кариотипов ранних эмбрионов домашних и лабораторных животных выявляет аномалии хромосом с частотой 2,5% у кур, 1–8% у кроликов, 14% у овец, 5–7% у коров, 10–12% у свиней и 5% у лабораторных мышей [3, 4]. У человека, по оценкам Плашо и соавт., 26% неоплодотворенных яйцеклеток и 29% эмбрионов хромосомно аномальны, а в недавнем масштабном исследовании Фрагоули анеуплоидными оказались 75% ооцитов, 83% эмбрионов на стадии дробления и 58% бластоцист [5, 6]. Хотя эти данные получены при использовании ЭКО и, скорее всего, превышают аналогичные показатели при естественном зачатии, но несомненно, что для репродукции человека характерна максимальная среди изученных организмов частота анеуплоидии в ооцитах и в раннем эмбриогенезе.

Самым частым следствием ранних нарушений эмбриогенеза является невынашивание беременности. Термин «невынашивание» (miscarriage) применяют ко многим осложнениям ранней беременности, поэтому важно его точное определение. В 2005 г. Европейское общество репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) ввело следующие термины: потери беременности, произошедшие после выявления в моче хорионического гонадотропина (положительный ХГЧ) или повышенного уровня β -ХГЧ в сыворотке, но до ультразвуковой или гистологической верификации – называют биохимическими потерями (biochemical loss). Обычно это происходит до 6-й нед беременности. Термин «клиническое невынашивание» (clinical miscarriage) используют, когда ультразвуковое или гистологическое обследование подтверждает существование внутриматочной беременности [7]. Клиническое невынашивание разделяют на раннее (до 12 нед) и позднее (от 12 до 21 нед). Пока нет консенсуса относительно числа выкидышей, которые относятся к привычному невынашиванию беременности (ПНБ). ESHRE рекомендуют считать ПНБ наличие в анамнезе у женщины подряд трех и более самопроизвольных прерываний беременности в сроках до 22 нед, однако многие специалисты, занимающиеся данной проблемой, в настоящее время полагают, что достаточно двух последовательных выкидышей, чтобы отнести семью к категории привычного невынашивания [8–10].

Примерно у половины обследованных супружеских пар выявляются известные причины, обуславливающие ПНБ (в их числе иммунологические, гормональные, анатомические, цитогенетические и инфекционные) [10, 11], однако у 40–60% семей повторные выкидыши вызваны пока не установленными факторами. Их поиск имеет большое значение как с точки зрения акушерской практики, так и для понимания биологических механизмов взаимодействия матери и эмбриона. Известно, что погибшие зародыши человека часто несут хромосомные аномалии [12–16], однако данные о распространенности этого явления именно при привычном выкидыше в силу небольшого числа обследованных эмбрионов неоднозначны [8, 9, 17–20]. В настоящей работе проведен сравнительный анализ цитогенетических нарушений у погибших эмбрионов при привычном выкидыше (439 эмбрионов) и при спорадических абортках (438 эмбрионов). Обсуждаются особенности функционирования репродуктивной системы у

человека, объясняющие высокую смертность в раннем эмбриональном периоде.

Материал и методы

Объектом настоящего исследования послужили 1 314 спонтанных абортусов, прокариотипированных в лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики СО РАМН за период с 1987 по июнь 2014 г. Abortивный материал поступал из гинекологических отделений и акушерских клиник Томска и Северска, при этом врач заполнял специальную регистрационную форму с указанием возраста, национальности, места рождения и профессии родителей погибшего зародыша, а также акушерско-гинекологического анамнеза женщины, числа и исхода предыдущих беременностей и с характеристикой эмбриона. Женщине предоставлялась полная информация относительно целей и способа проведения анализа, и она подписывала информированное согласие. В группу с ПНБ относили абортусов от женщин с двумя и более потерями беременности.

Операционный материал, обычно представляющий собой фрагменты плодного мешка, помещали в стерильный контейнер с 20 мл физиологического раствора и доставляли в лабораторию. Ткани плодного мешка отмывали от крови и отделяли от децидуальных тканей. В подавляющем большинстве случаев хромосомные препараты получали после длительного культивирования экстраэмбриональных тканей в среде DMEM/F12 (1:1) с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки, кроме того, применяли прямой метод приготовления препаратов из ворсин хориона. Процесс культивирования, фиксации и получения хромосомных препаратов подробно описан ранее [21].

Вычисление статистической значимости различий между показателями проводили с помощью критерия χ^2 и точного критерия Фишера; корреляции – с помощью непараметрического критерия Спирмена; сравнения между группами – с применением непараметрического критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Кариотип был установлен для 1 314 абортусов, из которых 439 эмбрионов было от женщин с ПНБ (две потери беременности и более), а 438 эмбрионов были отнесены к группе спорадических абортусов. Еще 343 абортуса, представляющих собой потерю первой беременности, и 92 случая с неполным акушерско-гинекологическим анамнезом были исключены из дальнейшего анализа.

Средний возраст женщин в выборке с ПНБ составил ($28,9 \pm 6,11$) года, в выборке женщин со спорадическими абортками ($28,5 \pm 5,97$) года. Срок беременности в группе ПНБ составил ($9,6 \pm 2,8$) нед, а в группе без ПНБ – ($9,8 \pm 2,8$) нед. Статистически значимых отличий между выборками по данным показателям не было. В обеих группах подавляющее большинство эмбрионов было представлено абортками первого триместра беременности (91,8 и 92,2% соответственно).

Среди 439 привычных выкидышей 240 (54,7%) имели нормальный и 199 (45,3%) – аномальный хромосомный набор. С ростом числа предыдущих потерь беременности у женщины возрастала частота эмбрионов с нормальным кариотипом, однако

данная тенденция не достигала статистически значимого уровня (рис. 1).

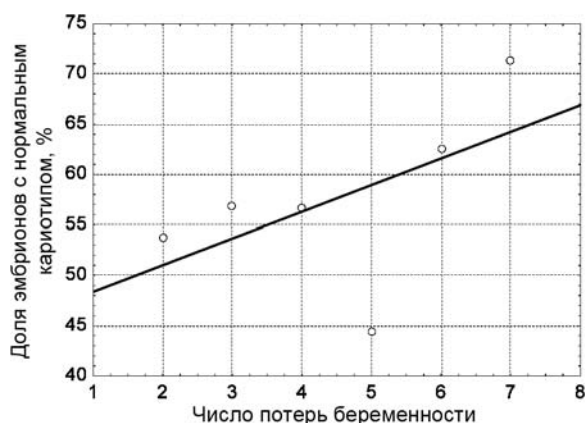


Рис. 1. Частота абортусов с нормальным кариотипом в зависимости от числа предыдущих выкидышей

Из 438 спорадических абортусов 194 (44,3%) имели нормальную хромосомную конституцию. Частота эмбрионов с нормальным кариотипом была статистически значимо выше в группе с привычным невынашиванием, чем в группе спорадических абортусов (54,7 и 44,3% соответственно, $p = 0,002$). Спектр хромосомных мутаций у привычных выкидышей в целом не отличался от найденного для спорадических абортусов. Основную долю составляли трисомии аутосом, далее по частоте встречаемости шли тетра- и триплоидии, затем аномалии половых хромосом и структурные перестройки, представленные примерно в равных пропорциях в обоих выборках (табл. 1).

Единственным типом аномалий, по которому статистически значимо различались выборки с ПНБ и без ПНБ, оказались двойные трисомии, частота которых составила 4,5% среди привычных выкидышей и 1% среди спорадических, $p = 0,015$.

Чистые двойные трисомии (7 случаев) встретились только среди абортусов от женщин с ПНБ. Еще 4 случая двойных трисомий в мозаичном состоянии с трисомным или дисомным клеточным клоном распределены поровну (по 2 случая) между выборками. Чаще всего в двойных трисомиях участвовали хромосомы 16 и 21 (5 раз), 18 (4 раза), 15 (3 раза), хромосомы 8, 9, 20, 22 и половые (по 1 разу).

Выполнено сравнение частоты кариотипов у абортусов от женщин с привычным невынашиванием и без ПНБ в разных возрастных группах: молодых (не более 37 лет) и старшего возраста (не менее 38 лет). У молодых женщин с привычным выкидышем обнаружена статистически значимо более высокая частота абортусов с нормальным кариотипом по сравнению с женщинами того же возраста со спорадическим выки-

дышем (55,8 и 45,7% соответственно, $p = 0,0045$). Среди женщин 38 лет и старше частоты абортусов с нормальным кариотипом составили 31,8% в группе с ПНБ и 23,8% в группе без ПНБ. Статистически значимых отличий по данному показателю между группами обнаружено не было.

Учитывая, что средняя популяционная частота спонтанных абортусов составляет около 15% клинически распознаваемых беременностей, риск случайного возникновения трех последовательных случаев потери беременности, вычисленный по формуле

$$\text{случайное ПНБ} = \mu^3, \quad (1)$$

где μ — частота спорадических абортусов, будет равен 0,33%. Фактически же наблюдаемая частота этого явления заметно выше случайной и варьирует в различных популяциях в пределах 1–2% [10, 11]. Это заставляет предположить существование в части семей определенных факторов, провоцирующих повторные случаи потерь беременности. Какова доля таких семей среди супружеских пар с ПНБ? Показано, что частота спонтанных абортусов значительно зависит от возраста женщин, варьируя от 0,13% для возраста 20–24 года до 13,3% для возраста 40–44 года [22]. Это означает, что для женщин после 40 лет вероятность случайной потери трех беременностей на два порядка выше, чем для 20-летних (табл. 2).

Приняв среднепопуляционную частоту ПНБ равной 1% и учитывая, что в половине семей выявляется патология, обуславливающая невынашивание, можно заключить, что идиопатическое ПНБ имеет место в 0,5% семей. Если из оставшихся необъясненными привычных выкидышей 0,34% можно отнести на счет просто случайного повторения спонтанных абортусов, то это означает, что большинство идиопатических ПНБ (0,34 из 0,5 (68%)) могут не иметь под собой какой-либо постоянной патологической основы. Следовательно, две трети женщин с необъяснимым привычным выкидышем даже без лечения будут иметь такую же вероятность благополучного исхода в следующей беременности, как и в общей популяции данного возраста [23]. Это положение подтверждается результатами исследования [24], в котором у 29,5% абортусов были выявлены причины ПНБ, такие как антифосфолипидный синдром, аномалии кариотипа у родителей, анатомические аномалии матки, эндокринные нарушения (гипотиреозидизм, диабет, поликистоз яичников). Среди остальных идиопатических случаев, для которых не были обнаружены традиционные причины невынашивания, 41,1% составляли аномалии кариотипа эмбриона. И лишь 24,5% идиопатических ПНБ имели спонтанный аборт с нормальным кариотипом и могли быть действительно классифицированы как привычный выкидыш неустановленного генеза.

Таблица 1

Распределение частот кариотипов эмбрионов при привычных и спорадических абортах

| Группа | Нормальный кариотип, % | Аномальный кариотип, % | Аномалии кариотипа, абс. (%) | | | | | | | |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|------------------|------------------|------------|--------------|-------------|-----------|----------|
| | | | Трисомии аутосом | Двойные трисомии | Аномалии гоносом | Триплоидии | Тетраплоидии | Структурные | Моносомии | Другие* |
| ПНБ ($n = 439$) | 240 (54,7) | 199 (45,3) | 85 (42,7) | 9 (4,5) | 21 (10,6) | 28 (14,1) | 38 (19,1) | 5 (2,5) | 2 (1,0) | 9 (4,5) |
| Спорадический аборт ($n = 438$) | 194 (44,3) | 244 (55,7) | 102 (41,8) | 2 (1,0) | 22 (9,0) | 45 (18,4) | 53 (21,7) | 5 (2,0) | 2 (0,8) | 13 (6,5) |

Примечание. n — количество исследованных эмбрионов; * — сочетание различных форм аномалий кариотипа. Жирным шрифтом выделены статистически значимые отличия.

Таблица 2

Частота спонтанных абортосов, случайных повторяющихся абортосов и привычного невынашивания в зависимости от возраста женщины [23]

| Возраст, лет | Спорадические абортосы, % ¹ | Случайно повторяющиеся абортосы, % ² | Наблюдаемые частоты ПНБ в целом, % |
|--------------|--|---|------------------------------------|
| 20–24 | 11 | 0,13 | – |
| 25–29 | 12 | 0,17 | 0,4 |
| 30–34 | 15 | 0,34 | 1 |
| 35–39 | 25 | 1,56 | 3 |
| 40–44 | 51 | 13,3 | – |

¹ Данные из работы [22].

² Данные вычислены по формуле (1).

Тем не менее остается часть семей, для которых существуют реальные, но пока не установленные причины гибели зародышей, именно они представляют важный объект для поиска генетических, эпигенетических и других причин потери беременности. Один из способов оценить возможный вклад факторов различной этиологии в привычное невынашивание – это сравнительный анализ ПНБ и спорадических абортосов. В настоящей работе проведено сопоставление частот хромосомных аномалий в выборках спорадических и повторяющихся абортосов.

Вследствие того что разные авторы используют различный дизайн исследований, наиболее корректные результаты могут быть получены при сравнении выборок с ПНБ и без ПНБ в одной работе, что позволяет нивелировать возможное влияние на результаты исследования таких факторов, как успешность культивирования клеток, инфицирование культур или материнская контаминация [25–28]. К настоящему моменту опубликовано только три такие работы, объемы обследованных в них выборок невелики, а результаты противоречивы. В исследовании Стерн и соавт., проведенном на американской и мексиканской популяциях, частоты эмбрионов со сбалансированным кариотипом не отличались между семьями с привычным невынашиванием (40 из 94 обследованных, 43%) и семьями без ПНБ (56 из 130 обследованных, 43%) [17]. Исследование на японской популяции (234 привычных и 112 спорадических выкидышей) выявило, что при ПНБ эмбрионы с нормальным кариотипом встречаются статистически значимо чаще, чем при спорадических эмбриональных потерях (48,7 против 23,7%) [8]. Сходные результаты получены американскими авторами: частота нормальных кариотипов у привычных абортосов (42%) была статистически значимо выше, чем у спорадических (25%) (обследовано 133 и 122 эмбриона соответственно) [9]. В представленной работе проанализировано более 430 эмбрионов в каждой группе, частота цитогенетически нормальных абортосов у женщин с привычными выкидышами также оказалась статистически значимо выше (54,7 против 44,3% у спорадических, $p = 0,002$). Сравнение результатов приведенных исследований отражено на рис. 2.

Анализируя результаты различных исследований, следует учитывать особенности формирования выборок, основными из которых являются критерии ПНБ (2 или 3 выкидыша), возраст пациенток, и то, насколько строго были отобраны женщины с идиопатическим ПНБ. И в нашей работе, и в сравниваемых исследованиях [8, 9, 17] к привычному выкиды-

шу относили 2 потери беременности и более. Если в качестве критерия ПНБ в нашем исследовании взять 3 потери беременности и более, то частота эмбрионов с нормальным кариотипом при привычном выкидыше также будет статистически значимо выше, чем при спорадических абортосах (57 и 48% соответственно, $p = 0,04$). В работах Огасавара и соавт. и Салливан и соавт. анализировали случаи идиопатического ПНБ, а в работе Стерн и соавт. выборка не охарактеризована. В нашем исследовании преимущественно взяты случаи идиопатического ПНБ. Однако, вследствие того что выборка формировалась на протяжении более чем двух десятков лет, за которые иммунологические, гормональные и прочие диагностические критерии в акушерско-гинекологической практике претерпели значительные изменения, ее нельзя считать полностью однородной по данному признаку. Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что идиопатическое привычное невынашивание чаще, чем спорадические эмбриональные потери, вызвано не хромосомным дисбалансом, а другими факторами.

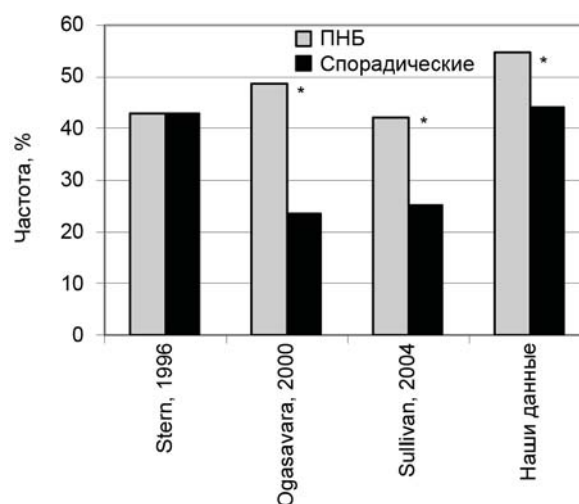


Рис. 2 Сравнение частот абортосов с нормальным кариотипом при ПНБ и при спорадических выкидышах в различных исследованиях [8, 9, 17]: * – статистически значимые отличия

Этот вывод не так банален, как может показаться. Действительно, наличие у женщины постоянного фактора, провоцирующего потери беременности, должно вызывать более частую гибель эмбрионов с нормальным кариотипом. Однако, по данным преимплантационного генетического скрининга (ПГС), эмбрионы от пациенток с ПНБ достоверно чаще несут хромосомные aberrации, чем эмбрионы от женщин без привычного невынашивания. Так, сравнение частоты аномальных кариотипов преимплантационных эмбрионов от супругов с ПНБ и в контрольной группе супругов, не имеющих проблем с вынашиванием беременности, выявило, что для женщин моложе 37 лет с ПНБ частота эмбрионов с несбалансированным кариотипом значительно выше, чем у женщин без репродуктивных проблем (66 и 33% соответственно) [29].

Схожая частота хромосомных аномалий (60,8%) была обнаружена у 2 282 преимплантационных эмбрионов от женщин с идиопатическим ПНБ (две потери беременности и более), изученных с помощью

матричной сравнительной геномной гибридизации на ДНК-микрочипах (aCGH). В результате отбора эмбрионов с нормальным кариотипом для имплантации, частота невынашивания беременности составила всего 6,9% по сравнению с ожидаемой для данной выборки 33,4% [30]. Авторы полагают, что идиопатическое ПНБ в основном бывает вызвано хромосомными аномалиями самого эмбриона. В другой работе сравнивали частоты хромосомных аномалий у преимплантационных эмбрионов от супружеских пар, у которых предыдущая беременность была анеуплоидной, с частотами в контрольной группе супругов, у которых ПГС проводили на сцепленные с полом заболевания. Общая частота хромосомных аномалий в группе с предыдущими аутосомными анеуплоидиями была статистически значимо выше, чем в контрольной группе (67,8 против 34,0% в контроле). Для аномалий по половым хромосомам в предыдущей беременности таких отличий обнаружено не было [31].

Таким образом, прямое сравнительное кариотипирование привычных и спорадических абортусов выявляет повышенную частоту эмбрионов с нормальным кариотипом при ПНБ, тогда как исследование преимплантационных эмбрионов от пациенток с привычным выкидышем обнаруживает обратную тенденцию. Одна из возможных причин такого несоответствия заключается в том, что при преимплантационном скрининге в качестве контрольной выборки используют обычно супружеские пары без репродуктивных проблем.

Известно, что с повышением возраста женщины резко увеличивается частота хромосомных аберраций [32], поэтому представляет интерес отдельно проанализировать частоты кариотипов для женщин разных возрастов. Мы обнаружили статистически значимо более высокую частоту абортусов с нормальным кариотипом у молодых женщин (до 37 лет) с привычным выкидышем по сравнению с женщинами того же возраста, имевшими спорадический выкидыш. Следует отметить, что среди женщин старше 38 лет достоверных отличий по частоте абортусов с нормальным кариотипом между группами с ПНБ и без ПНБ выявлено не было. Очень похожие результаты продемонстрировало исследование Стефенсон и соавт., в котором возрастная граница составляла 36–37 лет [19]. Это позволяет предположить именно у молодых женщин с ПНБ наличие факторов, не связанных с хромосомным нерасхождением, и провоцирующих привычный выкидыш.

Цитогенетическое обследование 50 погибших эмбрионов от женщин старше 35 лет с привычным выкидышем (3 и более СА) выявило хромосомные аномалии у 78% из них, а в контрольной группе из 140 спорадических абортусов (2 и менее СА) от матерей того же возраста частота хромосомных аномалий значимо не отличалась и составила 70% [33]. Авторы делают вывод, что для пациенток старше 35 лет с ПНБ основной причиной потерь беременности являются хромосомные аномалии эмбриона, а другие причины составляют не более 20%.

Таким образом, вклад различных причин в этиологию ПНБ, вероятно, отличается для женщин разного возраста. Если у молодых пациенток среди причин привычного выкидыша преобладают нецитогенетические факторы, то для женщин старшей воз-

растной группы на первый план выходит нерасхождение хромосом, приводящее к формированию несбалансированного кариотипа у эмбриона. Представляется возможным выделить два типа идиопатического привычного невынашивания: 1) происходит случайно у женщин, не имеющих реальной патологии; 2) происходит из-за патологии, которая в настоящее время еще не может быть определена с помощью обычных клинических исследований. Первая категория имеет неплохой прогноз относительно живорождения в последующей беременности – на уровне среднепопуляционного для данного возраста. Прогноз для женщин, относящихся ко второй категории идиопатического ПНБ, будет менее благоприятным. Именно данная группа представляет наибольший интерес с точки зрения поиска неизвестных пока причин эмбриональной гибели.

При классификации конкретного случая необходимо учитывать следующие факторы: возраст (у женщин старшего возраста вероятность случайного повторения трех спонтанных абортусов в 100 раз выше, чем у молодых (см. табл. 2)); число предыдущих потерь беременности (чем оно выше, тем менее вероятна случайная природа ПНБ); кариотип предыдущих абортусов (потеря зуплоидного зародыша вследствие случайности менее вероятна, чем анеуплоидного).

У женщин с ПНБ нормальный кариотип предыдущего абортуса связан с неблагоприятным прогнозом в последующей беременности [18]. В исследовании на японской популяции установлено, что у пациенток с кариотипически нормальным абортусом следующая беременность закончилась невынашиванием в 62%, а у пациенток с аномальным кариотипом плода аборт произошел лишь у 38% женщин ($p = 0,01$). С ростом числа предыдущих случаев невынашивания беременности с 2 до 10 вероятность прерывания последующей беременности повышалась с 23 до 94%, а доля абортусов с нормальным кариотипом возрастала с 36 до 89% [8]. В нашей работе также наблюдалась аналогичная тенденция увеличения частоты зуплоидных эмбрионов с ростом числа предыдущих абортусов, не достигающая, однако, статистически достоверного уровня (см. рис. 1)

Приведенные факты позволяют сделать важное заключение: молодые женщины даже с двумя выкидышами в анамнезе более вероятно могут иметь реальную причину идиопатического ПНБ, чем женщины старшего возраста с тремя потерями беременности. Понимание этих различий в природе ПНБ поможет более целенаправленно проводить исследовательские работы в этой области, а также более обоснованно назначать обследование и лечение пациентов. Эпидемиологические и генетические исследования предполагают мультифакторный характер идиопатического ПНБ, кроме того, могут играть роль средовые воздействия, эпигенетические нарушения, вариации числа копий ДНК, фрагментация спермальной ДНК и другие факторы [20, 34].

В последние годы благодаря использованию современных исследовательских технологий, таких как микрочиповый анализ ДНК одной клетки, оказалось возможным оценить масштабы хромосомных аномалий на разных этапах репродукции человека. Результаты оказались поразительными. Ваннесте и со-

авт. исследовали частоты крупных хромосомных перестроек во всех бластомерах эмбрионов хорошего качества на стадии дробления, полученных от молодых женщин без репродуктивных проблем. Только 2 из 23 оплодотворенных *in vitro* эмбриона (после ЭКО) имели нормальный кариотип во всех бластомерах, около половины эмбрионов вообще не имели бластомеров с нормальным кариотипом, а оставшиеся были мозаиками по широкому спектру структурных хромосомных аномалий, причиной которых было преимущественно митотическое нерасхождение [35]. Насколько близко отражает эта ситуация частоту хромосомных мутаций у преимплантационных эмбрионов при естественном зачатии, проверить пока невозможно. Вряд ли близко. Если бы это было так, то число живорожденных оказалось бы выше, чем число нормальных эмбрионов на момент имплантации.

Поразительно высокая частота хромосомных нарушений в репродукции человека была обнаружена и в масштабном исследовании Фрагоули и соавт., где выборка состояла из 396 супружеских пар, прошедших процедуру ЭКО по причине большого возраста мужа (56%), предыдущего неудачного опыта имплантации (27%) и идиопатического невынашивания беременности (17%). Всего с помощью микрочипов были исследованы 2 204 ооцита и эмбриона. Цитогенетический анализ ооцитов проводили при биопсии первого и второго полярных телец после забора и оплодотворения ооцитов соответственно, что позволило провести независимый анализ обоих делений мейоза. Для исследования эмбрионов один бластомер забирали на стадии дробления и 5–10 клеток брали от трофэктодермы на стадии бластоцисты. Оказалось, что только 26% ооцитов несли нормальный гаплоидный набор хромосом, 74% были аномальны. Из них 30% представляли собой ошибки первого деления мейоза, 43% – ошибки второго деления, а у остальных 27% ошибки произошли в обоих мейотических делениях. На стадии дробления 83% несли аномалии кариотипа, причем у половины из них аномалии были комплексными (более двух нарушений на клетку). Бластоцисты имели эуплоидные кариотипы в 42% и аномальные в 58%. На всех изученных стадиях наблюдалось высоко статистически значимое повышение частоты аномалий у женщин старше 38 лет по сравнению с молодыми (до 37 лет включительно): 78% против 47% в ооцитах, 86% против 73% на стадии дробления, 65% против 48% в бластоцистах. Кроме того, у пациенток старшего возраста достоверно чаще выявлялись комплексные аномалии [6].

Протекание преимплантационного развития оказалось связано со значительным колебанием частоты анеуплоидий. Анеуплоидными были 75% ооцитов, 83% эмбрионов на стадии дробления и 58% бластоцист. На стадии дробления наблюдалось не только временное повышение частот анеуплоидий вообще, но отмечена как максимальная частота эмбрионов с множественными аномалиями (41%), что значительно выше, чем в ооцитах или бластоцистах, так и увеличение случаев сегментных делеций и дупликаций. При прогрессии зародыша к стадии бластоцисты происходит значительное уменьшение среднего числа ошибок на эмбрион по сравнению с более ранними стадиями развития, что предполагает элиминацию либо самих анеуплоидных эмбрионов, либо аномальных клеток в их составе. Хотя

мозаицизм чаще всего встречается на стадии дробления, он обнаруживается и в некоторой части бластоцист. Но доля аномальных клеток в мозаичных диплоидных и анеуплоидных эмбрионах, как правило, уменьшается, что позволяет предположить, что в течение последних стадий преимплантационного развития эуплоидные клетки имеют лучшую выживаемость или быстрее делятся и, таким образом, начинают доминировать в эмбрионе [36–38]. Вполне возможно, что клетки с большим числом нарушений (или эмбрионы, которые содержат высокую долю таких клеток) перестают делиться вообще либо подвергаются апоптозу [6].

Все нарушения, по-видимому, достаточно толерантны до момента активации эмбрионального генома, после чего происходит снижение частот некоторых форм аномалий. Однако многие анеуплоидии, в том числе моносомии и множественные аномалии, не имеют пока значительного влияния на жизнеспособность, и эмбрионы успешно достигают стадии бластоцисты. Таким образом, одна из эволюционных особенностей репродукции человека заключается в отсутствии жесткого отбора на этапе гаметогенеза, оплодотворения или дробления, основная селекция эмбрионов происходит в процессе имплантации либо вскоре после нее. Следовательно, основной причиной низкой успешности зачатия, наблюдаемой у человека (беременность наступает только в 18–28% менструальных циклов у женщин при регулярной половой жизни без использования противозачаточных средств [39]) являются доклинические потери беременности.

Еще в 1988 г. была опубликована работа Уилкоккс и соавт., в которой факт возникновения беременности регистрировался путем измерения концентрации ХГЧ с помощью высокочувствительного метода. 22% беременностей заканчивались до того, как они могли быть клинически установлены, причем абсолютное большинство (95%) женщин с такими ранними потерями беременности имели нормальную фертильность [40].

Процессы, ответственные за отбор эмбрионов при имплантации, в последнее время изучаются весьма активно, так как они имеют, кроме научного, еще и большое практическое значение, особенно для вспомогательных репродуктивных технологий. Так, Текленбург и соавт. использовали модель совместного культивирования, при котором бластоцисты культивировали на децидуализированных стромальных клетках эндометрия с целью идентифицировать ключевые факторы, вовлеченные в «диалог» матери и эмбриона на ранних сроках беременности. Феноменальный эффект был обнаружен, когда в период совместного культивирования эмбрион оказывался неполноценным: если развитие бластоцисты останавливалось, то децидуальные клетки переставали продуцировать ключевые медиаторы имплантации и иммуномодуляторы. Если же стромальные клетки эндометрия не были децидуализированы, то бластоцисты не запускают материнский ответ независимо от того, было ли развитие эмбриона в культуре нормальным или нет [41].

Таким образом, у человека после дифференцировки в децидуальные клетки эндометрия матки становится биосенсором качества эмбрионов. Из наблюдения, что циклическая децидуализация эн-

дометрия, возможно, возникла в качестве механизма для быстрой инкапсуляции, распознавания и отбора эмбрионов, сразу следует возможность, что дефекты этого процесса могут облегчать имплантацию неполноценных эмбрионов и приводить к повторным потерям беременности. По правде говоря, эта концепция, что ПНБ возникает как результат недостаточного предотвращения имплантации «некачественных» эмбрионов, не нова. Еще в 1996 г. Аплин и соавт. обнаружили, что женщины, страдающие повторными самопроизвольными выкидышами, экспрессируют пониженный уровень муцина 1, антиадгезионной молекулы, вносящей вклад в барьерную функцию люминального эпителия матки [42]. Авторы сформулировали гипотезу о том, что ПНБ возникает как результат недостаточного предотвращения имплантации «некачественных» эмбрионов, такой эндометрий позволяет чаще имплантироваться генетически аномальным зародышам, чем эндометрий женщин без ПНБ в анамнезе [43]. Позже Салкер и соавт. продемонстрировали, что у пациенток в привычными выкидышами подготовка эндометрия к беременности характеризуется нарушением децидуализацией стромальных клеток, пролонгированной восприимчивостью эндометрия, отсутствием распознавания эмбриона и нарушением регуляции ответов на эмбриональные сигналы [44].

Для репродукции человека характерна максимальная среди изученных организмов частота цитогенетических нарушений в ооцитах и эмбрионах на ранних стадиях развития. Основной естественный отбор жизнеспособных зародышей происходит при имплантации (около 30% беременностей) и вскоре после нее – в виде биохимических потерь (30%), а эмбриональная гибель на этой стадии проявляется как сниженная вероятность зачатия в течение одного цикла. На этапе клинически распознаваемых беременностей отсев продолжается в виде спонтанных абортосов (около 15% беременностей) и только около 25% зачатий приводят к рождению ребенка. Идиопатическое ПНБ – сложная и клинически гетерогенная проблема, одной из причин которой, по-видимому, является сниженная селективная способность эндометрия, позволяющая имплантироваться генетически аномальным зародышам.

Литература

- Hassold T., Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy // *Nat. Rev. Genet.* 2001. V. 2. P. 280–291.
- Macklon N.S., Geraedts J.P., Fauser B.C. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss // *Hum. Reprod. Update.* 2002. V. 8. P. 333–343.
- Gustavsson I. Chromosome aberrations and their influence on the reproductive performance of domestic animals – a review // *J. Animal Breeding and Genetics.* 1980. V. 97. P. 176–195.
- Hansen P.J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective // *J. Anim. Sci.* 2002. V. 80. P. 33–44.
- Plachot M., Grouchy de J., Junca A.M. et al. From oocyte to embryo: a model, deduced from *in vitro* fertilization, for natural selection against chromosome abnormalities // *Annales de Genetique.* 1988. V. 30. P. 22–32.
- Fragouli E., Alfarawati S., Spath K. et al. The origin and impact of embryonic aneuploidy // *Hum. Genet.* 2013. V. 132, № 9. P. 1001–1013.
- Farquharson R.G., Jauniaux E., Exalto N. Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events // *Hum. Reprod.* 2005. V. 20. P. 3008–3011.
- Ogasawara M., Aoki K., Okada S., Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages // *Fertil. Steril.* 2000. V. 73. P. 300–304.
- Sullivan A.E., Silver R.M., LaCoursiere D.Y. et al. Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage // *Obstet. Gynecol.* 2004. V. 104. P. 784–788.
- Stirrat G.M. Recurrent miscarriage // *Lancet.* 1990. V. 336. P. 673–675.
- Rai R., Regan L. Recurrent miscarriage // *Lancet.* 2006. V. 368. P. 601–611.
- Boue J., Boue A., Lazar P. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions // *Teratology.* 1975. V. 12, № 1. P. 11–26.
- Hassold T.J. A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions // *Am. J. Hum. Genet.* 1980. V. 32. P. 723–730.
- Eiben B., Bartles I., Bahr-Porsch S. et al. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage // *Am. J. Hum. Genet.* 1990. V. 47. P. 656–663.
- Dejmek J., Vojtassak J., Malova J. Cytogenetic analysis of 1508 spontaneous abortions originating from south Slovakia // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1992. V. 46. P. 129–136.
- Menasha J., Llevy B., Hirschhorn K., Kardon N.B. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from 12 – year study // *Genetics in Medicine.* 2005. V. 7, № 4. P. 251–263.
- Stern J.J., Dorfmann A.D., Gutierrez-Najar A.J. et al. Frequency of abnormal karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion // *Fertil. Steril.* 1996. V. 65. P. 250–253.
- Carp H., Toder V., Aviram A. et al. Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage // *Fertil. Steril.* 2001. V. 75. P. 678–682.
- Stephenson M.D., Awartani K.A., Robinson W.P. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study // *Hum. Reprod.* 2002. V. 17. P. 446–451.
- Никитина Т.В., Лебедев И.Н. Цитогенетика привычного невынашивания беременности // *Генетика.* 2014. Т. 50, № 5. С. 501–514.
- Лебедев И.Н., Никитина Т.В. Цитогенетика нарушений эмбрионального развития человека (наследственность и здоровье): учебно-методическое пособие. Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2013. 124 с.
- Nybo Andersen A.M., Wohlfahrt J., Christens P. et al. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study // *Br. Med. J.* 2000. V. 320. P. 1708–1712.
- Saravelos S., Li T.-C. Unexplained recurrent miscarriage: how can we explain it? // *Human Reproduction.* 2012. V. 27, № 7. P. 1882–1886.
- Sigiura-Ogasawara M., Ozaki Y., Katano K., Suzumori N. et al. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage // *Human Reproduction.* 2012. V. 27, № 8. P. 2297–2303.
- Fritz B., Hallermann C., Olfert J. et al. Cytogenetic analysis of culture failures by comparative genomic hybridization (CGH) – re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions // *Eur. J. Hum. Genet.* 2001. V. 9. P. 539–547.
- Лебедев И.Н., Островерхова Н.В., Никитина Т.В. и др. Молекулярно-цитогенетическая характеристика хромосомного дисбаланса в клетках спонтанных абортосов с низкой пролиферативной активностью *in vitro* // *Генетика.* 2003. Т. 39, № 8. С. 1112–1122.
- Bell K.A., van Deerlin P.G., Haddad B.R., Feinberg R.F. Cytogenetic diagnosis of «normal 46,XX» karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading // *Fertil. Steril.* 1999. V. 2. P. 334–341.

28. Никитина Т.В., Лебедев И.Н., Суханова Н.Н. и др. Контаминация культур фибробластов спонтанных абортусов клетками матери: значение для цитогенетического анализа причин эмбриональной летальности // Генетика. 2004. Т. 40, № 7. С. 800–809.
29. Rubio C., Pehlivan T., Rodrigo L. et al. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview // Am. J. Reprod. Immunol. 2005. V. 53, № 4. P. 159–165.
30. Hodes-Wertz B., Grifo J., Ghadir S., et al. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos // Fertil. Steril. 2012. V. 98. P. 675–680.
31. Al-Asmar N., Peinado V., Vera M., et al. Chromosomal abnormalities in embryos from couples with a previous aneuploid miscarriage // Fertil. Steril. 2012. V. 98, № 1. P. 145–150.
32. Munne S., Alikani M., Tomkin G. et al. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities // Fertility Sterility 1995. V. 64, № 2. P. 382–391.
33. Marquard K., Westphal L., Milki A., Lathi R. Etiology of recurrent pregnancy loss in women over the age of 35 // Fertil. Steril. 2010. V. 94. P. 1473–1477.
34. Larsen E.C., Christiansen O.B., Kolte A.M., Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage // BMC Medicine. 2013. V. 11. P. 154.
35. Vanneste E., Voet T., Le Caigrec C. et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos // Nat. Med. 2009. V. 15. P. 577–583.
36. Sandalinas M., Sadowy S., Alikani M. et al. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage // Hum Reprod. 2001. V. 16. P. 1954–1958.
37. Rubio C., Rodrigo L., Mercader A. et al. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development // Prenat. Diagn. 2007. V. 27 P. 748–756.
38. Santos M.A., Teklenburg G., Macklon N.S. et al. The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of Day 4, 5 and 8 human embryos // Hum. Reprod. 2010. V. 25. P. 1916–1926.
39. Short R.V. Species differences in reproductive mechanisms // Reproduction in Mammals: 4. Reproductive Fitness / Eds C.R. Austin & R. V. Cambridge University Press, 1984. P. 24–61.
40. Wilcox A.J., Weinberg C.R., O'Connor J.F. et al. Incidence of early loss of pregnancy // N. Engl. J. Med. 1988. V. 319. P. 189–194.
41. Teklenburg G., Salker M., Molokhia M. et al. Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation // PLoS One 2010. V. 5, № 4. P. e10258.
42. Aplin J., Hey N., Li T. MUC1 as a cell surface and secretory component of endometrial epithelium: reduced levels in recurrent miscarriage // Am. J. Reprod. Immunol. 1996. V. 3, № 3. P. 261–266.
43. Quenby S., Vince G., Farquharson R., Aplin J. Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? // Hum. Reprod. 2002. V. 17, № 8. P. 1959–1963.
44. Salker M., Teklenburg G., Molokhia M et al. Natural Selection of Human Embryos: Impaired Decidualization of Endometrium Disables Embryo-Maternal Interactions and Causes Recurrent Pregnancy Loss // PLoS ONE. 2010. V. 5, № 4. P. e10287.

ИЗУЧЕНИЕ ВОВЛЕЧЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-3 В РАЗВИТИЕ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ И ПРОТЕИНУРИИ У ЖЕНЩИН С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

В.С. Овчарова

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород

Преэклампсия (ПЭ) – это полисистемный синдром, который обычно проявляется повышением АД и протеинурией [1]. В развитых странах ПЭ остается основной причиной таких тяжелых осложнений у матери, как коагулопатия, почечная и печеночная недостаточность, инсульт и материнская смертность [2]. Преэклампсия также сопровождается увеличением риска возникновения внутриутробной задержки роста плода, а это имеет как ближайшее, так и отдаленное влияние на состояние здоровья новорожденного [3]. Дети, страдавшие внутриутробной задержкой роста плода, имеют высокий риск ожирения, сердечно-сосудистых заболеваний, артериальной гипертензии и диабета во взрослом возрасте [4, 5].

В настоящее время ПЭ рассматривают как генетически детерминированную недостаточность процессов адаптации материнского организма к новым условиям существования, которые возникают с развитием беременности [6–8]. Генетическая компонента заболевания может составлять до 50% [9, 10].

Общепринятым достоверным морфологическим критерием ПЭ являются признаки задержки первой (6–8 нед) и, что более существенно, второй (14–16 нед) волны инвазии цитотрофобласта в стенке маточно-плацентарных артерий, что неразрывно связано с разрушением базальной мембраны и экстрацеллюлярного матрикса [6]. Результатом этих нарушений является отсутствие адаптации спи-

ральных артерий к развивающейся беременности с сохранением в них всех основных структур (эндотелия, мышечной оболочки, эластических мембран) и формирование сниженной плацентарной перфузии, что способствует развитию артериальной гипертензии [11]. Поражение сосудистой системы плаценты способствует повышению ее проницаемости. В условиях локальной ишемии ворсинчатого хориона, сниженного микроворсинчатого кровотока и гипоксии ишемизированная плацента начинает продуцировать в кровотоке факторы, обладающие свойствами эндотелиальных токсинов [12].

ПЭ, как правило, сопровождается нарушением функции почек – от протеинурии до острой почечной недостаточности. Патоморфологические изменения, обусловленные ПЭ, в большей степени распространяются на канальцевый аппарат – выраженная дистрофия извитых канальцев, иногда с десквамацией и распадом клеток почечного эпителия. Эту картину дополняют очаговые и мелкоочечные кровоизлияния от единичных до множественных под капсулу почек, в паренхиму – преимущественно в интермедиарную зону, реже в мозговой слой, а также в слизистую оболочку чашечек и лоханок [13].

Установлено, что матриксная металлопротеиназа-3 (ММР-3), также называемая стромелизином-1, катализирует деградацию многих компонентов соединительной ткани и может влиять на деградацию

экстрацеллюлярного матрикса через активацию проколлагеназы-1 [14]. При полиморфизме гена матриксной металлопротеиназы-3 –1612 5A/6A MMP-3 в промоторной части этого гена изменяется количество аденозина, расположенного в положении –1612 по отношению к сайту инициации транскрипции, в результате чего образуется один аллель с пятью аденозинами (5A) и другой аллель, несущий шесть аденозинов (6A) [15].

Целью исследования явилось изучение вовлеченности полиморфизма гена матриксной металлопротеиназы-3 –1612 5A/6A MMP-3 в развитие артериальной гипертензии и протеинурии у женщин с преэклампсией.

Выборка женщин с преэклампсией (445 человек) и контрольной группы (561 человек) сформирована на базе перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа. Материалом для исследования послужила ДНК, выделенная из венозной крови в объеме 5 мл. Забор венозной крови производился в пробирки с консервантом, содержащим раствор ЭДТА концентрацией 0,5 моль (рН = 8,0). Выделение геномной ДНК из периферической крови проводили методом фенольно-хлороформной экстракции. Исследование полиморфизма производили с помощью методов полимеразной цепной реакции с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров с последующим анализом полиморфизма гена –1612

5A/6A MMP-3 методом TaqMan зондов с помощью real-time ПЦР.

Сбор клинических и лабораторных данных осуществляется методом анкетирования и анализа историй болезней. Формирование базы данных и статистические расчеты производились с использованием программы Statistica 6.0.

Сравнение исследуемых групп по показателям артериального давления и уровня протеинурии проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (табл. 1), для их описания применяли медиану *Me* и интерквартильный размах (Q_{25} – Q_{75}).

При сравнении индивидуумов с разными генотипами по локусу –1612 5A/6A MMP-3 по показателям артериального давления в конце беременности в группе женщин с преэклампсией, в контрольной группе (женщины с физиологическим течением беременности) и объединенной группе статистически значимых различий выявлено не было ($p > 0,05$).

Установлено, что медиана протеинурии у беременных с ПЭ составила 0,07 г/л. При сравнении женщин с разными генотипами по локусу –1612 5A/6A MMP-3 по показателю протеинурии статистически значимых различий выявлено не было ($p > 0,05$).

Таким образом, в результате проведенного исследования не было выявлено ассоциаций локуса –1612 5A/6A MMP-3 с уровнем артериальной гипертензии и протеинурии в группе женщин с преэклампсией и контрольной группе.

Таблица 1

Ассоциации генетического полиморфизма –1612 5A/6A MMP-3 с уровнем артериального давления у беременных с ПЭ и контрольной группы (*Me* (Q_{25} – Q_{75}))

| Показатель | Генотип | | | <i>p</i> | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------|---------|---------|
| | Женщины с ПЭ | | | (1)–(2) | (1)–(3) | (2)–(3) |
| | 5A/5A (120 человек) (1) | 5A/6A (220 человек) (2) | 6A/6A (105 человек) (3) | | | |
| САД в конце беременности, мм рт. ст. | 140,0 (130,0–150,0) | 140,0 (130,0–150,0) | 130,0 (130,0–150,0) | 0,2 | 0,2 | 0,9 |
| ДАД в конце беременности, мм рт. ст. | 90,0 (80,0–100,0) | 90,0 (80,0–100,0) | 90,0 (80,0–100,0) | 0,6 | 0,5 | 0,6 |
| Показатель | Контрольная группа (без ПЭ) | | | <i>p</i> | | |
| | 5A/5A (126 человек) (1) | 5A/6A (253 человека) (2) | 6A/6A (174 человека) (3) | (1)–(2) | (1)–(3) | (2)–(3) |
| | САД в конце беременности, мм рт. ст. | 110,0 (110,0–120,0) | 115,0 (110,0–120,0) | | | |
| ДАД в конце беременности, мм рт. ст. | 70,0 (70,0–80,0) | 70,0 (70,0–80,0) | 70,0 (70,0–80,0) | 0,2 | 0,9 | 0,2 |
| Показатель | Женщины с ПЭ и контрольная группа | | | <i>p</i> | | |
| | 5A/5A (231 человек) (1) | 5A/6A (473 человека) (2) | 6A/6A (294 человека) (3) | (1)–(2) | (1)–(3) | (2)–(3) |
| | САД в конце беременности, мм рт. ст. | 120,0 (110,0–140,0) | 120,0 (110,0–140,0) | | | |
| ДАД в конце беременности, мм рт. ст. | 80,0 (70,0–90,0) | 80,0 (70,0–90,0) | 80,0 (70,0–90,0) | 0,5 | 0,4 | 0,06 |

Таблица 2

Ассоциации генетического полиморфизма –1612 5A/6A MMP-3 с уровнем протеинурии у беременных с ПЭ (*Me* (Q_{25} – Q_{75}))

| Показатель | Генотипы | | | <i>p</i> | | |
|------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------|-----|-----|
| | 5A/5A (105 человек) (1) | 5A/6A (210 человек) (2) | 6A/6A (118 человек) (3) | 1–2 | 1–3 | 2–3 |
| Протеинурия, г/л | 0,07 (0,03–0,12) | 0,07 (0,03–0,10) | 0,07 (0,03–0,13) | 0,9 | 0,5 | 0,5 |

Литература

- Lindheimer M.D., Umans J.G. Explaining and predicting preeclampsia // N. Engl. J. Med. 2006. V. 335. P. 1056–1058.
- Sibai B., Dekker G., Kupferminc M. Pre-eclampsia. Lancet, 2005. P. 785–799.
- Odegard R.A., Vatten L.J., Nilsen S.T. et al. Preeclampsia and fetal growth // Obstet Gynecol. 2000. V. 96. P. 950–955.
- Barker D.J. The fetal and infant origins of adult disease // BMJ. 1990. P. 1111.
- Barker D.J. The developmental origins of chronic adult disease // Acta Paediatr Suppl. 2004. V. 93. P. 26–33.

50. Айламазян Э.К. *Акушерство: национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 1200 с.
51. López-Carbajal M.J., Manríquez-Moreno M.E., Gálvez-Camargo D. et al. Risk factors associated to preeclampsia // *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 2012. V. 50, № 5. P. 471–476.
52. Direkvand-Moghadam A., Khosravi A., Sayehmiri K. Predictive factors for preeclampsia in pregnant women: a univariate and multivariate logistic regression analysis // *Acta Biochim. Pol.* 2012. V. 59, № 4. P. 673–677.
53. Young, B.C. Levine R.J., Karumanchi S.A. Pathogenesis of preeclampsia // *Annu Rev. Pathol.* 2010. V. 5. P. 173–192.
54. Roten L.T., Fenstad M.H., Forsmo S. et al. A low COMT activity haplotype is associated with recurrent preeclampsia in a Norwegian population cohort (HUNT2) // *Mol. Hum. Reprod.* 2011. V. 17, № 7. P. 439–446.
55. Макаров О.В., Ткачева О.Н., Волкова Е.В. Преэклампсия и хроническая артериальная гипертензия. Клинические аспекты. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 133 с.
56. Stepan H., Faber R. Elevated sFlt1 level and preeclampsia with parvovirus-induced hydrops // *N. Engl. J. Med.* 2006. V. 354. P. 1857–1858.
57. Helen Y., How M.D., Baha Sibai M.D. Is early-pregnancy proteinuria associated with an increased rate of preeclampsia in women with pregestational diabetes mellitus? // *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2004. V. 190. P. 775–778.
58. Beilby J.P., Chapman C.M., Palmer L.J. et al. Stromelysin-1 (MMP-3) gene 5A/6A promoter polymorphism is associated with blood pressure in a community population // *J. Hypertens.* 2005. V. 23, № 3. P. 537–542.
59. Ye S., Watts G.F., Mandalia S. et al. Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis // *Br. Heart J.* 1995. V. 73, № 3. P. 209–215.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК И ГЕНА *p53* У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО И ЗДОРОВЫХ ЖИТЕЛЕЙ КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

А.В. Рыжкова, В.И. Минина, М.Л. Баканова, Р.А. Титов, Ю.Е. Кулемин

Институт экологии человека СО РАН, г. Кемерово

Введение

Заболеваемость населения раком легкого (РЛ) во многих странах мира за последние 50 лет имеет неуклонную тенденцию к росту. В большинстве развитых стран рак легкого является наиболее распространенной формой опухоли у мужчин и одной из важнейших медицинских и социально-экономических проблем. Эта патология составляет 14% от всех онкологических заболеваний и входит в первую тройку нозологий среди злокачественных новообразований нашей страны и области [1, 4].

Рядом исследований показано, что на предрасположенность к злокачественным новообразованиям влияют наследственные особенности ферментов репарации ДНК [9, 21]. Очень важной для клетки (и для канцерогенеза) является ее способность воссоединять случайные двойные разрывы ДНК (DSBR-путь), что осуществляется двумя различными репарационными механизмами – негомологическим воссоединением концов ДНК и путем гомологической рекомбинации при наличии по соседству второй копии неповрежденного идентичного по нуклеотидной последовательности сегмента ДНК, например сестринской хроматиды. При нарушении системы репарации ДНК клетки проявляют повышенную чувствительность к действию различного рода мутагенов, что приводит в конечном итоге к повышенному уровню мутационных преобразований, гибели или злокачественному перерождению клеток [2]. Исследования в данной области представляют существенный интерес для получения информации, значимой именно для жителей Кузбасса, что позволит повысить возможности и эффективность профилактики РЛ у жителей нашего региона.

В связи с этим целью данного исследования стало изучение полиморфизмов генов ферментов репарации двунитевых разрывов ДНК: rs664143 *ATM* (Asp1853Asn), rs1805794 *NBS1* (Glu185Gln), rs3218536 *XRCC2* (Arg188His), rs861539 *XRCC3* (Thr241Met), rs1042522 *p53* (Arg72Pro) у больных РЛ и здоровых жителей Кемеровской области.

Материал и методы

В исследование включено 383 больных РЛ (средний возраст 59 лет), среди них 328 мужчин и 55 женщин, поступивших (первично) на лечение в Кемеровский областной клинический онкологический диспансер. В качестве популяционного контроля использовали выборку 324 условно здоровых лиц (средний возраст 49 лет), 255 мужчин и 69 женщин, проживающих в г. Кемерово.

Работа соответствует стандартам биоэтического комитета, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации, «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266. Все обследованные заполняли анкеты, подписывали форму информированного согласия.

Для изучения полиморфизма генов ферментов репарации ДНК из лейкоцитов периферической крови выделяли ДНК методом фенол-хлороформной экстракции и анализировали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. Генотипирование полиморфных маркеров: rs664143 *ATM* (Asp1853Asn), rs1805794 *NBS1* (Glu185Gln) проводили с использованием метода «SNP-экспресс» и набора реактивов, разработанного НПФ «Литех» (г. Москва). Амплификацию ДНК проводили с помощью амплификатора «Терцик» (ДНК-технология). Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 3%-м агарозном геле с бромистым этидием с последующей визуализацией фрагментов ДНК в ультрафиолетовом свете.

Типирование генов rs3218536 *XRCC2* (Arg188His), rs861539 *XRCC3* (Thr241Met) и rs1042522 *p53* (Arg72Pro) проводили методом мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени. Амплификацию проводили с помощью амплификатора iCycler iQ5 (Bio-Rad,

США). Полученные результаты интерпретировали исходя из анализа графиков накопления флуоресценции, специфичность оценивалась с помощью кривой плавления.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 6.0. При сравнении частот генотипов применяли стандартный критерий χ^2 Пирсона. Различия статистически значимы при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе было изучено распределение генотипов полиморфных вариантов генов *ATM*, *NBS1*, *XRCC2*, *XRCC3* и *p53* в группах больных РЛ и здоровых лиц для выяснения их взаимосвязи с риском развития РЛ (табл. 1). Важную роль в процессах репарации двунитевых разрывов (признана наиболее опасным типом повреждений ДНК, способных привести к геномной нестабильности и раку) играют гены *ATM*, *NBS1*. Ген *NBS1*, локализованный на хромосоме 8q21, имеет протяженность около 50 тыс. п.н. и включает 16 экзонов. Продукт этого гена – белок нибрин (p95, nibrin) имеет размер 754 аминокислоты [6, 23]. По данным литературы, можно предположить функциональное значение *NBS1* Glu185Gln в формировании индивидуальной чувствительности. В случае образования двойного разрыва ДНК нибрин способствует увеличению ферментативной активности *RAD50* и *MRE11*, а также связывает MRN-комплекс с местом разрыва [18]. Замена *NBS1* Glu185Gln способна изменять характер белок-белковых взаимодействий, вследствие чего увеличивает риск онкологических заболеваний, таких как рак груди у женщин [16], рак легких у населения Китая [14]. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что исследование полиморфизмов гена *NBS1* как маркеров индивидуальной чувствительности является перспективной задачей.

Ген *ATM* локализован на хромосоме 11q22.3-23.1 [20]. *ATM* осуществляет фосфорилирование ряда белков, участвующих в распознавании и репарации разрывов ДНК, а также белков контроля кле-

точного цикла [15]. Повреждение ДНК активирует *ATM*, которая фосфорилирует *SMC1*, критически важный для контроля репликационной вилки ДНК и процесса репарации [13]. Известно, что *ATM* принимает участие в процессе фосфорилирования *p53* при воспалительных реакциях [10]. Ген *XRCC2* локализован на хромосоме 7q36.1, длина транскрипта составляет 307 аминокислот [6]. Принимает участие в репарации двунитевых разрывов путем гомологичной репарации [12]. Ген *XRCC3* локализован на хромосоме 14q32.3, содержит 346 аминокислот. *XRCC2*, *XRCC3* кодируют семейства белков RecA/Rad51-related, которые участвуют в гомологичной рекомбинации для поддержания стабильности хромосом и повреждений ДНК [22]. Ген *p53* локализован на хромосоме 17 короткого плеча, содержит 393 аминокислот. Принимает участие в регуляции клеточного цикла, контроле репарации ДНК, запуске апоптоза в поврежденных клетках [3].

Сравнение распределений частот генотипов между полами не выявило никаких значимых различий между мужчинами и женщинами как в группе больных, так и в группе здоровых доноров. Наблюдаемые различия между РЛ и контролем достигали статистической значимости только у мужчин (табл. 2).

XRCC3 кодирует белок семейства RecA/Rad51, участвующий в гомологичной рекомбинации, поддерживает хромосомную стабильность путем репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Клетки, не содержащие активный белок *XRCC3*, имеют дефекты ключевого фермента гомологичной рекомбинации Rad51, при этом демонстрируется генетическая нестабильность и повышение чувствительности ДНК к повреждающим агентам. Без защиты Rad51 другие белки атакуют ДНК, и это вызывает его повреждение, а на протяжении долгого периода это может спровоцировать развитие рака [17]. В ряде исследований были обнаружены ассоциации между полиморфизмом гена *XRCC3* и риском развития рака легкого [5, 8].

Таблица 1

Распределение генотипов полиморфных вариантов генов *ATM*, *NBS1*, *XRCC2*, *XRCC3* и *p53* в обследованных группах (оба пола)

| Ген | Генотип | Больные раком легкого, абс. (%) | Здоровые лица, абс. (%) | χ^2 (p) |
|--------------------------|---------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| <i>ATM</i> Asp1853Asn | Asp/Asp | 291 (75,98) | 246 (75,92) | 0,01 (0,9427) |
| | Asp/Asn | 81 (21,14) | 71 (21,91) | 0,02 (0,8770) |
| | Asn/Asn | 11 (2,89) | 7 (2,17) | 0,13 (0,7197) |
| <i>NBS1</i> Glu185Gln | Glu/Glu | 154 (43,13) | 108 (36,48) | 2,71 (0,0998) |
| | Glu/Gln | 170 (47,61) | 165 (55,74) | 3,96 (0,0467)* |
| | Gln/Gln | 33 (9,26) | 23 (7,78) | 0,28 (0,5968) |
| <i>XRCC2</i> Arg188His | Arg/Arg | 231 (86,51) | 228 (82,6) | 1,30 (0,2542) |
| | Arg/His | 35 (13,10) | 45 (16,3) | 0,86 (0,3527) |
| | His/His | 1 (0,39) | 3 (1,54) | 0,22 (0,6393) |
| <i>XRCC3</i> Thr241Met | Thr/Thr | 117 (43,02) | 139 (49,83) | 2,30 (0,1295) |
| | Thr/Met | 114 (41,91) | 111 (39,78) | 0,18 (0,6737) |
| | Met/Met | 41 (15,07) | 29 (10,39) | 2,31 (0,1283) |
| <i>p53</i> Arg72Pro | Arg/Arg | 116 (42,49) | 113 (40,94) | 0,06 (0,8060) |
| | Arg/Pro | 143 (52,38) | 142 (51,44) | 0,01 (0,9291) |
| | Pro/Pro | 14 (5,13) | 20 (7,62) | 0,75 (0,3879) |

* $p < 0,05$ отличается от группы сравнения с аналогичным генотипом.

Таблица 2

Распределение генотипов генов ATM, NBS1, XRCC2, XRCC3, p53 в группах обследованных мужчин Кемеровской области

| Ген | Генотип | Больные раком легкого, абс. (%) | Здоровые лица, абс. (%) | χ^2 (p) |
|-----------------|---------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| ATM Asp1853Asn | Asp/Asp | 246 (75,00) | 198 (77,64) | 0,42 (0,5182) |
| | Asp/Asn | 73 (22,25) | 50 (19,6) | 0,46 (0,4996) |
| | Asn/Asn | 9 (2,75) | 7 (2,76) | 0,06 (0,7990) |
| NBS1 Glu185Gln | Glu/Glu | 133 (43,60) | 95 (38,61) | 1,20 (0,2735) |
| | Glu/Gln | 139 (45,57) | 132 (53,65) | 3,25 (0,0716) |
| | Gln/Gln | 33 (10,83) | 19 (7,74) | 1,19 (0,2760) |
| XRCC2 Arg188His | Arg/Arg | 204 (86,44) | 187 (83,11) | 0,75 (0,3865) |
| | Arg/His | 31 (13,13) | 35 (15,55) | 0,17 (0,6768) |
| | His/His | 1 (0,43) | 3 (1,33) | 0,30 (0,5821) |
| XRCC3 Thr241Met | Thr/Thr | 99 (40,90) | 115 (50,43) | 3,92 (0,0476)* |
| | Thr/Met | 105 (43,38) | 92 (40,35) | 0,33 (0,5663) |
| | Met/Met | 38 (15,72) | 21 (9,22) | 3,94 (0,0473)* |
| p53 Arg72Pro | Arg/Arg | 101 (42,43) | 98 (42,98) | 0,00 (0,9471) |
| | Arg/Pro | 124 (52,10) | 113 (49,56) | 0,17 (0,6835) |
| | Pro/Pro | 13 (5,47) | 16 (7,46) | 0,27 (0,6064) |

* $p < 0,05$ отличается от группы сравнения с аналогичным генотипом.

Анализ воздействия фактора курения не показал значимых отличий распределения генотипов между группами курящих и некурящих в изученных выборках больных РЛ и здоровых доноров. Следовательно, у доноров, не подверженных канцерогенному воздействию табачного дыма, определяющую роль в развитии РЛ начинают играть генетические факторы, которые могут существенно модифицировать индивидуальный онкориск [11, 19]. Полученные данные представляют существенный интерес для эпидемиологических исследований наследственной предрасположенности к развитию рака легкого.

Литература

60. Аксель Е.М., Давыдов М.И. Статистика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в 2000 году. М.: РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН, 2002. С. 85–106.
61. Гурцевич В.Э., Галецкий С.А., Неред С.Н. и др. Обнаружение и характеристика опухолей желудка, ассоциированных с вирусом герпеса Эпштейна–Барр // Вестник РАМН. 2000. № 3. С. 56–59.
62. Желтухин А.О., Чумаков П.М. Повседневные и индивидуальные функции гена p53 // Успехи биолог. химии. Т. 50. 2010. С. 447–516.
63. Чиссова В.В., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2008 году (заболеваемость и смертность). М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2010. 256 с.
64. Butkiewicz D., Rusin M., Enewold L. et al. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer // Carcinogenesis. 2001. V. 22 (4). P. 593–597.
65. Carney J.P., Maser R.S., Olivares H. et al. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen break syndrome: linkage of double strand break repair to cellular DNA damage response // Cell. 1998. V. 93. P. 477–486.
66. Cartwright R., Tambini C.E., Simpson P.J., Thacker J. The XRCC2 DNA repair gene from human and mouse encodes a novel member of the recA/RAD51 family // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 3084–3089.
67. David-Beabes G.L., Lunn R.M., London S.S. No association between the XPD (Lys751Gln) polymorphism or the XRCC3 (Thr241Met) polymorphism and lung cancer risk // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2001. V. 10. P. 911–912.
68. De Ruyck K., Szaumkessel M., De Rudder I. et al. Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk // Mutat Res. 2007. V. 28. P. 101–110.
69. Hofseth L.J., Saito S., Hussain S.O. et al. Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 143–148.
70. Goode E.L., Ulrich C.M., Potter J.D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002.
71. Jiao L., Hassan M.M., Bondy M.L. et al. XRCC2 and XRCC3 gene polymorphism and risk of pancreatic cancer // Am. J. Gastroenterol. 2008. V. 103 (2). P. 360–367.
72. Kitagawa R., Kastan M.B. The ATM-dependent DNA damage signaling // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2005. V. 70. P. 99–109.
73. Lan Q., Shen M., Berndt S.I. Smoky coal exposure, NBS1 polymorphisms, p53 protein accumulation, and lung cancer risk in Xuan Wei, China // Lung Cancer. 2005. V. 49 (3). P. 317–323.
74. Lavin M.F., Birrell G., Chen P. et al. ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage // Mutat Res. 2005. V. 569 (1–2). P. 123–132.
75. Lu J., Wei Q., Bondy M.L. et al. Polymorphisms and haplotypes of the NBS1 gene are associated with risk of sporadic breast cancer in non-Hispanic white women ≤ 55 years // Carcinogenesis. 2006. V. 27, № 11. P. 2209–2216.
76. Matullo G., Palli D., Peluso M. et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and 32P-DNA adducts in a sample of healthy subjects // Carcinogenesis. 2001. V. 22. P. 1437–1445.
77. Matsuura S., Kobayashi J., Tauchi H. et al. Nijmegen breakage syndrome and DNA double strand break repair by NBS1 complex // Adv. Biophys. 2004. V. 38. P. 65–80.
78. Mohrenweiser H.W., Jones I.M. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation // Mutat Res. 1998. V. 400. P. 15–24.
79. Platzer M., Rotman G., Bauer D. et al. Ataxia-telangiectasia locus: sequence analysis of 184 kb of human genomic DNA containing the entire ATM gene // Genome Res. 1997. V. 7 (6). P. 592–605.
80. Qian B., Zhang H., Zhang L. et al. Association of genetic polymorphisms in DNA repair pathway genes with non-small cell lung cancer risk // Lung Cancer. 2011. V. 73. P. 138–146.
81. Tuimala J. Inherited DNA repair capacity and individual responses to carcinogens // Department of Industrial Hygiene and Toxicology. Helsinki. 2004.
82. Varon R., Vissinga C., Platzer M. et al. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen break syndrome // Cell. 1998. V. 93. P. 467–476.

СОМАТИЧЕСКАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ВНУТРИОПУХОЛЕВОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н.А. Скрыбин^{1,3}, Е.В. Денисов^{2,3}, С.А. Васильев^{1,3}, В.М. Перельмутер², И.Н. Лебедев^{1,3}

¹ НИИ медицинской генетики СО РАМН, Томск

² НИИ онкологии СО РАМН, г. Томск

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

Теория эволюции Чарльза Дарвина изначально применялась для объяснения процессов видообразования. Однако впоследствии оказалось, что она может быть хорошей базой для анализа функционирования всех живых систем, в том числе и процессов злокачественной трансформации. В настоящее время показано, что солидные опухоли характеризуются значительной межиндивидуальной и, что более важно, внутриопухолевой генетической гетерогенностью. Так, Gerlinger и соавт. показали значительную степень внутриопухолевой гетерогенности по ploidy, хромосомным aberrациям и генным мутациям при раке почек [1]. Аналогичная картина наблюдается и при других солидных злокачественных новообразованиях, в том числе и при раке молочной железы [2–4].

Внутриопухолевая гетерогенность сама по себе является результатом микроразвиточных процессов, происходящих в опухолевой ткани, в результате которых наблюдается образование множества клонов клеток с уникальными «генофондами» и, соответственно, с разными фенотипическими характеристиками. Совокупность этих новообразованных клеток с клетками стромы и воспалительного инфильтрата образует своего рода «опухолевый биоценоз». Если учитывать, что на все клетки опухоли воздействуют еще абиотические факторы (температура, гипоксия, окислительный стресс и др.), то данная система может рассцениваться как полноценная самоорганизующаяся, саморегулирующаяся и саморазвивающаяся «микроразвиточная система», которая функционирует по тем же эволюционным механизмам, что и макроэкологическая система.

Сходство с макроэволюционными процессами усиливается тем, что формирование опухолевых клонов (субклонов) происходит за счет приобретения конкурентного преимущества в борьбе опухолевых клеток за ресурсы как с нормальными клетками организма, так и с другими опухолевыми клонами, что приводит к возникновению гетерогенных опухолевых клеток [5, 6].

В настоящее время под термином «опухолевая гетерогенность» принято подразумевать генетическую неоднородность неопластических клеток, однако изменения генома в той или иной степени отражаются на фенотипе, следовательно, можно отдельно рассматривать фенотипическую гетерогенность. Частным проявлением фенотипической разнородности является морфологическая гетерогенность опухолевых клеток молочной железы, которая проявляется в наличии различных типов структур инфильтративного компонента (морфологических или опухолевых структур): тубулярных, трабекулярных, солидных, альвеолярных структур и дискретных групп опухолевых клеток, которые отражают различные пространственные объединения клеток. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность изначально была описана для наиболее

часто встречающегося гистологического типа рака молочной железы – инвазивной карциномы неспецифического типа [7, 8]. Однако результаты различных исследований говорят о ее наличии и в других формах рака молочной железы [9–11].

Можно полагать, что разные типы морфологических структур выступают проявлением фенотипического разнообразия, в основе которого лежит совокупность специфических генетических различий, однако до настоящего момента не проводилась генетическая и цитогенетическая характеристика данных структур. Также невыясненными остаются следующие вопросы: сходны ли структуры одного типа в различных регионах опухоли по происхождению или они происходят независимо? Имеются ли специфические маркеры, характерные для определенных типов структур? В настоящей работе предпринята попытка найти ответы на поставленные вопросы с помощью молекулярно-цитогенетической характеристики каждого из типов структур с использованием матричной сравнительной геномной гибридизации на микрочипах высокого разрешения.

Материал и методы

В исследовании использовался операционный материал, полученный от одной больной раком молочной железы. Возраст пациентки на момент операции 56 лет, гистотип опухоли – инвазивная микропапиллярная карцинома, молекулярный подтип рака молочной железы – люминальный В. Исходя из поставленных задач, в настоящем исследовании акцент был сделан не на количестве пациентов, а на числе образцов из разных регионов одной опухоли, что позволило анализировать опухолевые клоны с различными кариотипами, возникшими на одинаковом генетическом и средовом фоне. В первичной опухоли были локализованы два региона, в каждом из которых с помощью лазерной микродиссекции (PALM, Carl Zeiss, Германия) были отобраны пять морфологических структур (тубулярные, трабекулярные, солидные, альвеолярные структуры и дискретные группы опухолевых клеток) (рис. 1). Кроме того, с помощью микродиссекции был получен метастатический материал из регионарного лимфатического узла для последующего его сравнительного молекулярно-цитогенетического анализа с образцами из различных участков первичной опухоли.

Полногеномная амплификация ДНК из полученных образцов проводилась с помощью наборов REPLI-g mini (Qiagen, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Анализ хромосомных aberrаций был проведен с помощью микрочипов компании Agilent Technologies (США). Пробоподготовка была проведена с использованием наборов Agilent Technologies (США) согласно протоколу фирмы-производителя. В работе были использованы микрочипы высокого разрешения 4×180К, каждый из которых содержит 170 334 олигонуклеотидные пробы

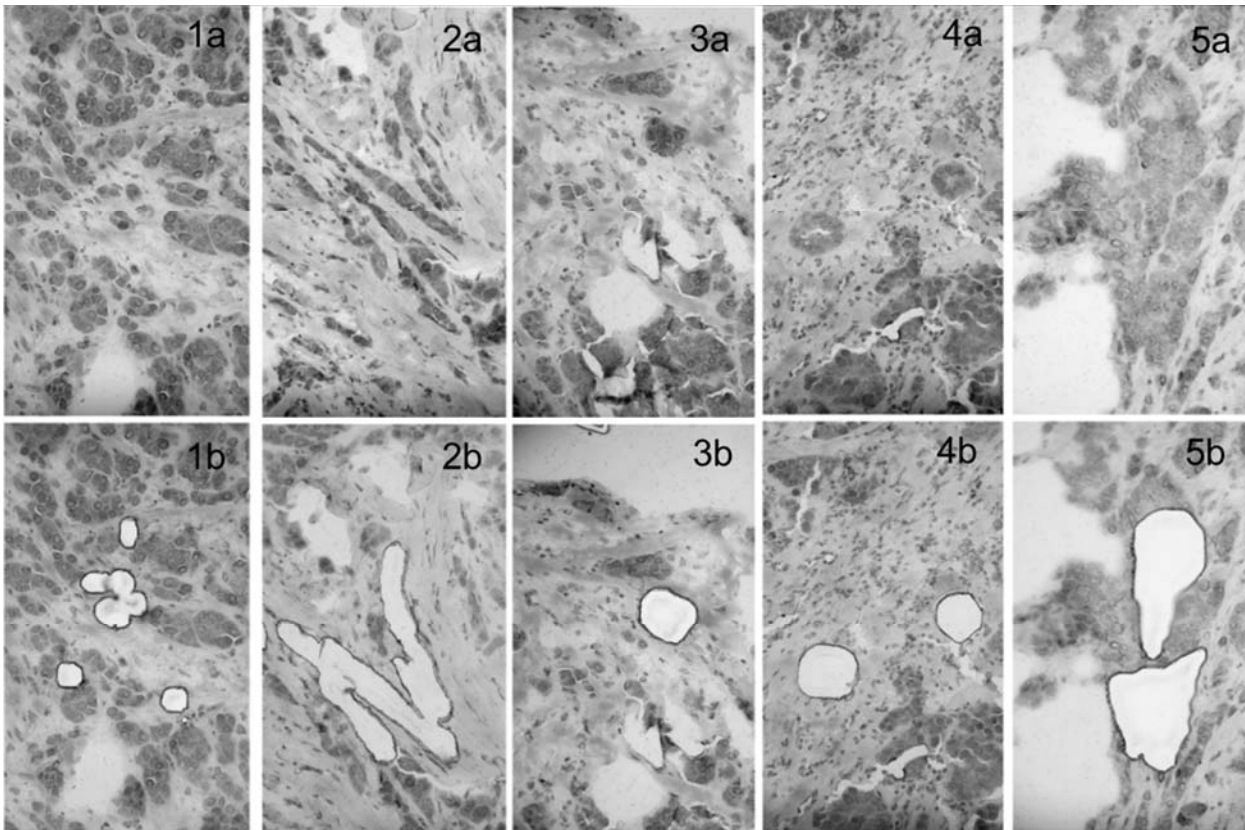


Рис. 1. Срезы до и после лазерной микродиссекции. 1а и 1b – дискретные группы опухолевых клеток, 2а и 2b – трабекулярные, 3а и 3b – альвеолярная, 4а и 4b – тубулярные, 5а и 5b – солидные структуры. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×200

на участки картированных генов или уникальных последовательностей генома (соответствующие 19-й сборке генома человека). Среднее расстояние между пробами составляет около 13 000 п.о. Для статистической обработки полученных результатов использовались методы кластерного и факторного анализа.

Результаты и обсуждение

Число выявленных несбалансированных хромосомных aberrаций в различных структурах и метастазе варьировало от 29 до 276. При этом наименьшее число перестроек обнаружено в тубулярных структурах, а наибольшее – в солидных (рис. 2).

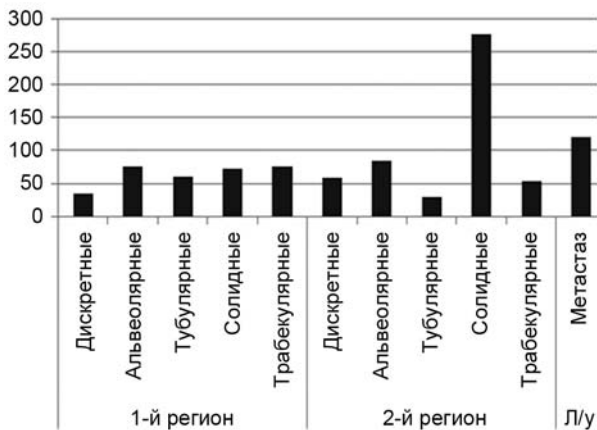


Рис. 2. Число несбалансированных хромосомных перестроек в исследованных образцах РМЖ

Сольидные структуры из второго региона и лимфогенный метастаз характеризовались значительно большим числом перестроек. Скорее всего, это является результатом высокого темпа мутирования клеток данных структур относительно клеток других структур. В свою очередь, это может быть следствием наличия в этих клетках «мутаторных» мутаций, которые приводят к высокому темпу мутирования через нарушение репаративных функций генома и (или) через повышение восприимчивости к повреждению ДНК различными экзогенными и эндогенными факторами [12]. Для поиска таких мутаций были проанализированы хромосомные aberrации, характерные только для солидных структур из второго региона и для локорегионарных метастазов. В ходе данного анализа обратили на себя внимание две амплификации, одна из которых затрагивала «страж генома» – ген онкосупрессорного белка *TP53* (рис. 3,а), а вторая – ген его ингибитора *MDM2* (рис. 3,б).

Перестройка, затрагивающая ген *TP53*, является амплификацией, т.е. увеличением генетического материала в данном регионе генома, что в большинстве случаев приводит к увеличению экспрессионной активности генов, входящих в такую перестройку. Однако в данном случае за счет того, что перестройка не полностью захватывает ген *TP53*, это может приводить к нарушению экспрессионной активности или к экспрессии неактивного белка. Физически эта перестройка может выглядеть как дупликация с точкой разрыва во внутригенном пространстве. В отличие от вышеуказанной aberrации амплификация, затрагивающая онкоген *MDM2* (ингибитор белка *TP53*), захватывает весь ген, при

этом в перестройку захватываются также регуляторные области гена. Следовательно, высока вероятность увеличения экспрессионной активности данного онкогена. Вышеуказанные две хромосомные aberrации вполне могут быть именно теми «мутаторными» мутациями, которые приводят к чрезвычайно высокому темпу мутирования клеток-носителей по отношению к клонам без этих мутаций. Это происходит за счет снижения экспрессии p53 и подавления его активности MDM2, вследствие чего в клетках может нарушаться работа контрольных точек клеточного цикла, что приводит к нарушению репарации возникающих повреждений ДНК.

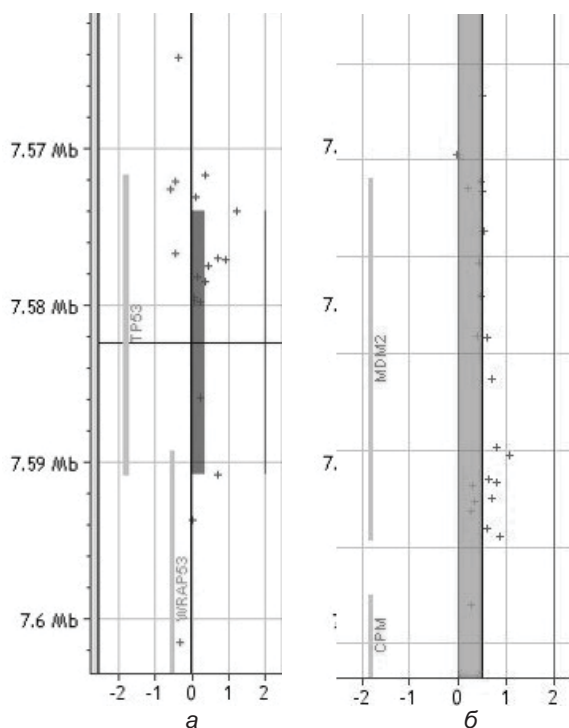


Рис. 3. Амплификация в субсегменте хромосомы 17p13.1, затрагивающая ген *TP53* (а); амплификация гена *MDM2* (б)

Кроме того, был проведен кластерный анализ исследуемых образцов по спектру хромосомных перестроек (рис. 4).

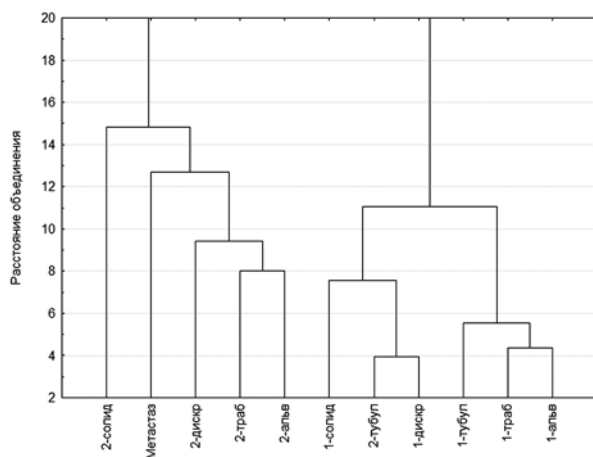


Рис. 4. Кластерный анализ по спектру хромосомных aberrаций: цифрами обозначены регионы опухоли

В результате данного анализа обнаружено, что разные типы структур в пределах одного и того же

региона опухоли более сходны по спектру хромосомных нарушений, чем одинаковые структуры в разных частях опухоли. Это указывает на то, что одинаковые типы структур могут формироваться на основе клонов, имеющих различное происхождение и кариотип. Кроме того, кластерный анализ показал, что метастаз в регионарном лимфатическом узле близок по спектру хромосомных нарушений к структурам из второго региона (наиболее близок к солидным и дискретным структурам). Однако при этом у образца из метастаза выявлено 72 хромосомные перестройки, специфические только для него.

Для поиска ответов на вопрос о взаимосвязях между различными структурами, а также для более глубокого понимания механизмов возникновения внутриопухолевой гетерогенности была проведена попытка построения филогенетического древа развития опухоли по последовательности накопления хромосомных мутаций (рис. 5,а,б). Ближе к корню древа расположены перестройки, характерные для всех структур в схеме, каждое ответвление представляет собой приобретение новой aberrации. Также в схеме представлены «фантомные» образцы, обозначенные вопросительными знаками, они являются недостающими звеньями, гипотетическими клетками, которые не попали в наше поле зрения, но без которых невозможно построение древа.

В ходе анализа были выявлены две мажорные мутации, характерные для нескольких образцов, – амплификации 2p22 (рис. 5,а) и 8q11-qter (рис. 5,б), соответственно, было построено два филогенетических древа. Здесь необходимо отметить то, что между этими двумя параллельными схемами возникли незначительные несовпадения по взаимосвязям между разными структурами. В любом случае результаты данного анализа также указывают на то, что морфологические структуры опухолевых клеток формируются в разных участках опухоли независимо, на фоне различных кариотипов. Параллельное, независимое формирование сходных морфологических структур в разных регионах опухоли на фоне различных кариотипов свидетельствует о том, что они возникают конвергентно. Возможно, формирование опухолевых структур определяется средой, т.е. клетки с различными кариотипами, образующие сходные структуры, относятся к одинаковым «экологическим гильдиям» – занимают одинаковые экологические ниши и обладают сходными функциями. Образование одинаковых структур происходит за счет изменения одних и тех же биохимических путей в клетке, при этом затрагиваемые гены или тип мутаций может быть абсолютно разным. Кроме того, немаловажную роль в этом могут играть функциональное состояние клеток и опухолевое микроокружение (модификации за счет сигналинга).

Также при построении филогенетического древа подтвердились результаты кластерного анализа, касающиеся близости метастаза к образцам из второго региона. Это указывает на то, что метастатический потенциал различных регионов опухоли значительно отличается. При этом лимфогенный метастаз, так же как и некоторые другие образцы из второго региона, характеризуется высоким количеством хромосомных перестроек, вероятно возникших из-за более высокого темпа мутирования.

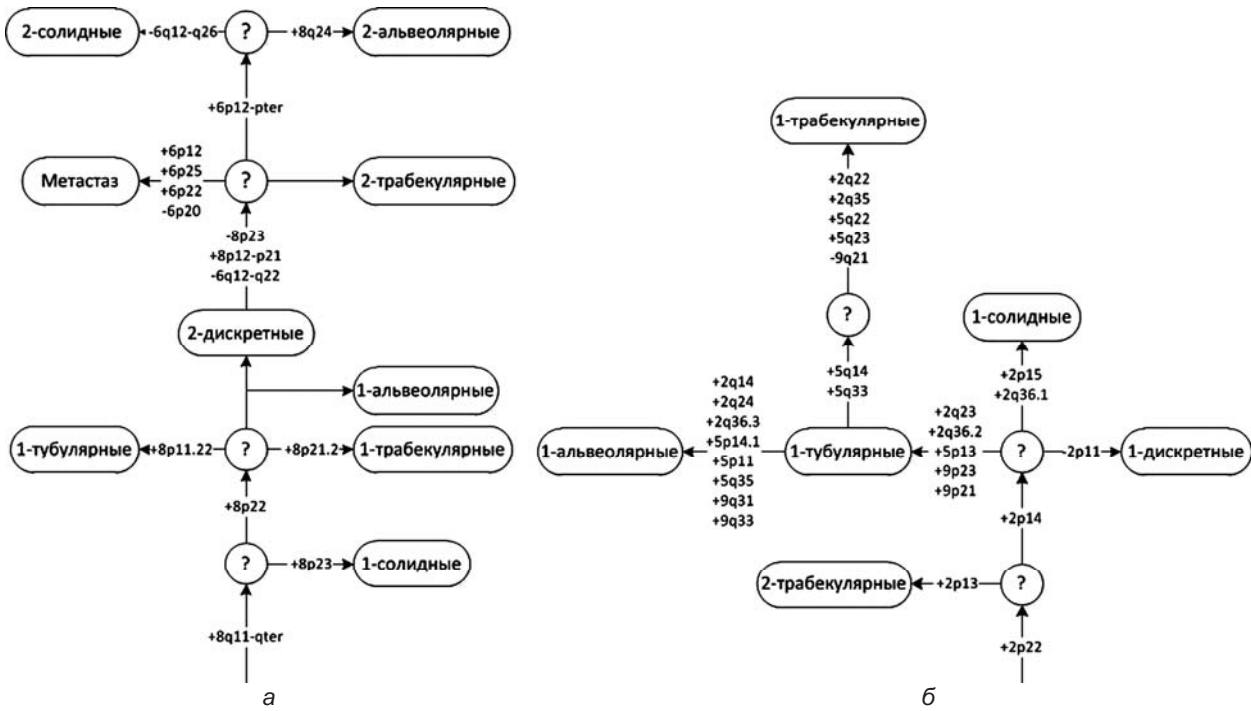


Рис. 5. Филогенетическое древо развития внутриопухолевой гетерогенности: а – амплификация 2p22; б – амплификация 8q11-qter

В целом результаты данного исследования указывают на то, что процесс возникновения внутриопухолевой гетерогенности поразительно сходен с процессом видообразования. Еще раз в этом можно убедиться, сравнив построенные филогенетические древа (рис. 5) и схему эволюционного древа видообразования из блокнота Ч. Дарвина (рис. 6). Проведя параллели между макроэволюцией биосферы и микроэволюцией опухолевых клеток, можно предположить о возможностях опухолевых клеток приспосабливаться к изменениям среды и о лабильности и одновременно стабильности «опухолевой экосистемы» в целом. Без понимания этих фундаментальных основ канцерогенеза мы никогда не сможем справиться с этим недугом.

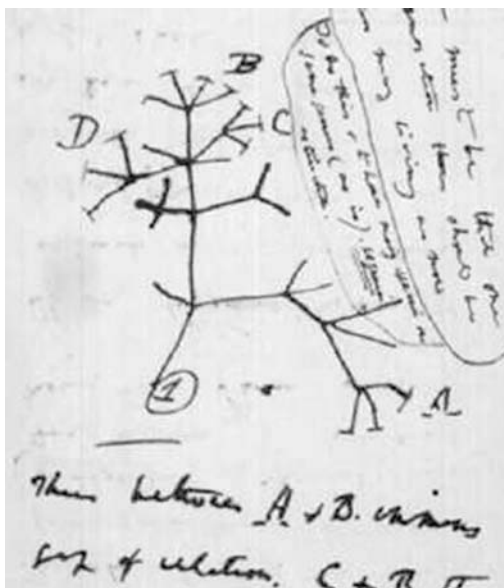


Рис. 6. Схема эволюционного древа видообразования из блокнота Ч. Дарвина

Литература

1. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing // N. Engl. J. Med. 2012. V. 366. P. 883–892.
2. Hernandez L., Wilkerson P.M., Lambros M.B. et al. Genomic and mutational profiling of ductal carcinomas in situ and matched adjacent invasive breast cancers reveals intra-tumour genetic heterogeneity and clonal selection // J. Pathol. 2012. V. 227 (1). P. 42–52.
3. Aparicio S., Caldas C. The Implications of Clonal Genome Evolution for Cancer Medicine // N. Engl. J. Med. 2013. V. 368. P. 842–851.
4. De Sousa E Melo F., Vermeulen L., Fessler E., Medema J.P. Cancer heterogeneity – a multifaceted view // EMBO Rep. 2013. V. 14 (8). P. 686–695.
5. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В. и др. Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение // Биохимия. 2013. Т. 78. С. 1531–1549.
6. Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Денисов Е.В. Основные достижения в фундаментальной онкологии в 2012 году // Практическая онкология. 2013. Т. 14 (1). С. 1–12.
7. Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Vtorushin S.V. et al. The presence of alveolar structures in invasive ductal NOS breast carcinoma is associated with lymph node metastasis // Diagn Cytopathol. 2013a. V. 41 (3). P. 279–282.
8. Zavyalova M.V., Denisov E.V., Tashireva L.A. et al. Phenotypic drift as a cause for intratumoral morphological heterogeneity of invasive ductal breast carcinoma not otherwise specified // BioResearch Open Access. 2013b. V. 2 (2). P. 148–154.
9. Nassar H., Wallis T., Andea A., Dey J., Adsay V. and Visscher D. Clinicopathologic analysis of invasive micropapillary differentiation in breast carcinoma // Mod. Pathol. 2001. V. 14. P. 836–841.
10. Sapino A., Bongiovanni M., Cassoni P. et al. Expression of CD31 by cells of extensive ductal in situ and invasive carcinomas of the breast // J. Pathol. 2001. V. 194. P. 254–261.
11. Walsh M.M. and Bleiweiss I.J. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: eighty cases of an underrecognized entity // Hum. Pathol. 2001. V. 32. P. 583–589.
12. Yates L.R., Campbell P.J. Evolution of the cancer genome // Nat. Rev. Genet. 2012. V. 13 (11). P. 795–806.

СОМАТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОМА ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

А.А. Слепцов^{1,2}, М.С. Назаренко^{1,2,3}¹ НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск³ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

В последнее время интенсивно накапливаются данные, свидетельствующие о заметном вкладе соматической мутационной изменчивости в этиологию не только злокачественных новообразований, но и других многофакторных заболеваний человека. Очевидно, что соматические изменения могут быть зарегистрированы на различных уровнях структурно-функциональной организации генома. Однако структура соматической мутационной изменчивости при различных формах патологии пока остается неясной.

Атеросклероз – хроническое воспалительное заболевание, которое сопровождается липидной инфильтрацией сосудистой стенки и аккумуляцией различных клеток, преимущественно гладкомышечных, лимфоцитов, макрофагов. В результате происходит образование атеросклеротических бляшек с прогрессирующим сужением просвета сосуда и нарушением кровотока. Несмотря на то что различные факторы риска действуют на организм в целом и способствуют развитию патологии, атеросклеротические изменения возникают в определенных сосудах. Патологический процесс преимущественно поражает артерии и очень редко вены. Однако даже в пределах артериального сосудистого русла патологический процесс имеет свои «излюбленные места». По частоте и медико-социальной значимости на первом месте находится атеросклероз коронарных артерий, а среди сосудов головного мозга чаще и тяжелее поражаются сонные артерии. Согласно одной из гипотез

различная подверженность к атеросклеротическому изменению тканей артериального русла и их отдельных регионов может быть обусловлена повреждениями генома клеток сосудистой стенки, накапливаемых с возрастом [1].

Открытие моноклональности гладкомышечных клеток послужило причиной рассмотрения формирования атеросклеротических бляшек с позиций неопластического процесса, когда серия соматических мутаций обуславливает селективную и неконтролируемую пролиферацию клеток [2]. Образование моноклональных очагов может быть объяснено несколькими механизмами: экспансией предсуществующего клона клеток, отбором специфической субпопуляции клеток (пролиферация, миграция и преимущество в выживании) или возникновении новых линий клеток через структурные и (или) эпигенетические изменения генома. Ключевым элементом данной гипотезы заключается в том, что в основе формирования атеросклеротической бляшки лежат мутационные события.

Основным мутагенным фактором для ДНК являются активные формы кислорода, концентрация которых возрастает в условиях окислительного стресса (рис. 1). Аккумуляция повреждений ДНК связана с нарушением системы репарации и продолжающимся воздействием повреждающих факторов. Геномная нестабильность может непосредственно влиять на функции клеток, приводить к остановке клеточного цикла и апоптозу или старению.

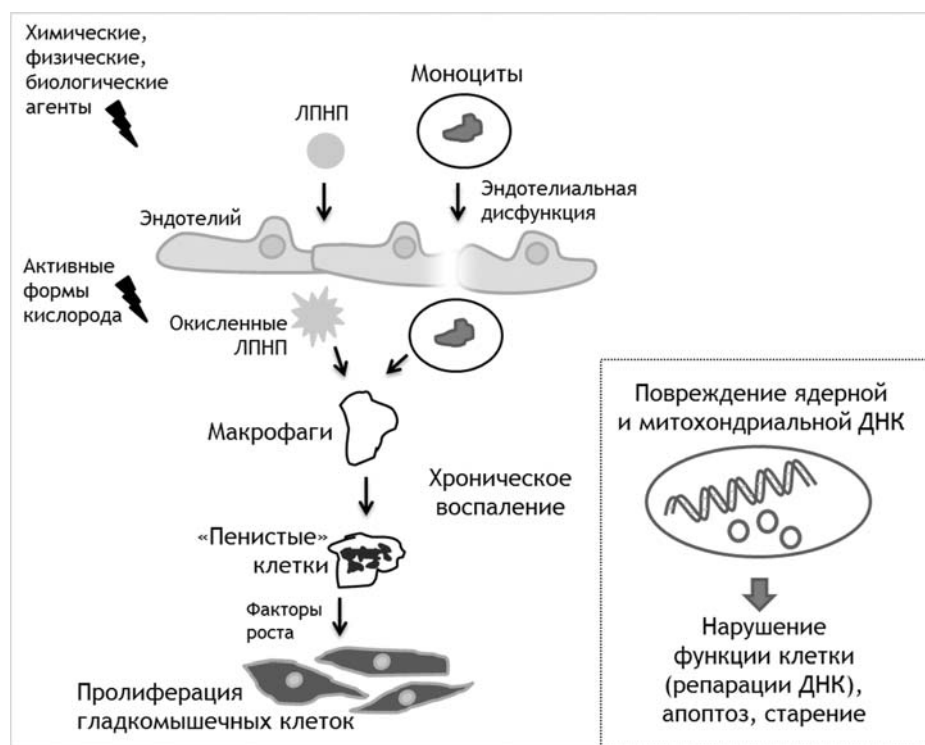


Рис. 1. Механизмы повреждения ДНК в тканях сосудистой стенки

В литературе имеются отдельные сообщения о разнообразных аномалиях кариотипа в гладкомышечных клетках сосудов с атеросклеротическими изменениями, полученные с использованием методов классической цитогенетики [3] и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) [4]. Однако изменение генетического материала в тканях при патологии описано менее детально по сравнению со злокачественными новообразованиями [5].

Цитогенетический анализ первичной культуры клеток, полученных из фиброзной атеросклеротической бляшки, выявил клональные хромосомные аномалии в 13 из 18 случаев. В 8 образцах зарегистрирована потеря Y-хромосомы и делеция 13q14, в 5 случаях детектировались разные клоны клеток с моносомией по Y-хромосоме и кариотипом XXУ, трисомией по хромосомам 10 и 18, моносомия по Y-хромосоме и трисомия по хромосоме 7. Различные единичные числовые и структурные хромосомные аномалии регистрировались в 16 случаях. Иммуноцитохимический анализ показал, что данные хромосомные aberrации характерны для гладкомышечных клеток атеросклеротической бляшки [3].

Наблюдение, что трисомия по хромосоме 7 является частой находкой в гладкомышечных клетках нестабильных атеросклеротических бляшек сонных артерий у взрослых, было подтверждено при использовании FISH-технологии на 21–23 образцах [4]. Кроме того, в них регистрировалась тетрасомия по 7-й и моносомия по 11-й хромосоме. Авторы предположили, что гены-кандидаты, локализованные на хромосоме 7, включают: *PDGFA* (ген тропоэластина), *AQP1/CHIP28* (гены синтазы оксида азота и EGF-рецептора), а на хромосоме 11: *ApoA-1/C-III/A-IV* (кластер генов, кодирующих аполипопротеины A1, C3 и A4). Исследование клеток стабильных атеросклеротических бляшек и неизмененных тканей сосудистой стенки с использованием FISH-технологии с ДНК-зондами, специфическими к центральному региону хромосом 7 и 11, не выявило аномалий. Еще одним интересным результатом исследования явилась детекция амплификации протоонкогена *FGF-3*, локализованного в локусе 11q13.3 [4].

К сожалению, ни одна из выявленных хромосомных аномалий не была достаточно частой, чтобы предположить патогенетический механизм или потенциальный маркер заболевания. Кроме того, FISH-анализ хромосомы 7 в атеросклеротических бляшках у детей и лиц молодого возраста не показал отклонений [6].

В клетках из области атеросклеротических бляшек различной локализации описаны феномены потери гетерозиготности (LOH) и микросателлитной нестабильности (MSI) по целому ряду локусов [7–13].

Впервые Hatzistamou и соавт. (1996) протестировали 30 образцов ДНК атеросклеротических бляшек по 18 микросателлитным маркерам, локализованным на 13 разных хромосомах. ДНК была выделена из атеросклеротических бляшек без значительной кальцификации и фиброобразования, а также из прилежащей неизмененной ткани сосудистой стенки. Из аорты получены 20 образцов и 10 из базилярной артерии головного мозга индивидов, погибших от инфаркта миокарда. LOH, по крайней мере, по одному маркеру, была выявлена в 23% случаев. Наибольший процент (14%) зарегистрирован в отношении маркера *MYC 8q*, тесно сцепленного с протоонкогеном *т.д.* Авторы предположили, что аллельный дисбаланс в отношении данного локуса

может быть связан с амплификацией гена, поскольку для атеросклеротических бляшек характерна гиперэкспрессия *т.д.* Микросателлитная нестабильность была выявлена среди 33% образцов и затрагивала от одного до трех маркеров [7].

В работе Spandidos и соавт. (1996) были изучены семь микросателлитных ДНК-маркеров. Характеристика образцов была аналогична таковой в исследовании Hatzistamou и соавт. (1996). Микросателлитная нестабильность выявлена в 20% случаев (главным образом по одному маркеру – 67%) [8].

Анализ был продолжен группой исследователей Kiaris и соавт. (1996). Авторы установили нестабильность 3'-микросателлитного региона *H-ras* протоонкогена в 17% образцов [9]. Интересно отметить, что ранее нарушение стабильности данного региона и aberrантная экспрессия *H-ras* гена были отмечены в тканях чешуйчатоклеточной карциномы головы и шеи, а также у спонтанных абортусов [14].

В работе Flouris и соавт. (2000) была использована панель из 19 микросателлитных маркеров. ДНК для исследования выделена из образцов атеросклеротических бляшек и прилежащих нормальных тканей сосудистой стенки аорты 50 погибших индивидов. Ткани с кальцификацией и фиброобразованием, выявленным при гистологическом анализе, в дальнейшем не анализировались. Аллельный дисбаланс, по крайней мере в одном локусе, был найден в 28% бляшек, а по двум локусам – в 8%. LOH в локусах генов мисматч-системы репарации ДНК (*hMSH2 2p22.3-p16.1*, *hPMS1 2q24.1-q32.1* и *hMLH1 3p21.32-p21.1*) составила 10, 10 и 12% соответственно [10].

Miniati и соавт. (2001) провели оценку LOH и MSI, используя панель из 25 микросателлитных ДНК-маркеров, в 27 атеросклеротических бляшках артерий головного мозга. «Потеря гетерозиготности» регистрировалась в локусах 8p12-q11.2 (48%) и 2p13-p21 (46%), а аллельный дисбаланс выявлен в 47% случаев. Кроме того, LOH отмечена в отношении локусов 17q21 (39%), 9q31-34 (31%) и 17p13 (27%) [11].

Группа итальянских исследователей проанализировали 39 микросателлитных ДНК-маркеров в лейкоцитах периферической крови и образцах атеросклеротических бляшек сонных артерий, полученных в результате эндартерэктомии, у 28 человек. Потеря гетерозиготности регистрировалась в 70% образцов: у 50% как минимум в одном локусе, 3,5% – двух локусах и 14,3% – в трех или более локусах. Процент LOH варьировал от 3,8 до 14,3%, причем наиболее существенный аллельный дисбаланс отмечался в отношении *NOS3* динуклеотидного повтора. Микросателлитная нестабильность выявлена в одном случае [12].

В работе греческих исследователей протестировано 63 микросателлитных ДНК-маркера. ДНК для анализа была выделена из 78 атеросклеротических бляшек и 33 гистологически нормальных образцов из аорты, а также из лейкоцитов периферической крови погибших индивидов. Группы сравнения соответствовали по полу и возрасту. Потеря гетерозиготности, по крайней мере одного локуса, определялась у 47,4 и 18,2% образцов в группе случая и контроля, соответственно ($OR = 4,06$, 95%-й CI 1,50–10,93). При сравнении образцов были установлены существенные изменения профилей микросателлитных ДНК-маркеров с LOH в отношении локусов 1p32-p31, 1q22-q25, 2q35 и 6p21.3, где картированы гены молекулы адгезии (*VCAM1*), селектина E (*SELE*), гена с преимущественной экспрессией в аорте (*APEG1*) и воспалительный фактор аллограф-

та (*AIF1*) соответственно [13]. Гены *VCAM1* и *SELE* экспрессируются эндотелиальными клетками при стимуляции цитокинами. Их белковые продукты обеспечивают адгезию лейкоцитов к сосудистой стенке. Функция *APEG1* заключается в дифференцировке гладкомышечных клеток сосудистой стенки. Увеличение экспрессии гена *aif1* у мыши с нокаутом *ApoE*^{-/-} связано с повышением фагоцитарной активности макрофагов и, возможно, модулирующим эффектом гладкомышечных клеток сосудов.

Мутация в полиадениновом участке рецептора трансформирующего ростового фактора β типа II (*TβRII*) является первым примером соматической мутации, обнаруженной в клетках атеросклеротических бляшек человека [15]. Она регистрировалась как в первичных, так и рестенозированных атеросклеротических бляшках коронарных артерий и приводила к потере ингибирования роста клеток. В последующих работах установлена очень низкая частота данной мутации в бляшках коронарных артерий и аорты [16, 17]. В связи с этим она не может считаться важной детерминантой атеросклеротического поражения.

Повреждения ДНК в виде разрывов и модификаций, образования микроядер также выявлены в атеросклеротических бляшках [18]. Не менее важным событием в патогенезе заболевания является дисфункция теломер, укорочение которых обнаружено в гладкомышечных и эндотелиальных клетках сосудов, пораженных атеросклерозом [19].

Кроме изменений ядерного генома соматические мутации выявлены в митохондриальной ДНК (мтДНК) клеток атеросклеротических бляшек. Делеция 4 977 п.н., которая часто регистрируется в мтДНК больных с дегенеративными нарушениями, обнаружена с низкой частотой в гладкомышечных клетках атеросклеротических бляшек аорты у больных с аневризмой. Причем у лиц старше 72 лет ее частота была выше по сравнению с более молодыми индивидами [20]. Количественный анализ 40 точковых мутаций мтДНК в атеросклеротических бляшках аорты выявил связь десяти из них в генах 12S рРНК, лейцин тРНК (кодон узнавания UUR), лейцин тРНК (кодон узнавания CUN), 1, 2, 5 и 6 субъединиц НАДФ-дегидрогеназы и цитохрома b с патологией [21]. Гомогенаты из бляшек аорты существенно отличались от неизмененных тканей по среднему уровню гетероплазмии мутаций A1555G, C3256T, T3336C, G13513A и G15059A [22]. В работе других исследователей установлено, что мутация мтДНК A3243G может быть маркером атеросклероза и сахарного диабета 2-го типа [23].

Таким образом, атеросклеротическое поражение артерий сопровождается разнообразными структурными изменениями как ядерного, так и митохондриального геномов. Не исключено, что использование современных микрочиповых технологий высокоразрешающего картирования микроструктурных перестроек и потери гетерозиготности по всему геному в рамках одного эксперимента (матричная сравнительная геномная гибридизация, агау-CGH), а также метода секвенирования следующего поколения (Next-generation sequencing, NGS) позволит сформировать более цельное представление о частоте и спектре соматической изменчивости генома при атеросклерозе. В результате планируется идентифицировать новые патофизиологические пути и специфические мишени для профилактики, диагностики и лечения патологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ «Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований отдельными научными группами» по теме «Постзиготическая вариабельность ядерного и митохондриального геномов при атеросклеротическом поражении сосудов человека» (соглашение № 14-15-00305).

Литература

1. Martin G.M. Stochastic modulations of the pace and patterns of ageing: impacts on quasi-stochastic distributions of multiple geriatric pathologies // *Mech Ageing Dev.* 2012. V. 133, № 4. P. 107–111.
2. Benditt E.P., Benditt J.M. Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1973. V. 70, № 6. P. 1753–1756.
3. Casalone R., Granata P., Minelli E. et al. Cytogenetic analysis reveals clonal proliferation of smooth muscle cells in atherosclerotic plaques // *Hum. Genet.* 1991. V. 87, № 2. P. 139–143.
4. Matturri L., Cazzullo A., Turconi P. et al. Chromosomal alterations in atherosclerotic plaques // *Atherosclerosis.* 2001. V. 154, № 3. P. 755–761.
5. Andreassi M.G., Botto N. DNA damage as a new emerging risk factor in atherosclerosis // *Trends Cardiovasc Med.* 2003. V. 13, № 7. P. 270–275.
6. Lavezzi A.M., Ottaviani G., Matturri L. Biology of the smooth muscle cells in human atherosclerosis // *APMIS.* 2005. V. 113, № 2. P. 112–121.
7. Hatzistamou J., Kiaris H., Ergazaki M. et al. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in human atherosclerotic plaques // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 225, № 1. P. 186–190.
8. Spandidos D.A., Ergazaki M., Arvanitis D. et al. Microsatellite instability in human atherosclerotic plaques // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 220, № 1. P. 137–140.
9. Kiaris H., Hatzistamou J., Spandidos D.A. Instability at the H-ras minisatellite in human atherosclerotic plaques // *Atherosclerosis.* 1996. V. 125, № 1. P. 47–51.
10. Flouris G.A., Arvanitis D.A., Parissis J.T. et al. Loss of heterozygosity in DNA mismatch repair genes in human atherosclerotic plaques // *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 2000. V. 4, № 1. P. 62–65.
11. Miniati P., Sourvinos G., Michalodimitrakis M. et al. Loss of heterozygosity on chromosomes 1, 2, 8, 9 and 17 in cerebral atherosclerotic plaques // *Int. J. Biol. Markers.* 2001. V. 16, № 3. P. 167–171.
12. Grati F.R., Ghilardi G., Sirchia S.M. et al. Loss of heterozygosity of the NOS3 dinucleotide repeat marker in atherosclerotic plaques of human carotid arteries // *Atherosclerosis.* 2001. V. 159, № 2. P. 261–267.
13. Arvanitis D.A., Flouris G.A., Spandidos D.A. Genomic rearrangements on *VCAM1*, *SELE*, *APEG1* and *AIF1* loci in atherosclerosis // *J. Cell. Mol. Med.* 2005. V. 9, № 1. P. 153–159.
14. Kiaris H., Ergazaki M., Spandidos D.A. Instability at the H-ras minisatellite is associated with the spontaneous abortion of the embryo // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 214, № 3. P. 788–792.
15. McCaffrey T.A., Du B., Consigli S. et al. Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells // *J. Clin. Invest.* 1997. V. 100, № 9. P. 2182–2188.
16. Bobik A., Agrotis A., Kanellakis P. et al. Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development // *Circulation.* 1999. V. 99, № 22. P. 2883–2891.
17. Clark K.J., Cary N.R., Grace A.A. et al. Microsatellite mutation of type II transforming growth factor-beta receptor is rare in atherosclerotic plaques // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001. V. 21, № 4. P. 555–559.
18. De Flora S., Izzotti A. Mutagenesis and cardiovascular diseases. Molecular mechanisms, risk factors, and protective factors // *Mutat. Res.* 2007. V. 621, № 1–2. P. 5–17.

19. Wang J.C., Bennett M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence // *Circ Res*. 2012. V. 111, № 2. P. 245–259.
20. Bogliolo M., Izzotti A., De Flora S. et al. Detection of the '4977 bp' mitochondrial DNA deletion in human atherosclerotic lesions // *Mutagenesis*. 1999. V. 14, № 1. P. 77–82.
21. Sazonova M., Budnikov E., Khasanova Z. et al. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome // *Atherosclerosis*. 2009. V. 204, № 1. P. 184–190.
22. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Postnov A.Y. et al. Mitochondrial mutations are associated with atherosclerotic lesions in the human aorta // *Clin. Dev. Immunol.* 2012. V. 2012. P. 832464.
23. Nomiya T., Tanaka Y., Piao L. et al. Accumulation of somatic mutation in mitochondrial DNA and atherosclerosis in diabetic patients // *Ann. N Y Acad. Sci.* 2004. V. 1011. P. 193–204.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ХРОСОМНЫЕ АБЕРРАЦИИ У ЖИТЕЛЕЙ КУЗБАССА, БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Р.А. Титов, Ю.Е. Кулемин, М.Л. Баканова, В.И. Минина

Институт экологии человека СО РАН, г. Кемерово

Введение

Рак легкого (РЛ) – одно из самых распространенных онкологических заболеваний. По статистическим данным, заболеваемость РЛ в России и в мире постоянно растет, опережая все другие виды онкопатологий [1].

При употреблении алкоголя, курении, воздействии ионизирующей радиации или приеме гормональных препаратов образуется большое количество активных форм кислорода (АФК). АФК вызывают окислительное повреждение ДНК, приводя к мутациям и изменению функции генов, а также могут индуцировать экспрессию множества транскрипционных факторов, участвующих в неопластической трансформации клеток [2]. Антиоксидантная система является важным компонентом противоопухолевой защиты и, следовательно, полиморфные варианты в генах антиоксидантной системы могут определять индивидуальную восприимчивость к развитию РЛ.

Рядом исследований показано, что полиморфизмы генов антиоксидантной системы служат факторами риска развития РЛ [3–5]. Однако результаты исследований ассоциаций этих генов во многом противоречивы: полиморфизм одних генов четко коррелирует с высоким риском развития рака легкого, полиморфизм других наоборот ассоциируется с его понижением, а полиморфизм третьих несут незначительный эффект [6, 7]. Согласно результатам некоторых эпидемиологических исследований у европеоидов генотип ТТ гена *hGPX1* ассоциирован с риском возникновения РЛ [8, 9], а у азиатов не было обнаружено никаких ассоциаций [10, 11]. Генотипы СТ и ТТ гена *CAT* ассоциированы с раком груди и другими патологиями у европеоидов [12].

Другим важным фактором риска развития РЛ является формирование определенного базового уровня частоты хромосомных нарушений. Уровень хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека является важной количественной характеристикой генотоксического воздействия окружающей среды [13–15].

Актуальным является изучение подобных ассоциаций у жителей Кемеровской области – промышленно развитого региона, где выбросы угледобывающей, углеперерабатывающей, химической промышленности и энергетики оказывают существенное негативное влияние на здоровье населения. Поиск генетических маркеров повышенной чувствительности к действию канцерогенов может иметь не

только теоретическое, но и практическое значение (например, для рабочих канцерогеноопасных производств или населения, проживающего на потенциально опасных территориях – вблизи мест залегания урана, тяжелых металлов, радона).

Цель работы – изучить полиморфизм генов *hGPX1* и *CAT* и уровень хромосомных aberrаций у больных раком легкого и условно здоровых жителей Кемеровской области.

Материал и методы

В исследование включено 152 больных, поступивших (первично) на лечение в Кемеровский областной клинический онкологический диспансер. Пациенты на момент забора материала не получали химиотерапевтического или радиологического лечения. Диагноз верифицировался позднее по результатам клинического, эндоскопического и морфологического обследований. В качестве популяционного контроля использовали выборку 147 условно здоровых лиц (без онкологических заболеваний), проживающих в г. Кемерово. Работа соответствует стандартам биоэтического комитета, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266.

Для изучения полиморфизма генов репарации ДНК из лейкоцитов периферической крови выделяли ДНК методом фенол-хлороформной экстракции и анализировали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. Генотипирование полиморфных маркеров проводили методами: ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени для замены С –200 Т гена *hGPX1* и набора реактивов производства ООО «СибДНК» (г. Новосибирск); метода «SNP-экспресс» и набора реактивов, разработанного НПФ «Литех» (г. Москва) для замены С –262 Т гена *CAT*.

Генотоксические эффекты в лимфоцитах крови изучали с помощью метода учета хромосомных aberrаций в кратковременных культурах лимфоцитов периферической крови. Учет хромосомных aberrаций на зашифрованных препаратах проводили без кариотипирования. Отбор метафаз, включаемых в анализ, и критерии для регистрации цитогенетических нарушений соответствовали общепринятым рекомендациям.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 6.0. С помощью критерия Колмогорова–Смирнова оценивали отличия распределения генеральной совокупности от нормального. При сравнении частот генотипов применяли стандартный критерий χ^2 Пирсона. При условии, когда объем выборки не превышал 10 случаев, использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса (Y), когда объем выборки не превышал 5 случаев – F-критерий Фишера. Все оценки групповых частот аббераций были получены в результате усреднения индивидуальных частот для лиц с данным генотипом. Соответствующие ошибки отражали внутригрупповую изменчивость частот аббераций (т.е. не вычислялись через суммарное число проанализированных клеток для группы с данным генотипом). Для межгрупповых сравнений частот аббераций использовался U-критерий Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что в изученных выборках распределения частот аллелей и генотипов изученных полиморфных маркеров не имели отклонений от равновесия Харди–Вайденберга.

Из полученных результатов видно, что наблюдается тенденция к увеличению частот гетерозигот (55,3% у больных РЛ против 45,6% у здоровых) и гомозигот по минорному аллелю гена *hGPX1* (9,4% у больных РЛ против 6,1% у здоровых) у больных РЛ, которые, однако, не достигали статистической значимости (табл. 1). *GPX1* является селензависимым ферментом, который участвует в детоксикации перекиси водорода и играет важную роль в защите клеток от окислительного стресса, индуцированного активными формами кислорода [16]. Однуклеотидная замена С на Т – второго нуклеотида в кодоне 200 гена *hGPX1* приводит к замене аминокислот – пролина (Pro) на лейцин (Leu). Эта замена снижает активность фермента [17].

В исследовании не было обнаружено ассоциаций между *CAT* –262 С>Т полиморфизмом и РЛ. *CAT* – это фермент, который присутствует в перок-

сисомах почти всех аэробных клеток. Каталаза преобразует перекись водорода в воду и кислород и тем самым уменьшает токсическое действие перекиси водорода.

Таблица 1

Распределение генотипов генов *hGPX1* и *CAT1* в группах обследованных жителей Кемеровской области (оба пола)

| Ген | Генотип | Больные РЛ, абс. (%) | Здоровые, абс. (%) | χ^2 | p |
|-------------|---------|----------------------|--------------------|----------|--------|
| <i>hGPX</i> | СС | 53 (35,3) | 71 (48,3) | 3,46 | 0,0629 |
| | СТ | 83 (55,3) | 67 (45,6) | 2,45 | 0,1176 |
| | ТТ | 14 (9,4) | 9 (6,1) | 0,67 | 0,4134 |
| <i>CAT</i> | СС | 89 (58,5) | 89 (60,6) | 0,05 | 0,8158 |
| | СТ | 53 (34,0) | 50 (34,0) | 0,001 | 0,9730 |
| | ТТ | 10 (7,5) | 8 (5,4) | 0,03 | 0,8650 |

При разделении исследуемых групп по половой принадлежности были получены статистически значимые различия по гену *hGPX1* у мужчин: частота генотипа СС у здоровых составила 50%, что в 1,4 раза выше, чем у больных РЛ, – 36,6% ($\chi^2 = 4,53$, $p = 0,0333$) (табл. 2).

Таблица 2

Распределение генотипов генов *hGPX1* и *CAT* в группах обследованных мужчин Кемеровской области

| Ген | Генотип | Больные РЛ, абс. (%) | Здоровые, абс. (%) | χ^2 | p |
|-------------|---------|----------------------|--------------------|----------|--------|
| <i>hGPX</i> | СС | 49 (36,6) | 71 (50,0) | 4,53 | 0,03 |
| | СТ | 71 (53,0) | 62 (42,7) | 2,04 | 0,1531 |
| | ТТ | 14 (10,4) | 9 (6,3) | 1,03 | 0,3093 |
| <i>CAT</i> | СС | 79 (58,5) | 84 (59,2) | 0,001 | 0,9884 |
| | СТ | 46 (34,1) | 50 (35,2) | 0,01 | 0,9422 |
| | ТТ | 10 (7,4) | 8 (5,6) | 0,13 | 0,7228 |

Полученные частоты встречаемости генотипов генов *hGPX1* и *CAT* в контрольной группе не отличаются от опубликованных ранее данных для представителей европеоидной расы, проживающих в США и Новой Зеландии [17–19], однако частоты встречаемости генотипов ТТ гена *hGPX1* статистически значимо отличались от таковых у жителей Финляндии [20] (табл. 3).

Таблица 3

Частоты встречаемости генотипов генов антиоксидантной системы у здоровых людей

| Ген | Популяция | Генотип | Популяционный контроль, абс. (%) | χ^2 | p | Публикации |
|--------------|-----------------------------|---------|----------------------------------|----------|--------|------------|
| <i>hGPX1</i> | Европеоиды (США) | СС | 85 (52,0) | 0,21 | 0,6501 | [18] |
| | | СТ | 58 (35,0) | 3,10 | 0,0784 | |
| | | ТТ | 22 (13,0) | 3,75 | 0,0529 | |
| | Европеоиды (США) | СС | 704 (50,6) | 0,20 | 0,6553 | [17] |
| | | СТ | 578 (41,6) | 0,73 | 0,3938 | |
| | | ТТ | 109 (7,8) | 0,34 | 0,5623 | |
| | Европеоиды (Новая Зеландия) | СС | 216 (48,7) | 0,04 | 0,8502 | [19] |
| | | СТ | 186 (42,8) | 0,25 | 0,6171 | |
| | | ТТ | 33 (7,6) | 0,17 | 0,6828 | |
| | Европеоиды (Финляндия) | СС | 132 (42,0) | 1,28 | 0,2571 | [20] |
| | | СТ | 135 (43,0) | 0,15 | 0,6947 | |
| | | ТТ | 46 (15,0) | 6,14 | 0,0132 | |
| <i>CAT</i> | Европеоиды (Новая Зеландия) | СС | 258 (59,5) | 0,02 | 0,8909 | [19] |
| | | СТ | 160 (36,9) | 0,50 | 0,4794 | |
| | | ТТ | 16 (3,7) | 0,47 | 0,4936 | |
| | Европеоиды (США) | СС | 885 (63,1) | 0,27 | 0,6063 | [17] |
| | | СТ | 461 (32,9) | 0,04 | 0,8483 | |
| | | ТТ | 57 (4,1) | 0,33 | 0,5635 | |

Таблица 4

Качественный спектр цитогенетических нарушений у обследованных людей

| Группа | Число клеток | Число aberrаций на 100 клеток, % | | | |
|------------|--------------|----------------------------------|---------------|--------------|-------------|
| | | Фрагменты | | Обмены | |
| | | одиночные | парные | хроматидные | хромосомные |
| Больные РЛ | 152 | 2,64 ± 0,15* | 0,26 ± 0,04** | 2,66 ± 0,15* | 0,46 ± 0,06 |
| Здоровые | 142 | 0,97 ± 0,07 | 0,31 ± 0,03 | 0,93 ± 0,07 | 0,36 ± 0,04 |

* $p = 0,00001$.** $p = 0,0131$

Таблица 5

Влияние полиморфизма генов антиоксидантной системы на уровень хромосомных aberrаций у больных РЛ

| Ген | Генотип | Доля aberrантных метафаз, % | Aberrации хроматидного типа, % | Aberrации хромосомного типа, % |
|--------------|---------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>hGPX1</i> | CC | 2,9 ± 0,3 | 2,4 ± 0,3 | 0,5 ± 0,1 |
| | CT | 3,2 ± 0,2 | 2,8 ± 0,2 | 0,7 ± 0,08 |
| | TT | 3,5 ± 0,6 | 2,8 ± 0,5 | 0,9 ± 0,2* |
| <i>CAT</i> | CC | 3 ± 0,2 | 2,6 ± 0,2 | 0,4 ± 0,08 |
| | CT | 3,2 ± 0,3 | 2,7 ± 0,2 | 0,55 ± 0,1 |
| | TT | 3,3 ± 0,5 | 3,0 ± 0,5 | 0,3 ± 0,1 |

* $p = 0,0447$.

Таблица 6

Влияние полиморфизма генов антиоксидантной системы на уровень хромосомных aberrаций у относительно здоровых людей Кемеровской области

| Ген | Генотип | Доля aberrантных метафаз, % | Aberrации хроматидного типа, % | Aberrации хромосомного типа, % |
|--------------|---------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>hGPX1</i> | CC | 1,3 ± 0,1 | 0,8 ± 0,07* | 0,4 ± 0,07 |
| | CT | 1,3 ± 0,1 | 1,3 ± 0,1 | 0,3 ± 0,06 |
| | TT | 1,4 ± 0,5 | 1,3 ± 0,6 | 0,2 ± 0,2 |
| <i>CAT</i> | CC | 1,3 ± 0,1 | 1,0 ± 0,1 | 0,4 ± 0,06 |
| | CT | 1,3 ± 0,1 | 0,9 ± 0,1 | 0,3 ± 0,06 |
| | TT | 1,2 ± 0,3 | 0,7 ± 0,2 | 0,6 ± 0,2 |

* $p = 0,007$.

На следующем этапе был проведен анализ хромосомных нарушений, в результате которого было зафиксировано статистически значимое повышение частоты aberrантных метафаз у больных РЛ по сравнению с относительно здоровыми жителями Кемеровской области ((3,3 ± 0,2)% у больных РЛ к (2,5 ± 0,2)% у относительно здоровых).

Частоты отдельных типов aberrаций в исследуемых выборках представлены в табл. 4. Очевидно, что общее увеличение частоты aberrаций в группе больных РЛ по сравнению с контролем достигается за счет одиночных фрагментов: (2,64 ± 0,15) и (0,9 ± 0,07)% соответственно ($p < 0,05$). В исследованной группе также наблюдается статистически значимое увеличение частоты обменов хроматидного типа ((2,66 ± 0,13) и (0,93 ± 0,07)%).

Затем было проверено влияние полиморфизма генов антиоксидантной системы на уровень хромосомных aberrаций. Для этого был проведен сравнительный анализ, результаты которого представлены в табл. 5, 6.

В результате исследования было обнаружено влияние генотипа TT гена *hGPX1* на уровень ХА у больных РЛ. Генотип TT гена *hGPX1* ассоциирован с повышением частоты aberrаций хромосомного типа у больных раком легких ($p = 0,0447$). Снижение эффективности детоксикации перекиси водорода приводит к увеличению числа нарушений структуры ДНК, которое сопровождается ростом числа aberrаций.

Затем был рассмотрен уровень хромосомных aberrаций у здоровых жителей Кемеровской области. Из полученных результатов видно, что носители генотипа CC гена *hGPX1* имеют наименьшую частоту aberrаций хроматидного типа по сравнению с носителями других генотипов ($p = 0,007$).

Генотип CC гена *hGPX1* является мажорным, обеспечивает эффективную работу фермента в детоксикации перекиси водорода, которая снижает количество нарушений структуры ДНК от АФК, что сопровождается снижением количества aberrаций.

Выводы

1. Частота аллелей и генотипов *hGPX1* и *CAT* у здоровых жителей Кемеровской области соответствует данным литературы по частоте этих генов у представителей белой расы (европеоидов).

2. Установлено статистически значимое различие частоты встречаемости генотипов гена *hGPX1* в группах больных РЛ и здоровых мужчин Кемеровской области.

3. В группе больных раком легкого частота хромосомных aberrаций статистически значимо больше у людей с генотипом TT гена *hGPX1*, чем у носителей других генотипов данного гена.

4. В группе контроля частота хромосомных aberrаций статистически значимо ниже у людей с генотипами CC гена *hGPX1*, чем у носителей других генотипов данного гена.

Литература

1. Трахтенберг А.Х., Чиссов В.Ч. Клиническая онкопутьмонология. М.: ГЭОТАР медицина, 2000. 600 с.
2. Wei H. Activation of oncogenes and/or inactivation of anti-oncogenes by reactive oxygen species // *Med. Hypotheses*. 1992. V. 39 (3). P. 267–270.
3. Shields P.G., Harris C.C. Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions // *J. Clin. Oncol.* 2000. V. 18. P. 2309–2315.
4. Goode E.L., Ulrich C.M., Potter J.D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002. V. 11. P. 513–530.
5. Mohrenweiser H.W., Jones I.M. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation // *Mutat Res.* 1998. V. 400. P. 15–24.
6. Julia A., Knight U., Venus O. et al. Genetic Variants of GPX1 and SOD2 and Breast Cancer Risk at the Ontario Site of the Breast Cancer Family Registry // *Breast Cancer Research.* 2004. V. 13. P. 146–149.
7. Crawford A., Fasset R.G., Geraghty D.P. et al. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease // *Gene.* 2012. V. 501. P. 89–103.
8. Wang L.I., Miller D.P., Sai Y. et al. Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk // *J. Natl. Cancer Inst.* 2001. V. 93. P. 1818–21.
9. Ratnasinghe D., Tangrea J.A., Andersen M.R. et al. Glutathione Peroxidase Codon 198 Polymorphism Variant Increases Lung Cancer Risk // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 6381–6383.
10. Lin P., Hsueh Y.M., Ko J.L. et al. Analysis of NQO1, GSTP1, and MnSOD genetic polymorphisms on lung cancer risk in Taiwan // *Lung Cancer.* 2003. V. 40. P. 123–129.
11. Ho J.C., Mak J.C., Ho S.P. et al. Manganese superoxide dismutase and catalase genetic polymorphisms, activity levels, and lung cancer risk in Chinese in Hong Kong // *J. Thorac. Oncol.* 2006. V. 1. P. 648–653.
12. Ahn J., Nowell S., McCann S.E. et al. Associations between catalase phenotype and genotype: modification by epidemiologic factors // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006. V. 15. P. 1217–1222.
13. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н., Катасова Л.Д., Платонова В.И. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // *Генетика.* 2001. Т. 37, № 4. С. 549–557.
14. Ревазова Ю.А., Хрипач Л.В., Сидорова И.Е. и др. Комплексный подход в оценке нестабильности генома человека // *Вестн. РАМН.* 2006. № 4. С. 36–41.
15. Сычева Л.П., Рахманин Ю.А., Ревазова Ю.А., Журков В.С. Роль генетических исследований при оценке влияния факторов окружающей среды на здоровье человека // *Генетика и санитария.* 2005. № 6. С. 59–62.
16. Ishida K., Morino T., Takagi K. et al. Nucleotide sequence of a human gene for glutathione peroxidase // *Nucleic Acids Res.* 1987. V. 15 (23). P. 10051.
17. Choi J.Y., Neuhauser M.L., Barnett M. et al. Polymorphisms in Oxidative Stress-Related Genes Are Not Associated with Prostate Cancer Risk in Heavy Smokers // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007. V. 16. P. 1115–1120.
18. Yang P., Bamlet W.R., Ebbert J.O. et al. Glutathione pathway genes and lung cancer risk in young and old populations // *Carcinogenesis.* 2004. V. 25, № 10. P. 1935–1944.
19. Ratnasinghe D., Tangrea J.A., Andersen M.R. et al. Glutathione Peroxidase Codon 198 Polymorphism Variant Increases Lung Cancer Risk // *Cancer Research.* 2000. V. 60. P. 6381–6383.
20. Karunasinghe N., Han, D.Y., Goudie M. et al. Prostate Disease Risk Factors among a New Zealand Cohort // *J. Nutrigenet Nutrigenomics.* 2012. V. 5. P. 339–351.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ РЕПАРАЦИИ ДНК У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С ЗАДЕРЖКОЙ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ

Т.А. Толочко¹, А.В. Мейер¹, В.И. Минина², С.Н. Мякишева¹

¹ Кемеровский государственный университет, г. Кемерово

² Институт экологии человека СО РАН, г. Кемерово

Актуальность исследования проблемы задержки внутриутробного развития (ЗВУР) связана с тем, что данная патология имеет большой удельный вес в структуре причин перинатальной заболеваемости и смертности и может приводить к серьезным последствиям в дальнейшем развитии ребенка [1, 2]. Частота ЗВУР колеблется в разных странах мира от 6,5 до 30% всех новорожденных [3, 4], она зависит от критериев, положенных в основу диагноза, генетического груза популяции, социально-экономических условий, а также от такого географического фактора, как высота над уровнем моря.

В этиологии ЗВУР важную роль играют особенности генотипа матери и плода, их исследованию в последние годы уделяется особое внимание, так как их выявление позволяет прогнозировать, а в ряде случаев корректировать процессы формирования плаценты и плода. Например, показано, что полиморфизмы генов *MTHFR* и *MTR*, ответственных за обмен фолиевой кислоты, могут быть маркерами риска ЗВУР [5], в данном случае назначение адекватных доз витамина В₉ может предупредить нарушение процесса физического развития.

К настоящему времени исследован аллельный полиморфизм более 90 генов, связанных с патоло-

гиями беременности, большинство из них специфичны для функционирования плаценты, роль полиморфизмов генов репарации ДНК и контроля клеточного цикла в этиологии ЗВУР практически не изучена, хотя имеются сведения о связи полиморфных вариантов генов *APE1*, *XpD* у женщин с патологическим течением ранних сроков беременности [6]. Внутриутробный период развития, особенно первый триместр, характеризуется высокой пролиферативной активностью фетальных и материнских (децидуальных) клеток, кроме того, развивающийся организм неизбежно подвергается воздействию мутагенных факторов экзо- и эндогенной природы, при этом возникают повреждения ДНК, которые обычно исправляются ферментами репарации. Наличие в генотипе плода или матери аллельных вариантов, связанных со снижением функциональной активности BER/NER-репарационных белков, приводит к геномной нестабильности, нарушениям деления и функционирования клеток, апоптозу, следствием чего может быть слабая инвазия цитотрофобласта или его отслоение, гибель эмбриона или задержка его развития.

Целью настоящего исследования является изучение влияния полиморфизмов генов репарации ДНК на развитие ЗВУР.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили данные медицинских карт (форма 025/у-87), а также образцы ДНК, выделенные из лимфоцитов периферической крови 47 детей и подростков школы-интерната г. Таштагола Кемеровской области, имеющих диагноз «ЗВУР», и 333 ребенка и подростка (контроль) с отсутствием данной патологии при рождении. Исследование проводилось после подписания родителями либо лицами, осуществляющими опеку несовершеннолетних, формы информированного согласия. Половозрастная структура обследованных представлена в табл. 1.

Таблица 1

Половозрастная структура обследованных групп

| Группа | Мужской пол | Женский пол | Средний возраст, лет | Пределы варьирования возраста, лет |
|----------|-------------|-------------|----------------------|------------------------------------|
| ЗВУР | 29 | 18 | 13,53 ± 0,39 | 8–19 |
| Контроль | 171 | 162 | 13,10 ± 0,15 | 8–18 |

Отбор образцов цельной крови осуществляли из локтевой вены с использованием разовых вакуумных систем (пробирки «Вакутейнер»): цельная кровь и К2-ЭДТА 5 мл. Выделение ДНК проводили с использованием реактивов «ДНК-Экспресс» (НПФ «Литех», г. Москва) [7]. Исследовали 16 однонуклеотидных замов в 11 генах репарации ДНК: *APE1* T444G (rs1130409), *XRCC1* C589T (rs1799782), *XRCC1* C839T (rs25489), *XRCC1* G1996A (rs25487), *XRCC4* C1475T (rs2075686), *XRCC4* G1394T (rs2075685), *XRCC4* G245A (rs1805377), *hOGG1* C977G (rs1052133), *ADPRT* A2285G (rs1136410), *XpC* A2815C (rs2228001), *XpD* T2251G (rs13181), *XpG* G3310C (rs17655), *NBS1* C535G (rs1805794), *ATM* G5557A (rs1801516), *Ligase IV* G26A (rs1805388), *Ligase IV* C4044T (rs1805389). Типирование аллельных вариан-

тов анализируемых генов осуществляли с использованием аллельспецифической полимеразной цепной реакции и набора реагентов НПФ «Литех». Продукты амплификации выявляли электрофоретическим методом в 3%-м агарозном геле, визуализацию и документирование полученных результатов проводили с использованием трансиллюминатора Vilber Lourmat ECX-15.M и видеосистемы Gel Imager 2 производства компании «Хеликон».

Статистическую обработку осуществляли с помощью IBM PC, средствами программы StatSoft Statistica 8.0. Соответствие частот распределения генотипов равновесию Харди–Вайнберга определяли с помощью критерия χ^2 [8]. Сравнение характеристик распределения частот генотипов в опытной и контрольной группах проводили с использованием критерия χ^2 Пирсона [9]. Расчет отношения шансов (odds ratio (OR)) с определением доверительного интервала (ДИ) и уровня значимости p проводили с использованием программы MedCalc.

Результаты и обсуждение

При анализе частот распределения генотипов анализируемых генов в группах детей и подростков, имеющих и не имеющих в анамнезе ЗВУР, статистически значимые отличия установлены по локусам *XRCC1* ($\chi^2 = 11,27$, d.f. = 2, $p = 0,004$), *NBS1* ($\chi^2 = 14,58$, d.f. = 2, $p = 0,007$), *hOGG1* ($\chi^2 = 10,48$, d.f. = 2, $p = 0,005$), *APE 1* ($\chi^2 = 14,93$, d.f. = 2, $p = 0,0006$). Из 16 анализируемых полиморфизмов отклонения от равновесия Харди–Вайнберга установлены по четырем локусам для группы детей и подростков с диагнозом «ЗВУР» и по трем локусам для контрольной группы. Данные по частотам генотипов в группах сравнения приведены в табл. 2.

На основании полученных результатов рассчитывали показатель «отношение шансов» для выявления аллельных вариантов риска развития ЗВУР (табл. 3).

Таблица 2

Частоты генотипов генов репарации ДНК в обследованных группах

| Ген | Генотип | ЗВУР | | $\chi^2_{H-W} (p)$ | Контроль | | $\chi^2_{H-W} (p)$ |
|---------------------|---------|---------------|------|--------------------|--------------|------|---------------------|
| | | % ± SE | абс. | | % ± SE | абс. | |
| <i>XRCC1</i> G1996A | Arg/Arg | 45,95 ± 12,09 | 17 | 5,0754 (0,0242) | 54,51 ± 4,42 | 127 | 18,0062 (0,0000) |
| | Arg/Gln | 54,05 ± 11,14 | 20 | | 30,47 ± 5,46 | 71 | |
| | Gln/Gln | 0 | 0 | | 15,02 ± 6,04 | 35 | |
| <i>APE</i> T444G | Asp/Asp | 22,73 ± 13,25 | 10 | 6,0137 (0,0142) | 33,90 ± 4,76 | 99 | 1,8835 (0,1699) |
| | Asp/Glu | 29,55 ± 12,65 | 13 | | 45,21 ± 4,33 | 132 | |
| | Glu/Glu | 47,73 ± 10,89 | 21 | | 20,89 ± 5,20 | 61 | |
| <i>hOGG1</i> C977G | Ser/Ser | 9,52 ± 14,67 | 4 | 5,4769 (0,0193) | 34,13 ± 4,74 | 100 | 0,3644 (0,5461) |
| | Ser/Cys | 66,67 ± 8,91 | 28 | | 47,10 ± 4,25 | 138 | |
| | Cys/Cys | 23,81 ± 13,47 | 10 | | 18,77 ± 5,27 | 55 | |
| <i>NBS1</i> C535G | Glu/Glu | 23,08 ± 14,04 | 9 | 6,8202 (0,0090) | 47,77 ± 4,59 | 118 | 7,7209 (0,0055) |
| | Glu/Gln | 69,23 ± 8,88 | 27 | | 36,84 ± 5,06 | 91 | |
| | Gln/Gln | 7,69 ± 15,38 | 3 | | 15,38 ± 5,85 | 38 | |

Примечание. % – частота встречаемости генотипа, SE – стандартная ошибка, p – значимость отличий от распределения Харди–Вайнберга.

Таблица 3

Отношение шансов (OR) развития ЗВУР у носителей различных аллельных вариантов генов репарации ДНК

| Ген | Генотип предрасположенности | OR | 95%-й ДИ | p |
|---------------------|-----------------------------|------|-------------|--------|
| <i>XRCC1</i> G1996A | Arg/Gln | 2,10 | 1,04; 4,28 | 0,0396 |
| <i>APE 1</i> T444G | Asp/Glu | 0,98 | 0,41; 2,31 | 0,9542 |
| | Glu/Glu | 3,41 | 1,50; 7,72 | 0,0033 |
| <i>hOGG1</i> C977G | Ser/Cys | 5,07 | 1,72; 14,92 | 0,0032 |
| | Cys/Cys | 4,55 | 1,36; 15,17 | 0,0138 |
| <i>NBS1</i> C535G | Glu/Gln | 3,89 | 1,74; 8,68 | 0,0009 |
| | Gln/Gln | 1,04 | 0,27; 4,02 | 0,9603 |

Наиболее выраженный риск развития ЗВУР ассоциирован с присутствием в генотипе аллельного варианта *hOGG1* с заменой С→G в положении 977 в гомо- или гетерозиготном состоянии. Соответствующие значения OR составили 4,55 и 5,07 относительно гомозигот по аллелю С 977 (табл. 3). Анализируемый SNP связан с замещением серина на цистеин, что приводит к снижению активности фермента, удаляющего из ДНК 8-оксогуанин, образование которого происходит под действием активных форм кислорода [10]. Известно, что гипоксия является одним из ведущих факторов развития ЗВУР, она сопровождается оксидативным стрессом, поэтому активность 8-оксогуанин-ДНК-гликозидазы оказывает существенное влияние на стабильность генома.

Отношение шансов развития ЗВУР у гомозигот по минорному аллелю *APE1* G444G относительно гомозигот *APE1* T444T составило 3,41 (табл. 3). *APE1* – основной белок, осуществляющий репарацию апуриновых/апириимидиновых сайтов (АР-сайтов). Фермент разрезает соседнюю с АР-сайтом фосфодиэфирную связь, образуя пробел, который заполняется в дальнейшем ДНК-полимеразой. Кроме того, он обладает 3'-5'-экзонуклеазной активностью, выступая в качестве корректора синтеза ДНК, в процессе BER на неправильно спаренных нуклеотидах. Анализируемый аллельный вариант гена *APE1* связан с заменой аспарагина на глутамин в положении 148, что приводит к незначительному снижению активности фермента [11], но, учитывая, что потеря азотистых оснований происходит с высокой скоростью, можно ожидать снижение эффективности репарационных процессов и потенциальной связи с нарушением физического развития.

Согласно рассчитанному коэффициенту отношения шансов наличие полиморфного варианта гена *XRCC1*, связанного с заменой аргинина на глицин в положении 399 белка, повышает вероятность развития ЗВУР у гетерозигот (табл. 3). Продукт данного гена не имеет собственной каталитической активности, но обеспечивает взаимодействие других ферментов эксцизионной репарации ДНК, изменение структуры оказывает влияние на эффективность данного процесса [12].

Наличие полиморфизма *NBS1* Glu185Gln оказывает влияние на взаимодействие с другими участниками генной сети, обеспечивающих репарацию двойных разрывов ДНК [13, 14]. Анализ данного полиморфизма в связи с риском ЗВУР позволил установить, что у гетерозигот относительно гомозигот по мажорному аллелю коэффициент отношения шансов составляет 3,89.

Таким образом, при анализе полученных результатов установлено, что наличие определенных генотипов по полиморфным локусам генов репарации ДНК может оказывать существенное влияние на предрасположенность к ЗВУР.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 13-06-98014р-Сибирь-а, соглашения № 19 с АКО и государственного задания Минобрнауки РФ № 2014/64.

Литература

1. Евсюкова И.И., Фоменко Б.А., Андреева А.А. и др. Особенности адаптации новорожденных детей с задержкой внутриутробного развития // Журн. акушерства и жен. болезней. 2003. № 4. С. 23–27
2. Ильин А.Г. Состояние здоровья детей в современных условиях: проблемы и пути преодоления кризисной ситуации // Terra medica. 2005. № 4. С. 3–5.
3. Савельева Г.М., Шалина Р.И., Керимова З.М. и др. Внутриутробная задержка развития плода. Ведение беременности и родов // Акушерство и гинекология. 1999. № 3. С. 10–15.
4. Ибрагимов Р.Р., Ибрагимова З.Г. Гипотрофия плода. Динамика фетометрических параметров при различных формах гипотрофии, точность определения срока беременности по данным фетометрии // Пренатальная диагностика. 2004. № 1. С. 48–51.
5. Фадеева Т.Ю. Клинико-функциональные особенности развития плода и новорожденного с задержкой внутриутробного развития: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2012. 22 с.
6. Куцын К.А., Коваленко К.А., Машкина Е.В., Шкурят Т.П. Молекулярно-генетический анализ полиморфизмов генов системы репарации и контроля клеточного цикла у женщин с невынашиванием беременности // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 1. URL: www.science-education.ru/107-8357
7. Руководство по применению диагностических наборов для выявления полиморфизмов в геноме человека методом ПЦП «SNP-Экспресс». URL: http://www.lytech.ru/data/file/snp_express_manual_2012_10_03_ef.pdf (дата обращения: 21.06.2014).
8. Вейр Б. Анализ генетических данных: пер. с англ. М.: Мир, 1995. 347 с.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. Учебное пособие для биол. спец. вузов, 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
10. Kohno T., Shinmura K., Tosaka M. et al. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA // Oncogene. 1998. V. 16. P. 3219–3225.
11. Hu J.J., Smith T.R., Miller M.S. et al. Amino acid substitution variants of *APE1* and *XRCC1* genes associated with ionizing radiation sensitivity // Carcinogenesis. 2001. V. 22, № 6. P. 917–922.
12. Li Y., Long C., Lin G. et al. Effect of the *XRCC1* codon 399 polymorphism on the repair of vinyl chloride metabolite – induced DNA damage // Journal of Carcinogenesis. 2009; URL: http://www.carcinogenesis.com/temp/JCarcinog8114-4970485_134824.pdf
13. Kobayashi J., Antoccia A., Tauchi H. et al. *NBS1* and its functional role in the DNA damage response // DNA Repair. 2004. V. 3. P. 855–861.
14. Zhao S., Renthal W., Lee E.Y. Functional analysis of FHA and BRCT domains of *NBS1* in chromatin association and DNA damage responses // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30. P. 4815–4822.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ В ПОПУЛЯЦИЯХ РАЗЛИЧНОГО ЭТНИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Е.А. Трифонова^{1,2}, В.Н. Сереброва¹, Т.В. Габидулина³, И.Ю. Бухарина³, Ю.К. Бутко⁴,
А.Ю. Ворожищева⁵, К.К. Павлова⁶, Н.Р. Максимова⁶, Е.Р. Еремина⁷, В.А. Степанов^{1,2}

¹ НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

³ НИИ акушерства, гинекологии и перинатологии СО РАМН, г. Томск

⁴ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

⁵ Городская клиническая больница № 1, г. Новокузнецк

⁶ Лаборатория геномной медицины клиники МИ СВФУ, г. Якутск

⁷ Бурятский государственный университет, г. Улан-Удэ

Проблема изучения генетических механизмов предрасположенности к многофакторным заболеваниям (МФЗ) остается одной из наиболее актуальных в генетике человека [1]. Важность этого вопроса определяется огромным значением полигенных болезней для современной медицины. Одним из направлений для понимания роли генетических маркеров в развитии МФЗ является эволюционный подход к изучению их генетической архитектуры [2]. В рамках представленной работы данный подход использовался при изучении генетической компоненты одного из наиболее тяжелых осложнений беременности – преэклампсии в нескольких этнических группах населения России (русские, буряты, якуты).

Преэклампсия (ПЭ), являющаяся одним из основных факторов перинатальной заболеваемости в мире, стабильно занимает 3–4-е место в структуре причин материнской заболеваемости и смертности в Российской Федерации в течение последнего десятилетия [3, 4]. По данным ВОЗ, эта патология значительно повышает уровень заболеваемости в младенческом и раннем детском возрасте [5].

В настоящее время в качестве генов предрасположенности к преэклампсии рассматриваются более 100 генов, в том числе гены, продукты которых вовлечены в формирование сосудистого тонуса, тромбообразование, в регуляцию оксидативного стресса, функционирование эндотелия и др. Однако результаты различных исследовательских коллективов, занимающихся генетикой преэклампсии, неоднозначны и зачастую бывают противоречивы. В связи с этим следует отметить, что некоторые авторы указывают на наличие связи характера течения преэклампсии с этнической и расовой принадлежностью женщин [6, 7], а ряд современных исследований демонстрирует наличие существенной генетической дифференциации популяций по генам, ассоциированным с комплексными болезнями [8–10]. Показано, что различия в частотах генов подверженности к МФЗ могут быть одной из причин межэтнических различий в распространенности этих болезней [11, 12]. Данное наблюдение с большой долей вероятности может быть связано с процессами формирования и адаптации генофондов различных этнических групп на протяжении многих веков, что обусловило уникальность генетического разнообразия этнотерриториальных групп населения. Таким образом, можно предположить, что противоречивость результатов ассоциативных исследований генетических маркеров с преэклампсией может являться следствием вариативности структуры наследственной компоненты данной патологии у

представителей различных этнических групп. Следует отметить, что отечественные исследования, посвященные изучению генетической основы преэклампсии, немногочисленны и проведены преимущественно в русской этнической группе. Таким образом, представляется чрезвычайно актуальным изучение структуры наследственной предрасположенности к преэклампсии с учетом этнической принадлежности и поиск общих и этноспецифичных генетических маркеров данной патологии.

Материал и методы

Проведен анализ клинико-анамнестических данных течения и исходов беременности у 1 141 женщины. Обращалось внимание на возраст, течение и исходы предыдущих беременностей, сопутствующие заболевания, осложнения в родах; антропометрические признаки и показатели коагулограммы, измеренные в первом триместре беременности (табл. 1).

Материал собирался на базе МАУЗ «Родильный дом № 4» и ОГБУЗ «Родильный дом им. Н.А. Семашко» г. Томска, перинатального центра РБ № 1 г. Якутска и ГБУЗ «Республиканский перинатальный центр» г. Улан-Удэ. Образцы ДНК женщин из бурятской популяции были предоставлены для исследования кандидатом медицинских наук Е.Р. Ереминой, индивидов из якутской популяции – доктором медицинских наук Н.Р. Максимовой. Исследование было одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН.

Диагноз ПЭ был установлен в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра. Группа пациенток с ПЭ во всех трех популяционных выборках была неоднородной как по степени тяжести, так и по наличию ранее предшествовавших и сопутствующих фоновых заболеваний. Контрольную группу составили женщины с физиологической беременностью и отсутствием неблагоприятного акушерского анамнеза. По показателю среднего возраста все группы были сопоставимы, за исключением контрольной выборки бурят, данные для которой были собраны ретроспективно.

В работе изучено восемь полиморфных вариантов семи генов-кандидатов подверженности к ПЭ (табл. 2): метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), 5-го фактора свертывания крови (*F5*), протромбина (*F2*), ингибитора активатора плазминогена (*SERPINE1*), эндотелиальной синтазы оксида азота (*NOS3*), ангиотензиногена (*AGT*) и ангиотензинконвертирующего фермента (*ACE*). Данные генетические маркеры были включены в работу вследствие наличия их ассоциации с ПЭ по данным нескольких метаанализов [13–25].

Таблица 1

Краткая характеристика обследуемых групп

| Показатель | Пациентки с ПЭ | | | Контрольная группа | | |
|------------------------------------|----------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|
| | Русские | Буряты | Якуты | Русские | Буряты | Якуты |
| Количество индивидов | 157 | 140 | 217 | 210 | 207 | 210 |
| Средний возраст, лет | 28,6 ± 5,7 | 29,1 ± 5,2 | 30,4 ± 7,7 | 27,5 ± 4,6 | 47,5 ± 4,8 | 32,5 ± 7,2 |
| Наличие хронических заболеваний, % | 76 | 86 | 83 | 23 | 25 | 39 |

Таблица 2

Краткая характеристика исследованных SNPs

| № | Ген | Полиморфный вариант | Хромосома | Аллель | Предковый аллель | Локализация в гене |
|---|-----------------|------------------------|-----------|--------|------------------|--------------------|
| 1 | <i>MTHFR</i> | rs1801133 (C677T) | 1 | C/T | C | Экзон |
| 2 | <i>F5</i> | rs6025 (G1691A) | 1 | G/A | G | Экзон |
| 3 | <i>F2</i> | rs1799963 (G20210A) | 11 | A/G | G | 3'-UTR |
| 4 | <i>SERPINE1</i> | rs1799889 (-675 4G/5G) | 7 | 4G/5G | 5G | 5'-UTR |
| 5 | <i>NOS3</i> | rs1799983 (G894T) | 7 | G/T | G | Экзон |
| 6 | <i>NOS3</i> | VNTR | 7 | A/B | – | Интрон |
| 7 | <i>AGT</i> | rs699 (M235T) | 1 | C/T | C | Экзон |
| 8 | <i>ACE</i> | rs4646994 | 17 | I/D | – | Интрон |

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили стандартным методом с использованием фенол-хлороформной очистки [26]. Генотипирование осуществляли с помощью амплификации соответствующих участков генома методами полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) и ПЦР в режиме реального времени, используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе [27–30].

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакетов программ SPSS 13, Statistica 7.0 и Arlequin. Распределение генотипов исследованных полиморфных вариантов проверяли на соответствие ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей и генотипов между анализируемыми группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса или точный тест Фишера. Для оценки ассоциаций полиморфных вариантов генов с фенотипом рассчитывали показатель «отношение шансов» (odds ratio (OR)). Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Характеристика генетического разнообразия и ассоциации с преэклампсией аллелей и генотипов исследованных локусов в этнических выборках русских, якутов и бурят

Из восьми изученных локусов полиморфными в обследованных группах оказались все, кроме rs6025 гена *F5* и rs1799963 гена *F2* у якутов и бурят (табл. 3). Отклонение от равновесия Харди–Вайнберга было зафиксировано для локусов –675 4G/5G, C677T и G894T у русских, больных ПЭ, что обусловлено, вероятно, спецификой популяционно-генетических процессов либо связано с функциональной значимостью локуса. Анализ генетического разнообразия в контрольных выборках показал статистически значимые различия в распределении частот генотипов четырех аллельных вариантов (M235T гена *AGT*, C677T гена *MTHFR*, I/D-полиморфизма гена *ACE*, VNTR-полиморфизма гена *NOS3*), которые выявлялись при сравнении не только русских с монголоидными популяциями, но и последних между собой.

При сравнении частот генотипов между пациентками с ПЭ из различных этнических выборок статистически значимые отличия между всеми изученными группами зафиксированы не были. Однако для ряда маркеров (M235T гена *AGT*, C677T гена *MTHFR*, G1691A гена *F5*, I/D-полиморфизма гена *ACE*, VNTR-полиморфизма и маркера G894T гена *NOS3*) наблюдались значимые отличия между русскими и одной или двумя монголоидными выборками.

Полученные оценки частот аллелей изученных SNP для исследованных этнических групп находятся в пределах вариаций частот аллелей данных маркеров в европеоидных и монголоидных популяциях, представленных в базе данных международного проекта «1000 геномов» и литературных данных (рис. 1, табл. 4).

Следует отметить, что как для сибирских, так и для зарубежных популяций характерен широкий разброс частот рассматриваемых аллельных вариантов между представителями различных рас и этнических групп, что наряду с результатами проведенных ранее работ [34, 38] подтверждает важность учета популяционной принадлежности индивидов при проведении ассоциативных исследований.

Анализ ассоциации с ПЭ полиморфных вариантов генов SERPINE1, F2, F5, MTHFR, NOS3, AGT и ACE в обследованных группах

Из изученных полиморфных вариантов генов, вовлеченных в развитие эндотелиальной дисфункции и гиперкоагуляции, выявлен только один аллельный вариант – rs1799889 (-675 4G/5G) гена *SERPINE1*, ассоциированный с развитием ПЭ во всех трех этнических группах (табл. 3): частота генотипа 4G/4G и аллеля 4G была статистически значимо выше у больных ПЭ по сравнению с женщинами, формирующими контрольные группы, в бурятской, русской и якутской популяциях (OR = 2,16, CI: 1,46–3,42; OR = 2,01; CI: 1,30–3,07; OR = 1,48; CI: 1,01–2,17 для генотипа 4G/4G соответственно).

Известно, что при тяжелой форме ПЭ наблюдаются дисфункция эндотелия и изменения системы фибринолиза, проявляющиеся активацией внутрисосудистого свертывания [39]. Основным фактором регуляции фибринолиза является ингибитор активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1), кодируемый геном *SERPINE1* [14].

Таблица 3

Распределения частот (%) генотипов изученных SNP в обследованных группах

| Ген | SNP | Генотип | Обследованная группа | | | | | | | | |
|----------|---------------|---------|----------------------|----------|--------------------|--------|----------|----------------------|---------|----------|----------------------|
| | | | Якуты | | | Буряты | | | Русские | | |
| | | | ПЭ | Контроль | $\chi^2 (p)^*$ | ПЭ | Контроль | $\chi^2 (p)^*$ | ПЭ | Контроль | $\chi^2 (p)^*$ |
| AGT | C704T | CC | 38 | 34 | 1,54 (0,46) | 47 | 53 | 1,94 (0,38) | 28 | 24 | 1,11 (0,57) |
| | | CT | 44 | 50 | | 44 | 36 | | 43 | 44 | |
| | | TT | 18 | 16 | | 9 | 11 | | 29 | 32 | |
| SERPINE1 | -675 4G/5G | G/G | 7 | 14 | 6,57 (0,04) | 17 | 27 | 11,93 (0,003) | 17 | 21 | 10,22 (0,006) |
| | | -/G | 40 | 45 | | 41 | 48 | | 35 | 47 | |
| | | -/- | 53 | 41 | | 42 | 25 | | 48 | 32 | |
| MTHFR | C677T | CC | 75 | 70 | 2,87 (0,24) | 57 | 56 | 1,82 (0,4) | 52 | 59 | 6,97 (0,03) |
| | | CT | 24 | 27 | | 38 | 35 | | 35 | 36 | |
| | | TT | 1 | 3 | | 5 | 9 | | 13 | 5 | |
| F5 | G1691A | GG | 100 | 99 | 0,24 | 99 | 100 | 0,39 | 95 | 98 | 0,14 |
| | | GA | 0 | 1 | | 1 | 0 | | 5 | 2 | |
| | | AA | 0 | 0 | | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| F2 | G20210A | GG | 100 | 100 | - | 100 | 100 | - | 98 | 99 | 0,70 |
| | | GA | 0 | 0 | | 0 | 0 | | 2 | 2 | |
| | | AA | 0 | 0 | | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| ACE | I/D | II | 33 | 29 | 2,85 (0,24) | 15 | 13 | 2,43 (0,3) | 23 | 27 | 1,81 (0,41) |
| | | ID | 48 | 46 | | 48 | 41 | | 50 | 50 | |
| | | DD | 19 | 25 | | 37 | 46 | | 27 | 23 | |
| NOS3 | VNTR | AA | 1 | 0 | 0,93 | 0 | 1 | 0,01 | 5 | 5 | 3,18 (0,2) |
| | | AB | 7 | 8 | | 7 | 17 | | 34 | 25 | |
| | | BB | 92 | 92 | | 93 | 83 | | 61 | 70 | |
| NOS3 | G894T | GG | 50 | 63 | 8,52 (0,01) | 60 | 69 | 0,15 | 40 | 48 | 14,04 (0,001) |
| | | GT | 45 | 34 | | 37 | 29 | | 57 | 40 | |
| | | TT | 5 | 3 | | 3 | 2 | | 3 | 12 | |

Примечание. * – значение критерия χ^2 с поправкой Йейтса и (или) точный критерий Фишера и уровень значимости p получены при сравнении частот аллелей и генотипов контрольной группы и группы больных ПЭ внутри популяционной выборки. Жирным шрифтом выделены статистически значимые отличия ($p < 0,05$).

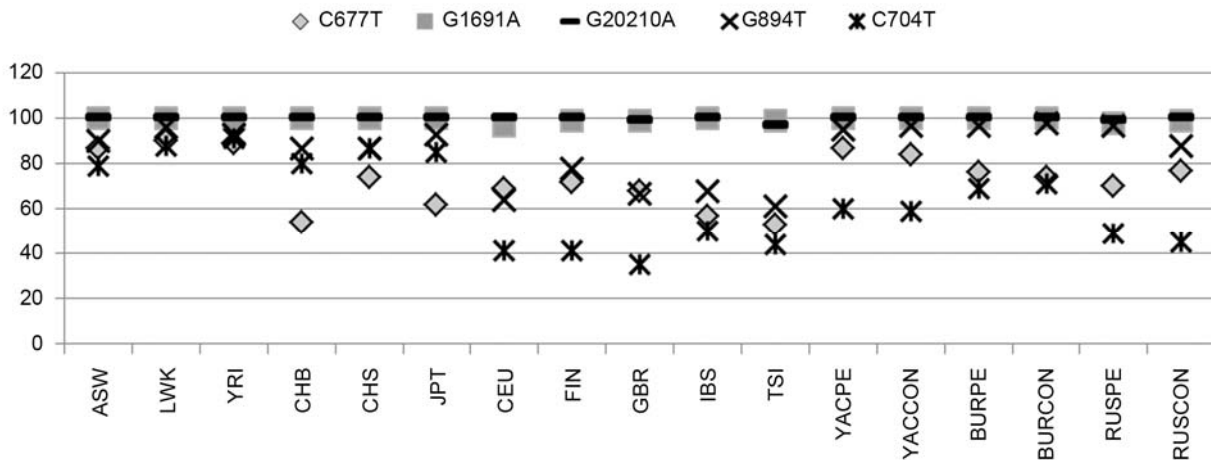


Рис. 1. Частоты предковых аллелей изученных SNP в исследованных в настоящей работе группах и популяциях из проекта «1000 геномов»: ASW – афроамериканцы, LWK – лухья, YRI – йоруба, CHB – китайцы, JPT – японцы, YACPE и YACCON – якуты (ПЭ и контроль соответственно), BURPE и BURCON – буряты (ПЭ и контроль), CEU – европеоиды из штата Юта, FIN – финны, GBR – англичане, TSI – итальянцы, RUSPE и RUSCON – русские (ПЭ и контроль)

Таблица 4

Распределение в мировых популяциях частот аллелей изученных полиморфных вариантов генов ACE, SERPINE1 и NOS3 (по литературным данным)

| Полиморфный вариант (ген) | Зарубежные популяции | | | Жители Сибири | | | Источник |
|------------------------------------|----------------------|------------|------------|---------------|-----------|-----------|---------------|
| | Негроиды | Монголоиды | Европеоиды | Якуты | Буряты | Русские | |
| | min-max | min-max | min-max | min-max | min-max | min-max | |
| Аллель D rs4646994 (ACE) | 0,5–0,88 | 0,5–0,78 | 0,29–1,0 | 0,22–0,43 | 0,26–0,45 | 0,45–0,65 | 31–34 |
| Аллель 4b VNTR-полиморфизма (NOS3) | 0,61–0,74 | 0,77–0,89 | 0,72–0,91 | 0,96 | 0,93 | 0,82 | 31, 34 |
| Аллель 4G rs1799889 (SERPINE1) | 0,15–0,29 | 0,42–0,76 | 0,40–0,64 | 0,60 | – | 0,25–0,43 | 20, 31, 35–37 |

Необходимо отметить, что наряду с регуляцией фибринолиза PAI-1 участвует в протеолитическом каскаде, вовлеченном в физиологические и патологические процессы инвазии и ремоделирования тканей в плаценте [40]. Наряду с этим эндотелиальная дисфункция проявляется увеличением образования эндотелина, тромбоксана и супероксида, повышением чувствительности сосудистой стенки к пресорным влияниям медиаторов с одновременным уменьшением продукции вазодилататоров, таких как оксид азота и простаглин. Эти изменения ведут к увеличению общего периферического сосудистого сопротивления, вазоспазму и повышению артериального давления [41].

Другим SNP, значимо ассоциированным с ПЭ как в европеоидной, так и в монголоидной популяциях, являлся аллельный вариант G894T гена *NOS3* (табл. 3): более высокая частота генотипа GT по сравнению с контрольной выборкой была зафиксирована в группе пациенток с ПЭ из якутской и русской популяций (OR = 1,63, CI: 1,10–2,41; OR = 1,78, CI: 1,15–2,76). Однако в данных этнических группах были выявлены различные генотипы, протективные в отношении развития ПЭ: GG для якутской популяции (OR = 0,56, CI: 0,58–0,83) и TT для русской (OR = 0,26, CI: 0,07–0,50). В то же время у бурят с повышенной предрасположенностью к ПЭ был ассоциирован другой вариант гена *NOS3* – полиморфизм VNTR (табл. 3): (OR = 2,65; CI: 1,26–5,54 для генотипа BB, OR = 2,57; CI: 1,25–5,07 для аллеля B).

Литературные данные по поводу ассоциации полиморфных вариантов гена *NOS3* с ПЭ достаточно противоречивы. Так, у жительниц Техаса, больных ПЭ, частота аллеля A VNTR-полиморфизма гена *NOS3* была статистически значимо ($p < 0,0005$) выше (26%), чем в контроле (5%) [42]. При исследовании группы больных ПЭ из Северо-Западного региона России показана ассоциация VNTR-полиморфизма как с чистым (генотип AA), так и с сочетанным гестозом (генотип AB) [43]. Не было найдено ассоциаций AB-полиморфного маркера гена *NOS3* с невынашиванием беременности и гестозом в этнических выборках русских г. Томска, Ирана и Палестины [33, 44, 45]. Тем не менее недавний метаанализ, проведенный Dai и соавт., продемонстрировал наличие связи между VNTR-полиморфизмом гена *NOS3* и ПЭ, особенно в европеоидных популяциях [18]. Известно, что полиморфный вариант VNTR в интроне 5 гена *NOS3* представлен двумя аллелями: аллель B, в котором имеются пять повторяющихся фрагментов по 27 п.о., и аллель A, в котором четыре таких повтора. Генотипу AA соответствует минимальный уровень базального NO и максимальный уровень артериального давления, у людей с генотипом BB уровень NO в 2 раза выше, гетерозиготы занимают промежуточное значение по выработке данного биологического медиатора [46].

Другой достаточно часто изучаемый полиморфный вариант гена *NOS3* – G894T, представляющий собой замену гуанина на тимин в позиции 894 в экзоне 7 гена *NOS3*, также ассоциирован с ПЭ в нескольких исследованиях. Так, в японской популяции, где было выявлено статистически значимое повышение частоты гомозигот по аллелю T894 в сопоставлении с контрольной группой [47]. В работе Kobashi и соавт. также показано, что частота аллеля T894 у больных с тяжелой формой ПЭ выше

($p < 0,007$) в сравнении с контролем (23 и 12% соответственно) [48]. Одно из самых больших по объему выборок исследование, в которое были включены 322 пациентки с гестозом и 522 здоровые беременные женщины, показало, что наличие генотипа TT аллельного варианта G894T увеличивает риск ПЭ в 4,6 раза (OR = 4,6; CI: 1,73–12,22; $p = 0,002$). В то же время и при анализе гаплотипов был выявлен гаплотип «T894-786C-4b», ассоциированный с ПЭ (OR = 2,07; CI: 1,33–3,23; $p = 0,001$) [49]. Полученные данные подтверждаются результатами метаанализа 33 исследований «случай – контроль», включающих более 10 тыс. человек, который продемонстрировал статистически значимую ассоциацию генотипа TT аллельного варианта G894T с развитием ПЭ [23].

В настоящей работе ассоциация с ПЭ была установлена также для полиморфного варианта C677T гена *MTHFR* в русской этнической выборке: в группе больных отмечалось значимое повышение частоты генотипа TT (OR = 2,69; CI: 1,25–5,79) и аллеля T по сравнению с этими показателями в контроле (табл. 3). В якутской и бурятской этнических группах данный вариант не был связан с ПЭ.

Результаты отдельных исследований показывают, что гомозиготный вариант TT полиморфизма C677T гена *MTHFR* является одним из значимых маркеров, предрасполагающих к гипергомоцистеинемии (ГГЦ) и сосудистым заболеваниям, особенно в сочетании с низким уровнем фолата. Множеством клинических работ было отмечено значительное увеличение риска развития акушерской патологии, связанное с повышенным уровнем гомоцистеина (ГЦ) в крови. Известно, что ГЦ обладает выраженным токсическим действием, он быстро окисляется в плазме крови с образованием большого количества радикалов, содержащих активный кислород. При этом происходит повреждение эндотелиальных клеток, потеря эластичности внутрисосудистой стенки. Кроме того, ГЦ угнетает синтез оксида азота и сульфатированных гликозаминогликанов, что приводит к активации агрегации тромбоцитов. Гипергомоцистеинемия является одним из факторов риска повреждения эндотелия с последующей активацией внутрисосудистого свертывания и развитием многих гестационных осложнений, включая ПЭ [50]. Тем не менее данные об ассоциации полиморфного варианта C677T гена *MTHFR* с гестационными осложнениями достаточно противоречивы. Несмотря на связь данного полиморфизма с осложнениями беременности, показанную во многих работах, имеется большое количество исследований, не выявивших аналогичных ассоциаций [51].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о важной роли изученных полиморфных вариантов генов *NOS3*, *MTHFR* и *SERPINE1* в предрасположенности к развитию ПЭ. Необходимо отметить, что по аллельным вариантам M235T гена *AGT*, G1691A и G20210A генов *F5* и *F2*, I/D-полиморфизму гена *ACE* во всех обследованных группах статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов выявлено не было.

На рис. 2 представлены диаграммы Вена, демонстрирующие общность и специфичность структуры наследственной предрасположенности к ПЭ по изученным маркерам и генам в обследованных этнотерриториальных группах. Как видно, к этноспе-

цифическим генетическим макерам развития ПЭ можно отнести следующие однонуклеотидные варианты: VNTR-полиморфизм гена *NOS3* – для бурят и С677Т гена *MTHFR* – для выборки русских. В то же время в качестве гена, являющегося этноспецифичным в отношении подверженности к ПЭ (ген, ассоциированный с ПЭ исключительно в одной этнической выборке), выделен только локус *MTHFR*, аллельный вариант которого С677Т связан с развитием ПЭ в популяции русских.

Общими генами структуры наследственной предрасположенности к ПЭ в трех исследованных популяциях можно обозначить ген *SERPINE1*, кодирующий ключевой фактор системы фибринолиза – ингибитор активатора плазминогена 1-го типа, и ген *NOS3*, белковый продукт которого – эндотелиальная синтаза оксида азота – играет важную роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов (вазодилатации) и тромбогенезе.

Дополнительным свидетельством наличия общности генетической структуры ПЭ являются ре-

зультаты изучения генетической дифференциации популяций в рамках рассматриваемой системы полиморфных маркеров, который проводили с помощью многомерного анализа частот аллелей методом главных компонент. На рис. 3 представлено пространство двух первых компонент аллельных частот для 6 исследованных групп и 10 зарубежных популяций из международного проекта «1000 геномов». Две первые главные компоненты в совокупности объясняют 76% вариабельности аллельных частот в изученных популяциях и формируют пространство, соответствующее географическому пространству, в котором локализованы исследованные популяции. Здесь также можно наблюдать монголоидный кластер (слева преимущественно в области отрицательных значений первого и второго факторов), негроидный кластер (справа в области положительных значений первого и второго факторов) и кластер европеоидных популяций (справа в области положительных значений первого и отрицательных значений второго факторов).

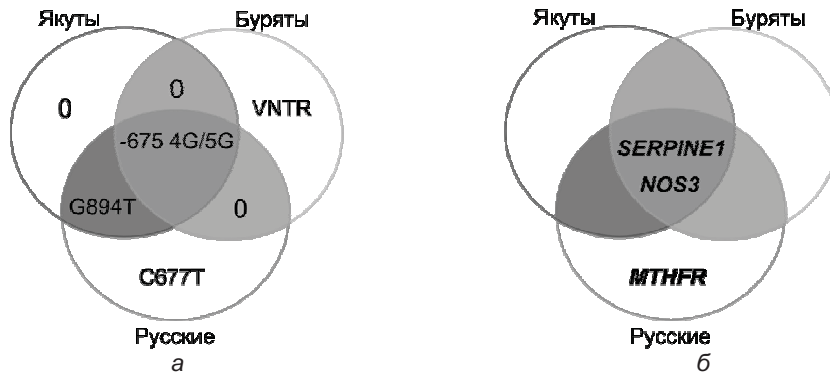


Рис. 2. Графическое представление общности и специфичности структуры наследственной предрасположенности к ПЭ: а – по ассоциированным полиморфным вариантам; б – по ассоциированным генам

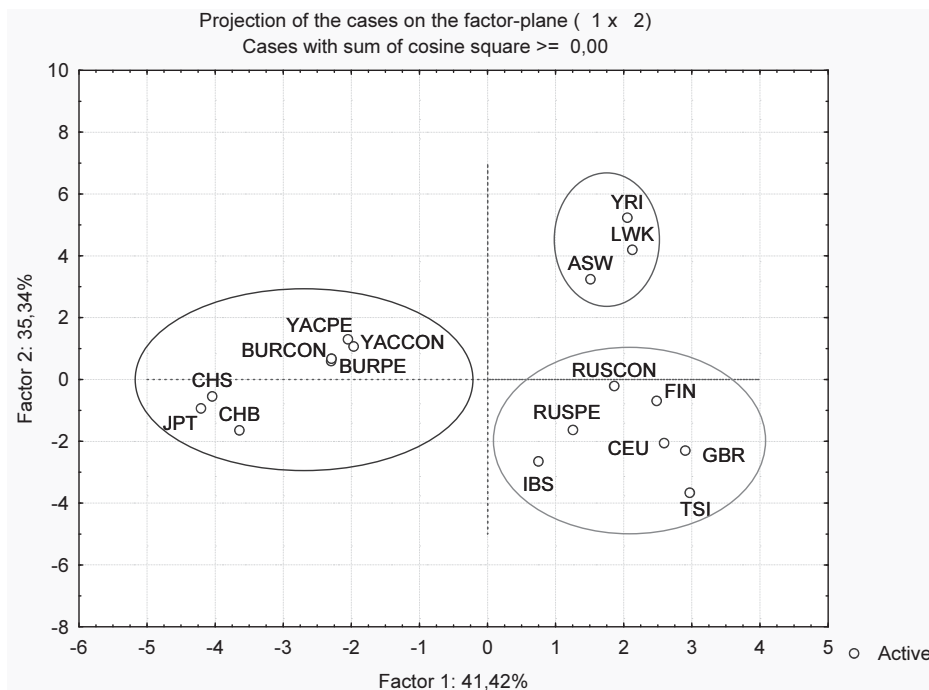


Рис. 3. Пространство двух первых компонент аллельных частот для исследованных популяций. Информация о частотах предковых аллелей в зарубежных популяциях взята из международного проекта «1000 геномов»: ASW – афроамериканцы; LWK – лухья; YRI – йоруба; CHB и CHS – китайцы; JPT – японцы; YACPE и YACCON – якуты (ПЭ и контроль); BURPE и BURCON – буряты (ПЭ и контроль); CEU – европеоиды из штата Юта; FIN – финны; GBR – англичане; TSI – итальянцы; RUSPE и RUSCON – русские (ПЭ и контроль)

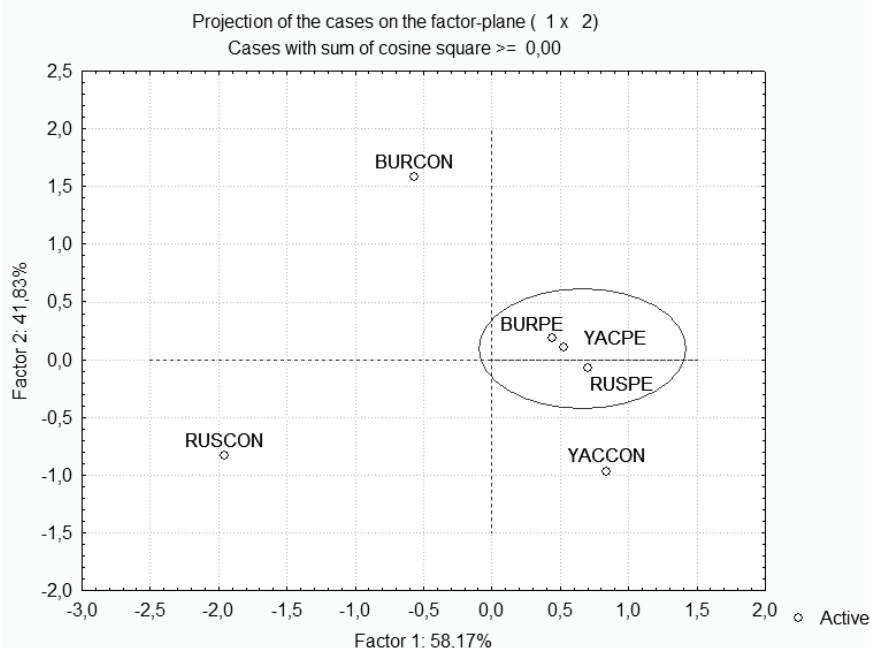


Рис. 4. Пространство двух первых компонент аллельных частот полиморфных вариантов –675 4G/5G гена *SERPINE1* и G894T гена *NOS3*, ассоциированных с ПЭ в исследованных популяциях

Следует отметить, что в целом сибирские популяции кластеризуются в соответствии с их расово-этнической принадлежностью. Это может свидетельствовать о том, что подверженность к ПЭ имеет некоторую популяционную специфичность: частоты аллелей предрасположенности варьируют в пределах величин, характерных для конкретной популяции или этнической группы.

Другая картина наблюдается при анализе изученных выборок по четырем полиморфным вариантам, ассоциированным с преэклампсией (рис. 4).

В пространстве ГК группы, дифференцированные по наличию (отсутствию) заболевания, достаточно дистанцированы друг от друга, за исключением якутской популяции. В то же время в области значений 2-го фактора сохраняется разделение выборок на монголоидные и европеоидные (за исключением контрольной группы якутов). Кроме того, в области значений 2-го фактора группы больных из всех трех популяций формируют отдельный субкластер. Это может свидетельствовать о том, что наследственная структура к ПЭ по ассоциированным полиморфным вариантам наряду с вышеописанной популяционной специфичностью имеет и некоторую общность.

Заключение

В рамках настоящего исследования был осуществлен анализ роли полиморфных вариантов генов, кодирующих протеины, вовлеченные в процессы гиперкоагуляции и функционирование эндотелия сосудов, в подверженности к преэклампсии с учетом этнической принадлежности и поиск общих и этноспецифических генетических маркеров данной патологии. Показано, что в качестве генетических факторов, ассоциированных с повышенной предрасположенностью к ПЭ и вовлеченных в формирование гиперкоагуляции и эндотелиальной дисфункции при беременности, в якутской популяции можно выделить полиморфные варианты –675 4G/5G гена

SERPINE1 и G894T гена *NOS3*, в бурятской популяции – аллельный вариант –675 4G/5G гена *SERPINE1* и VNTR-полиморфизм гена *NOS3*, а в русской этнической группе – полиморфные маркеры –675 4G/5G гена *SERPINE1*, G894T гена *NOS3* и C677T гена *MTHFR*.

В целом полученные данные свидетельствуют, что структура наследственной предрасположенности к ПЭ по системе изученных генетических маркеров имеет как общие так и этноспецифические аллельные варианты. Результаты исследования расширяют представления о роли генетических факторов гиперкоагуляции и функционирования эндотелия сосудов в развитии ПЭ, а также на примере данной патологии демонстрируют вариабельность генетической компоненты МФЗ, связанную с особенностями структуры генофондов различных этнопопуляционных групп населения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-01467).

Литература

1. Баранов В.С. Полиморфизм генов, экогенетические болезни и предиктивная персонализированная медицина // Экологическая генетика. 2011. Т. IX, № 3. С. 3–14.
2. Пузырёв В.П., Кучер А.Н. Эволюционно-онтогенетические аспекты патогенетики хронических болезней человека // Генетика. 2011. Т. 47, № 12. С. 1573–1585.
3. Айламазян Э.К., Мозговая Е.В. Гестоз: теория и практика. М.: МЕДпресс-информ, 2008. 272 с.
4. Сюндюкова Е.Г., Медведев Б.И., Сашенков С.Л. и др. Структура акушерской патологии у беременных с преэклампсией // Вестн. ЮУрГУ. 2013. Т. 13, № 1. С. 90–95.
5. Palsani S., Phipps E., Jim B. Emerging new biomarkers of preeclampsia // Adv Chronic Kidney Dis. 2013. V. 20, № 3. P. 271–279.
6. Brown H.L., Chireau M.V., Jallah Y. et al. The «Hispanic paradox»: an investigation of racial disparity in pregnancy outcomes at a tertiary care medical center // Am. J. Obstet. Gynecol. 2007. V. 197, № 2. P. 1–7.

7. Фаткуллина И.Б. Этнические особенности суточного профиля артериального давления коренных жителей Республики Бурятия с преэклампсией // Сиб. мед. журн. 2011. № 3. С. 47–48.
8. Степанов В.А. Геномы, популяции, болезни: этническая геномика и персонализированная медицина // Acta Naturae. 2010. Т. 2, № 4 (7). С. 18–34.
9. Adeyemo A., Rotimi C. Genetic variants associated with complex human diseases show wide variation across multiple populations // Public Health Genomics. 2010. V. 13, № 2. P. 72–79.
10. Ding K., Kullo I.J. Geographic differences in allele frequencies of susceptibility SNPs for cardiovascular disease // BMC Med Genet. 2011. № 20. P. 12–55.
11. Ioannidis J. P., Ntzani E. E., Trikalinos T. A. 'Racial' differences in genetic effects for complex diseases // Nat. gen. 2004. V. 36, № 12. P. 1312–1318.
12. Chang M.H., Ned R.M., Hong Y. et al. Racial/ethnic variation in the association of lipid-related genetic variants with blood lipids in the US adult population // Circ. Cardiovasc. Genet. 2011. V. 4, № 5. P. 523–533.
13. Wang Z., Wang P., Liu H. et al. Maternal adiposity as an independent risk factor for pre-eclampsia: a meta-analysis of prospective cohort studies // Obes. Rev. 2013. V. 14, № 6. P. 508–521.
14. Morgan J.A., Bombell S., McGuire W. Association of plasminogen activator inhibitor-type 1 (–675 4G/5G) polymorphism with pre-eclampsia: systematic review // PLoS One. 2013. V. 8, № 2. P. e364.
15. Kosmas I.P., Tatsioni A., Ioannidis J.P. Association of C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with hypertension in pregnancy and pre-eclampsia: a meta-analysis // J. Hypertens. 2004. V. 22, № 9. P. 1655–1662.
16. Buurma A.J., Turner R.J., Drissen J.H. et al. Genetic variants in pre-eclampsia: a meta-analysis // Hum. Reprod. Update. 2013. V. 19, № 3. P. 289–303.
17. Chen H., Zhao G., Sun M. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4b/a and T-786C) and preeclampsia: meta-analysis of 18 case-control studies // DNA Cell Biol. 2012. V. 31, № 6. P. 1136–1145.
18. Dai B., Liu T., Zhang B. et al. The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: a meta-analysis // Gene. 2013. V. 519, № 1. P. 187–193.
19. Zhu M., Zhang J., Nie S., Yan W. Associations of ACE I/D, AGT M235T gene polymorphisms with pregnancy induced hypertension in Chinese population: a meta-analysis // J. Assist. Reprod. Genet. 2012. V. 29, № 9. P. 921–932.
20. Zhao L., Bracken M. B., Dewan A. T., Chen S. Association between the SERPINE1 (PAI-1) 4G/5G insertion/deletion promoter polymorphism (rs1799889) and pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis // Mol. Hum. Reprod. 2013. V. 19, № 3. P. 136–143.
21. Zhong W.G., Wang Y., Zhu H., Zhao X. Meta-analysis of angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism as a risk factor for preeclampsia in Chinese women // Genet. Mol. Res. 2012. V. 11, № 3. P. 2268–2276.
22. Wiwanitkit V. Correlation between plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and pre-eclampsia: an appraisal // Arch. Gynecol. Obstet. 2006. V. 273, № 6. P. 322–324.
23. Qi H. P., Fraser W. D., Luo Z. C. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of preeclampsia // Am. J. Perinatol. 2013. V. 30, № 10. P. 795–804.
24. Medica I., Kastrin A., Peterlin B. Genetic polymorphisms in vasoactive genes and preeclampsia: a meta-analysis // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2007. V. 131, № 2. P. 115–126.
25. Serrano N.C., Díaz L.A., Pérez M.C. et al. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and preeclampsia risk: evidence of small-study bias // PLoS Med. 2006. V. 3, № 12. P. e520.
26. Johns M.B., Paulus-Thomas J.E. Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place of phenol // Anal. Biochem. 1989. V. 180, № 2. P. 276–278.
27. Jeunemaitre X. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system // Therapie. 1998. V. 53. P. 271–277.
28. Novoradovsky A., Brantly M. L., Waclawiw M. A. et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase as a Potential Susceptibility Gene in the Pathogenesis of Emphysema in α 1-Antitrypsin Deficiency // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1999. V. 20. P. 441–447.
29. Sazci A., Ergul E., Bayulkem K. et al. Association of the C677T and A1298C polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with essential tremor in Turkey // Mov. Disord. 2004. V. 19. P. 1472–1476.
30. Basiak J., Smolarz B. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G promoter polymorphism is not associated with breast cancer // Acta Biochimica Polonica. 2000. V. 47. P. 191–199.
31. The Allele Frequency Database [Electronic resource]. Mode of access: www.alfred.med.yale.edu
32. Радьков О.В., Калинин М.Н., Заварин В.В. Ассоциация инсерционно-делеционного полиморфизма гена ACE с факторами циркулирующего отдела ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и функцией эндотелия микрососудов кожи при формировании гестоза // Бюл. сиб. медицины. 2011. № 4. С. 32–36.
33. Спиридонова М.Г., Трифонова Е.А., Фадюшина С.В. и др. Молекулярно-генетический анализ полиморфных маркеров генов метилентетрагидрофолатредуктазы, эндотелиальной синтазы оксида азота и ангиотензин-превращающего фермента у женщин с осложненным протеканием беременности // Сиб. мед. журнал. 2006. № 4. С. 21–25.
34. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Маркова В.В. и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов-кандидатов заболеваний сердечно-сосудистой системы у представительниц четырех этнических групп Сибирского региона // Мед. генетика. 2010. № 5. С. 24–34.
35. Моссэ И.Б., Моссэ К. А., Буко И.В., Полонецкий Л.З., Гончар А.П. Вклад генов *rai-1* (ингибитора активатора плазминогена) и *ldlr* (гена рецептора липопротеина низкой плотности) в комплекс экологических и генетических факторов, приводящих к инфаркту миокарда // Наукові праці. 2011. Вип. 157, т. 169. С. 49–54.
36. Петриков А.С., Шойхет Я.Н., Белых В.И. и др. Влияние распределения аллельного полиморфизма генов на развитие и течение венозных тромбозов и ТЭЛА // Медицина и образование в Сибири. 2013. № 2. С. 43.
37. Павлова К.К. Генетический анализ предрасположенности к гестозу в якутской популяции: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2011. 24 с.
38. Малярчук Б.А., Перкова М.А., Деренко М.В. Полиморфизм генов пигментации (*OCA* и *ASIP*) в некоторых популяциях России // Генетика. 2009. Т. 45, № 3. С. 401–405.
39. Зайнулина М.С. Пути снижения материнской и перинатальной смертности при нарушении системы гемостаза // Мед. акад. журнал. 2013. Т. 13, № 1. С. 73–82.
40. Coolman M., Timmermans S., de Groot C. J. et al. Angiogenic and fibrinolytic factors in blood during the first half of pregnancy and adverse pregnancy outcomes // Obstet Gynecol. 2012. V. 119, № 6. P. 1190–1200.
41. Rodie V.A., Freeman D.J., Sattar N., Greer I.A. Preeclampsia and cardiovascular disease: metabolic syndrome of pregnancy? // Atherosclerosis. 2004. V. 175. P. 189–202.
42. Tempfer C.B., Dorman K., Deter R.L. et al. An endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with preeclampsia // Hypertens. Pregnancy. 2001. V. 20, № 1. P. 107–118.
43. Мозговая Е.В. Исследование генетической предрасположенности к гестозу: полиморфизм генов, участвующих в регуляции функции эндотелия // Журнал акушерства и женских болезней. 2003. Т. LII, № 2. С. 25–34.
44. Salimi S., Naghavi A., Mokhtari M. et al. Lack of relationship between endothelial nitric oxide synthase gene 4b/a and T-786C polymorphisms with preeclampsia in southeast of Iran // Arch. Gynecol. Obstet. 2012. V. 285, № 2. P. 405–409.

45. Sallout R.J., Sharif F.A. Polymorphisms in NOS3, ACE and PAI-1 genes and risk of spontaneous recurrent miscarriage in the Gaza Strip // *Med. Princ. Pract.* 2010. V. 19, № 2. P. 99–104.
46. Cheeseman K. H., Slater T. F. An introduction to free radical biochemistry // *Br. Med. Bull.* 1993. V. 49. P. 481–493.
47. Yoshimura T., Yoshimura M., Tabata A. et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia // *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2000. V. 7, № 4. P. 238–241.
48. Kobashi G., Shido K., Hata A. et al. Multivariate analysis of genetic and acquired factors: T235 variant of the angiotensinogen gene is a potent independent risk factor for preeclampsia // *Semin. Thromb. Hemost.* 2001. V. 27, № 2. P. 143–147.
49. Serrano N.C., Casas J.P., Diaz L.A. et al. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control // *Hypertension.* 2004. V. 44. P.702–707.
50. Refsum H., Smith A.D., Ueland P.M. et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion // *Clinical Chemistry.* 2004. V. 50, № 1. P. 3–32.
51. Трифонова Е.А. Гомоцистеин, полиморфизмы гена *MTHFR* и осложнения беременности // *Акушерство и гинекология.* 2011. № 1. С. 8–15.

СЕМЕЙНЫЕ И ПОПУЛЯЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРЕДПОЧТЕНИЙ У НАСЕЛЕНИЯ УКРАИНЫ

О.В. Филипцова, И.А. Тимошина

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

Питание является ключевым фактором здоровья человека, так как играет большую роль в развитии ряда хронических заболеваний [1–5] и патологий с летальным исходом [6].

Выбор пищи человеком обусловлен многими факторами и объясняется разными теориями. В соответствии с одной из них, биологической, у человека существуют генетически детерминированные системы, лежащие в основе вкусовой оценки и в направлении врожденных предпочтений сладкой, соленой и жирной пищи. Сладкая пища является быстрым и легкодоступным источником энергии. Определенное количество соли NaCl необходимо для нормального функционирования организма, в частности для функционирования возбудимых тканей, поддержания буферных свойств крови. Менее очевидные, но все же стабильно присутствующие врожденные предпочтения по отношению к жирной пище, возможно, объясняются необходимостью жиров для миелинизации нервных волокон, обеспечения синтеза половых гормонов и полового поведения, построения клеточных мембран, растворимости ряда витаминов, повышения органолептических свойств пищи. В современном обществе эти изначально полезные пищевые предпочтения вышли за рамки своих адаптивных границ, способствуя развитию в популяции целого ряда болезней с нарушением метаболизма, в частности сахарного диабета, ожирения и психических заболеваний. Экологоматериальная теория объясняет вкусовые предпочтения экологическими и экономическими факторами, которые зависят от средовых условий. Введение новых или несколько модифицированных продуктов в рацион может нарушать прежние пищевые предпочтения. Примерами, иллюстрирующими данную теорию, является сниженное потребление мяса в популяциях Индии вследствие возникшего табу на «священных» коров, а также наличие большой доли взрослых людей в северных популяциях Европы с активным ферментом лактазой, употребляющих свежее молоко без нежелательных последствий для желудочно-кишечного тракта. Культурная теория пищевых предпочтений, получившая значительное развитие в Европе, предполагает их отстраненность от физиологических нужд человека и значительную роль восприятия пищевого продукта на уровне психики. Например, в очень немногочисленных популя-

циях практикуется употребление в пищу насекомых, а во Франции же деликатесом считаются лягушки.

Пищевые предпочтения изучаются по ряду опросников, которые продолжают совершенствоваться в зависимости от особенностей конкретных популяций [7–8].

Благодаря развитию генетики человека стали изучаться вопросы возможной генетической обусловленности пищевого поведения, в частности пищевых предпочтений [9]. Большинство таких исследований было проведено на близнецах. Показан широкий спектр варьирования генетической и средовой компоненты в различных выборках. Так, в одном из близнецовых исследований детей 4–5 лет изучали пищевые предпочтения к 77 продуктам, объединенным в четыре группы (мясо (рыба), десерты, овощи, фрукты). Показана высокая наследуемость предпочтений к мясу (рыбе), умеренная – к десертам и низкая – к овощам и фруктам [10]. Результаты другого близнецового исследования указывали на преимущественную роль среды и минимальную роль генов в выборе той или иной пищи. Исключение составил такой показатель, как степень остроты пищи, обусловленный присутствием чилийского перца [11]. В некоторых исследованиях в генетический анализ были включены другие родственники и члены семьи (родители и дети, супруги, сибсы, полусибсы, двоюродные сибсы, тети и дяди) и оценено влияние генетических факторов на пищевые предпочтения. В частности, у финнов наследуемость разных компонентов предпочтений к сладкой пище, а именно получение удовольствия, частота употребления и пристрастие к сладкому составляла соответственно 40, 50 и 31% [12]. Взаимодействие генов и среды может быть настолько сложным, что потребление нутриентов, находящееся в определенной степени под генетическим контролем, может становиться средовым фактором модуляции экспрессии генов, связанных с болезнями, в частности ожирением [2].

В разных популяциях описано множество биологических и социодемографических факторов, влияющих на пищевые предпочтения, к которым относят возраст, этническую (расовую) принадлежность, уровень доходов и образования и др. В частности, показано, что фастфуд (бургеры, сэндвичи) больше потребляет население с невысокими доходами; злаки, молочные продукты, фрукты и фрукто-

вые соки чаще приобретают лица с более высоким уровнем образования, а люди, состоящие в браке, с большей вероятностью выбирают закуски и десерты. Среди мужчин молочные продукты более предпочтительны у американцев европейского происхождения по сравнению с афроамериканцами, среди женщин разной расовой принадлежности направленность потребления обратная [13]. Среди португальцев было обнаружено, что более молодые, менее образованные, менее физически активные лица, курящие и потребляющие алкоголь, потребляют меньше фруктов и овощей [14]. Показано, что пищевое поведение может вынужденно изменяться в связи с развитием заболеваний, ограничивающих подвижность, например болезни Паркинсона, и, соответственно, участие в выборе продуктов и приготовлении пищи [15]. В современных условиях пищевое поведение человека может модифицировать такой исключительно средовой фактор, как появление новых видов пищи, таких как органическая, искусственная и нанопища, наряду с уже ставшими привычными продуктами с содержанием ГМО, пищевыми и биологически активными добавками, функциональными продуктами питания и др. [16].

Целью настоящего исследования был анализ популяционного распределения и оценка наследуемости ряда пищевых предпочтений среди жителей Украины на основе корреляционного анализа в паре «родитель – потомок», у сибсов и в супружеских парах.

Материал и методы

Материалом для исследования популяционного распределения послужили анкеты 288 лиц, не состоящих друг с другом в родстве. При изучении пищевых предпочтений были сформированы три возрастные группы. Исходили из возможности установления стабильных пищевых предпочтений. В одну группу (до 20 лет) вошли молодые люди, у которых пищевые предпочтения могли еще не установиться. К другой группе (21–40 лет) были отнесены люди среднего возраста с частично установившимися пищевыми предпочтениями. В третью группу (старше 41 года) вошли люди старшего возраста с установившимися пищевыми предпочтениями.

Для анализа наследуемости пищевых предпочтений были использованы анкеты 291 пары «родитель – потомок» в отношении ряда пищевых предпочтений (включая 19 пар «отец – сын», 54 пары «мать – сын», 34 пары «отец – дочь» и 184 пары «мать – дочь»), 84 сибсовых пар (включая 7 пар братьев, 36 пар сестер и 41 пару «брат – сестра») и 70 брачных пар. Все участники исследования были жителями Украины, преимущественно г. Харькова. Материал был собран в соответствии с этическими требованиями при работе с человеком согласно Хельсинкской декларации (World Medical Association Declaration of Helsinki, Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects). Пищевые предпочтения изучались методом специального интервьюирования при установке исследуемых на равную доступность пищи, отсутствие голода и возможность выбора нескольких пищевых категорий. В качестве пищевых групп, по отношению к которым изучались предпочтения, были выбраны семь следующих: сладкое – мороженое, пирожное, шоколад (высококалорийная углеводная группа), мясо – бутерброд (белковая группа), фрукты – апельсин (клетчатка и витамины), соленая пища – соленый огу-

рец (источник NaCl), первые овощные блюда – борщ (клетчатка и витамины, здоровая пища), фастфуд – чипсы (вредная пища, содержащая пищевые добавки, красители, консерванты), жирное – семечки (источник жирных кислот, в том числе незаменимых, высококалорийная пища).

Методы исследования включали опрос по специально разработанной анкете, а также статистический и классический генетический анализ. Проверку данных на соответствие закону нормального распределения в больших группах (более 30 человек) проводили по методу Колмогорова–Смирнова. Сравнение средних арифметических двух групп проводили методом Стьюдента. Связь между дихотомическими качественными и нормально распределющимися количественными признаками оценивали с помощью бисериального коэффициента корреляции. Заключение относительно статистических гипотез проводили на уровне значимости $p \leq 0,05$. Предварительный корреляционный анализ проводили с помощью вычисления непараметрических коэффициентов корреляции Спирмена ρ [17].

Генетический анализ проводили с учетом коэффициентов корреляции для пар родитель – потомок (ρ_p) (мать – дочь, мать – сын, отец – дочь, отец – сын), сибс – сибс (ρ_s) (брат – брат, сестра – сестра, брат – сестра) и муж – жена (ρ_{hw}). Коэффициенты корреляции между родственниками корректировали с учетом коэффициента корреляции между супругами [18]: $\rho' = \frac{\rho}{1 + \rho_{hw}}$, где ρ' – скорректированный ко-

эффициент корреляции; ρ – коэффициент корреляции между родственниками; ρ_{hw} – коэффициент корреляции между супругами. Скорректированные коэффициенты корреляции между родственниками использовали для компонентного разложения общей фенотипической дисперсии по формулам: $G_a = 2\rho_p$; $G_d = 4(\rho_s - \rho_p)$; $G = G_a + G_d$; $E = 1 - G$, где G – общая генетическая компонента, G_a – ее аддитивная и G_d – доминантная составляющие, E – средняя компонента.

База данных была создана в программе Microsoft Excel 2010, расчеты проведены в программе Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Изученные признаки представляют собой альтернативные состояния с определенным пороговым значением, достигнув которое, человек либо предпочитает, либо не предпочитает данную пищевую группу при оговоренных выше обстоятельствах. 45,5% обследованных выявило сочетанные пищевые предпочтения. В относительном порядке по отдельным пищевым предпочтениям обследованные распределились следующим образом: сладкое (82,4%), фрукты (58,6%), мясо (32,4%), фастфуд (28,8%), жирное (22,6%), первые овощные блюда (12,2%), соленое (11,7%). Сравнения проводились в группах предпочитающих и не предпочитающих, которые были названы «тестеры» и «не тестеры» соответственно. Следует отметить условность данных терминов по отношению к настоящему исследованию, поскольку вкусовая чувствительность к изучаемым категориям продуктов присутствует во всей популяции. В табл. 1 приведены коэффициенты корреляции пищевых предпочтений у мужчин и

женщин разного возраста. Видно, что с возрастом происходит снижение предпочтений к сладкому и фруктам у мужчин и к фастфуду у женщин.

Таблица 1
Кoeffициенты корреляции r пищевых предпочтений среди мужчин и женщин разного возраста

| Пищевая группа | Мужчины (66 человек) | Женщины (222 человека) |
|----------------------|----------------------|------------------------|
| Сладкое | $-0,25^* \pm 0,12$ | $-0,10 \pm 0,12$ |
| Фрукты | $-0,30^* \pm 0,12$ | $-0,07 \pm 0,12$ |
| Мясо | $-0,02 \pm 0,12$ | $0,03 \pm 0,12$ |
| Фастфуд | $-0,06 \pm 0,12$ | $-0,33^{**} \pm 0,11$ |
| Жирное | $-0,08 \pm 0,12$ | $-0,04 \pm 0,12$ |
| Первые овощные блюда | $-0,08 \pm 0,12$ | $0,10 \pm 0,12$ |
| Соленое | $-0,20 \pm 0,12$ | $-0,06 \pm 0,12$ |

Примечание. Данные представлены в виде $r \pm S_r$, где r – бисериальный коэффициент корреляции; S_r – его статистическая ошибка. Разность между коэффициентами корреляции у лиц противоположного пола не значима во всех случаях. Здесь и в табл. 2, 3 достигнутый уровень статистической значимости: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Испытуемые были разделены на возрастные группы на основании возможности установления стабильных пищевых предпочтений. В одну группу вошли молодые люди (неустановившиеся пищевые предпочтения, склонны пробовать новую пищу). К другой группе были отнесены люди среднего возраста (частично установившиеся пищевые предпочтения, склонны к употреблению разной пищи вне зависимости от ее полезности). И, наконец, в третью группу вошли люди старшего возраста (установившиеся пищевые предпочтения, склонны к выбору пищи в зависимости от ее полезности). Результаты показали, что в исследованной выборке населения Украины имеется тенденция снижения с возрастом пищевого предпочтения по отношению к сладкому. Данный факт выявляли и другие исследователи, и его можно рассматривать как фактор снижения риска ожирения в этой возрастной группе. Почти 80% «тестеров» пищи группы «фастфуд» были лицами в возрасте до 20 лет. Лица более старшего возраста (группы от 21 до 40 лет и от 41 и более лет) относительно индифферентны к этой пище. В то же время данную тенденцию можно рассматривать как временной тренд, поскольку новые продукты питания (чипсы и т.д.) в большей степени употребляются более молодыми людьми, а более консервативное население старших возрастных групп, по-видимому, старается исключать подобные продукты из своего рациона. Возможно, в исследованной выборке более старшее население также руководствовалось этим критерием при формировании пищевых предпочтений.

Неблагоприятной тенденцией в исследованной выборке населения Украины выступает снижение с возрастом пищевых предпочтений к фруктам – источнику витаминов и клетчатки. В то же время известно, что многие фрукты и овощи, например, грейпфрут, зеленый чай, брюссельская капуста и соевые продукты содержат фитохимические вещества с онкопротекторной активностью. К ним, в частности, относятся флавоноиды цитрусовых, полифенолы зеленого чая и красного вина, глюкозинолаты овощей семейства крестоцветных и изофлавоны соевых продуктов. Потребление указанной растительной пищи может в значительной степени зависеть от наследственных факторов вкусовой чувствительности и, соответственно, иметь определенные клинические последствия.

При анализе пищевых предпочтений в зависимости от пола были обнаружены статистически значимые различия по предпочтению фруктов и первых овощных блюд между лицами разного пола. Так, каждый пятый мужчина и всего лишь каждая пятнадцатая женщина предпочитают в отсутствие осязаемого голода первые овощные блюда, отнесенные нами в категорию «здоровая пища». Данную тенденцию можно объяснить особенностями культуры (национальной потребностью мужчин в традиционном украинском борще) и изменением ролевых установок женщин в современном обществе (отсутствие времени на кулинарные «изыски» и ориентацию на пищу быстрого приготовления). В то же время в отношении фруктов половые различия свидетельствуют о том, что половина женщин и всего треть мужчин предпочитают данную категорию пищи.

Результаты корреляционного анализа в родственных парах представлены в табл. 2, 3. Как видно из табл. 2, большинство статистически значимых коэффициентов корреляции зафиксировано в парах «мать – дочь». Так, невысокие, но значимые коэффициенты корреляции наблюдаются по предпочтению мяса (0,28), фруктов (0,17), соленой пищи (0,19) и первых овощных блюд (0,25). В парах «мать – сын» значимый коэффициент корреляции наблюдался только по фруктам (0,39), а в парах «отец – дочь» – только по соленому (0,36).

У сибсов (табл. 3) значимые коэффициенты корреляции по пяти видам пищевых предпочтений были примерно одинаковыми – 0,33–0,37 (среднее значение). У разнополых сибсов и в парах «сестра – сестра» наблюдалась положительная корреляция по предпочтению к сладкому, в то время как в парах «родитель – потомок», несмотря на одинаковую степень родства, сходства по сладкому обнаружено

Таблица 2

Кoeffициенты корреляции Спирмена ρ по пищевым предпочтениям в парах «родитель – потомок»

| Пищевое предпочтение | Категория родственников | | | | |
|----------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|------------------|
| | Отец – сын (19 пар) | Мать – сын (54 пары) | Отец – дочь (34 пары) | Мать – дочь (184 пары) | Всего (291 пара) |
| Сладкое | 0,07 | 0,03 | -0,02 | -0,12 | - |
| Мясо | 0,20 | 0,12 | 0,16 | 0,28*** | 0,28 |
| Фрукты | -0,35 | 0,39** | -0,24 | 0,17* | 0,28 |
| Соленое | 0,00 | -0,04 | 0,36* | 0,19* | 0,28 |
| Первые овощные блюда | 0,00 | 0,05 | -0,05 | 0,25*** | 0,25 |
| Фастфуд | -0,10 | 0,04 | -0,17 | 0,12 | - |
| Жирное | -0,12 | -0,14 | -0,21 | 0,06 | - |

Примечание. Расчеты средних коэффициентов корреляции выполнены только с учетом статистически значимых коэффициентов корреляции в отдельных родственных парах; *** – достигнутый уровень статистической значимости $p < 0,001$.

Таблица 3

Коэффициенты корреляции Спирмена ρ по пищевым предпочтениям в sibсовых парах

| Пищевое предпочтение | Категория родственников | | | |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------|
| | Брат – брат (7 пар) | Сестра – брат (41 пара) | Сестра – сестра (36 пар) | Всего (84 пары) |
| Сладкое | 0,42 | 0,36* | 0,36* | 0,36 |
| Мясо | -0,17 | 0,19 | 0,36* | 0,36 |
| Фрукты | 0,42 | 0,12 | 0,37* | 0,37 |
| Соленое | -0,17 | 0,33* | 0,32 | 0,33 |
| Первые овощные блюда | 0,00 | 0,17 | -0,05 | - |
| Фастфуд | 0,09 | 0,34* | -0,01 | 0,34 |
| Жирное | -0,55 | 0,07 | 0,07 | - |

не было. Единственным видом пищевых предпочтений, по которому отсутствовала связь между всеми родственниками, была жирная пища.

В связи с тем что не исключен эффект положительной брачной ассортативности по пищевым предпочтениям, который может искусственно завышать коэффициенты наследуемости, помимо родственников корректным является включение в генетический анализ супружеских пар. В данном случае положительная брачная ассортативность может быть обусловлена как общей средой, так и общностью вариантов генов, ответственных за выбор той или иной пищи. Исследованиями пищевого поведения супругов занимаются множество ученых, описавших целый ряд клинически значимых эффектов [19, 20].

Корреляционный анализ в супружеских парах показал, что только по сладкой пище у супругов были выявлены отрицательные коэффициенты корреляции ($\rho = -0,25$), поэтому при оценке наследуемости эффект брачной ассортативности не учитывался.

В табл. 4 представлены результаты оценки наследуемости пищевых предпочтений (учитывались статистически значимые коэффициенты корреляции). Умеренный коэффициент наследуемости был получен для предпочтений к первым овощным блюдам (50%). Высокие коэффициенты наследуемости отмечены по пищевым предпочтениям к мясу (88%), соленому (76%) и фруктам (88%). По двум предпочтениям (сладкое и фастфуд) представлены максимально возможные коэффициенты наследуемости (100%).

Таблица 4

Результаты компонентного разложения фенотипической дисперсии

| Пищевое предпочтение | G_A , % | G_D , % | G_{tot} , % | E , % |
|----------------------|-----------|-----------|---------------|---------|
| Сладкое | 0 | 100 | 100 | 0 |
| Мясо | 56 | 32 | 88 | 12 |
| Фрукты | 56 | 36 | 92 | 8 |
| Соленое | 56 | 20 | 76 | 24 |
| Первые овощные блюда | 50 | 0 | 50 | 50 |
| Фастфуд | 0 | 100 | 100 | 0 |

Проведенное исследование показало, что в целом в изученном населении Украины выявлены наиболее высокие предпочтения по отношению к сладкой пище, фруктам и мясу. Обнаружена отрицательная корреляция между возрастом и предпочтениями к сладкой пище и фруктам среди мужчин и к фастфуду среди женщин. Показана большая выраженность предпочтений к фруктам у женщин и к первым овощным блюдам у мужчин. Впервые на Украине в отношении пищевых предпочтений изучены родственные (брачные) пары и рассчитан примерный вклад генетических факторов в наблюдаемую фенотипическую дисперсию. Показана умеренная наследуемость пищевых предпочтений к здоровой пище (первые овощ-

ные блюда) – 50% и высокая наследуемость к белковой пище (мясо) – 88%, фруктам – 92%, соленому – 76%, а также сладкому и фастфуду – около 100%.

Литература

1. Kaput J., Noble J., Hatipoglu B. et al. Application of nutrigenomic concepts to Type 2 diabetes mellitus // Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 2007. V. 17, № 2. P. 89–103.
2. Phillips C. Nutrigenetics and Metabolic Disease: Current Status and Implications for Personalised Nutrition // Nutrients. 2013. V. 5, № 1. P. 32–57.
3. Yahia N., Achkar A., Abdallah A., Rizk S. Eating habits and obesity among Lebanese university students // Nutr J. 2008. V. 7, № 32.
4. O'Connor T.M., Yang S.J., Nicklas T.A. Beverage intake among preschool children and its effect on weight status // Pediatrics. 2006. V. 118, № 4. P. e1010–e1018.
5. Caramia G. Childhood feeding, chronic-degenerative disease in adults, and nutrigenomics // Pediatr. Med. Chir. 2007. V. 29, № 6. P. 309–320.
6. Weinmann S., Siscovick D.S., Raghunathan T.E. et al. Caffeine intake in relation to the risk of primary cardiac arrest // Epidemiology. 1997. V. 8, № 5. P. 505–508.
7. Kono S., Uchioka M., Takewaka H. et al. A dietary method for epidemiological study of cancer // Gan No Rinsho. 1990. Spec. P. 409–415.
8. Tsubono Y., Takamori S., Kobayashi M. et al. A data-based approach for designing a semiquantitative food frequency questionnaire for a population-based prospective study in Japan // J. Epidemiol. 1996. V. 6, № 1. P. 45–53.
9. Wardle J., Cooke L.J. One man's meat is another man's poison // EMBO Rep. 2010. V. 11, № 11. P. 816–821.
10. Breen F.M., Plomin R., Wardle J. Heritability of food preferences in young children // Physiology & Behavior. 2006. V. 88, Is. 5. P. 443–447.
11. Rozin P., Millman L. Family environment, not heredity, accounts for family resemblances in food preferences and attitudes: A twin study // Appetite. 1987. V. 8, № 2. P. 125–134.
12. Keskitalo K., Knaapila A., Kallela M. et al. Sweet taste preferences are partly genetically determined: identification of a trait locus on chromosome // Am. J. Clin. Nutr. 2007. V. 86. P. 55–63.
13. Deshmukh-Taskar P., Nicklas T.A., Yang S.J., Berenson G.S. Does food group consumption vary by differences in socioeconomic, demographic, and lifestyle factors in young adults? The Bogalusa Heart Study // J. Am. Diet. Assoc. 2007. V. 107, № 2. P. 223–234.
14. Oliveira A., Maia B., Lopes C. Determinants of inadequate fruit and vegetable consumption amongst Portuguese adults // J. Hum. Nutr. Diet. 2014. V. 27, Suppl. 2. P. 194–203.
15. Andersson I., Sidenvall B. Case studies of food shopping, cooking and eating habits in older women with Parkinson's disease // J. Adv. Nurs. 2001. V. 35, № 1. P. 69–78.
16. Козярін І.П., Думань Т.М. Майбутнє харчування людини // Environment & Health. 2010. № 3. С. 77–80.
17. Zar J.H. Biostatistical analysis. 4th edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 1999. 929 p.
18. Falconer D.S., Mackay T.F.C. Introduction to Quantitative Genetics. Harlow, UK, Longman, 1996.
19. Lindsted K., Kuzma J.W. Husband-wife diet concordance and changes in dietary practices by surviving spouses of cancer cases // Nutr. Cancer. 1990. V. 13, № 3. P. 175–187.
20. Schafer R.B., Keith P.M., Schafer E. Predicting fat in diets of marital partners using the health belief model // J. Behav. Med. 1995. V. 18, № 5. P. 419–433.

ТЕЗИСЫ

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ИЗОЛИРОВАННОГО ЭНДОМЕТРИОЗА

О.Б. Алтухова

Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа, г. Белгород

Во всем мире эндометриозом страдают примерно 176 млн женщин, число которых постоянно растет, поэтому данное заболевание относят к разряду современных эпидемий. Эндометриоз поражает женщин независимо от расовой принадлежности, социально-экономического статуса и возраста – от подростков 10–11 лет до женщин в возрасте 60–70 лет. При хронических тазовых болях и бесплодии эндометриоз наблюдается у 40–70 и 30–50% соответственно. Эндометриоз – доброкачественное разрастание ткани, функционально и морфологически подобной нормальному эндометрию, которое характеризуется повышенным локальным образованием эстрогенов и чувствительностью к ним, а также резистентностью к прогестерону. Эндометриоз – гормональнозависимое заболевание, сложный патогенез которого остается до конца не раскрытым. У больных эндометриозом выявлена дисфункция иммунной системы, нарушения со стороны молекул адгезии, пролиферации клеток и апоптоза. Увеличение уровня цитокинов и воспалительных медиаторов является важным звеном патогенеза эндометриоза [1, 2]. При определенных формах эндометриоза повышен риск злокачественной трансформации [3].

Целью настоящей работы явилось изучение генетических факторов риска формирования эндометриоза.

Материал и методы

На базе гинекологического отделения Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа была сформирована выборка из 104 женщин с изолированным эндометриозом. Группа контроля составила 500 человек. Пациенты включались в соответствующую группу больных только после установления диагноза заболевания, подтвержденного с помощью клинических, лабораторно-инструментальных методов обследования и подтвержденного результата гистологического исследования. Всем больным и в контрольной группе проведен анализ полиморфизмов генов *MIP-1β* с.*524 A>T (rs1719153), *SDF-1* с.*519 G>A (rs1801157), *RANTES* с.-471 G>A (rs2107538), *I-TAC* с.*1539 T>C (rs4512021), *IL-6* с.-237 C>G (rs1800795), *IL-1β* с.-598 T>C (rs16944), *IL-10* с.-627 A>C (rs 180082). Исследование проведено с помощью программного обеспечения APSampler, использующего метод Монте-Карло марковских цепей и байесовскую непараметрическую статистику [4].

Результаты и обсуждение

Установлено, что у пациенток с изолированной формой эндометриоза комбинация генетических вариантов *C IL-6* (rs1800795), *A SDF-1* (rs1801157), *A MIP-1β* (rs1719153), *C IL-10* (rs 180082) встречается у 40,00%, что в 3,4 раза чаще, чем в контрольной группе (11,72%, $p = 0,0000008$; $p_{cor} = 0,006$; $OR = 5,02$, 95%-й CI 2,52–10,01), комбинация аллелей *A SDF-1* (rs1801157), *G RANTES* (rs2107538), *A MIP-1β* (rs1719153), *C IL-10* (rs 180082) и *A SDF-1* (rs1801157), *G RANTES* (rs2107538), *C IL-1β* (rs 16944), *C IL-10* (rs180082), а также *C IL-6* (rs1800795), *A SDF-1* (rs1801157), *G RANTES* (rs2107538), *C IL-10* (rs 180082) регистрируется среди больных (49,18; 41,77 и 37,31% соответственно) в 2,5–2,7 раза чаще по сравнению с контрольной группой (19,44%; $p = 0,0000001$; $p_{cor} = 0,009$; $OR = 4,00$; 16,77%; $p = 0,0000004$; $p_{cor} = 0,03$, $OR = 3,55$; 13,84%; $p = 0,0000006$; $p_{cor} = 0,05$; $OR = 3,70$). Кроме этого, получено, что комбинации из трех полиморфных локусов *A SDF-1* (rs1801157), *A MIP-1β* (rs1719153), *C IL-10* (rs 180082) и *SDF-1* (rs1801157), *A I-TAC* (rs4512021), *CC IL-1β* (rs 16944) встречаются в группе пациенток (48,38 и 24,73% соответственно) в 2,2–3,1 раза чаще, чем в популяционном контроле (22,00%; $p = 0,0000005$; $p_{cor} = 0,04$; $OR = 3,32$ и 8,03%; $p = 0,0000008$; $p_{cor} = 0,05$; $OR = 3,76$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что сочетания аллелей *C IL-6*, *A SDF-1*, *A MIP-1β*, *C IL-10* ($OR = 5,02$), аллелей *A SDF-1*, *G RANTES*, *A MIP-1β*, *C IL-10* ($OR = 4,00$), аллелей *A SDF-1*, *G RANTES*, *C IL-1β*, *C IL-10* ($OR = 3,55$), аллелей *A SDF-1*, *A MIP-1β*, *C IL-10* ($OR = 3,32$), аллелей *C IL-6*, *A SDF-1*, *G RANTES*, *C IL-10* ($OR = 3,70$), а также аллелей *A SDF-1*, *A I-TAC*, *CC IL-1β* ($OR = 3,76$) являются факторами риска развития эндометриоза.

Литература

1. Адамян Л.В., Андреева Е.Н. Роль современной гормонотерапии в комплексном лечении генитального эндометриоза // Проблемы репродукции. 2011. № 6. С. 66–77.
2. Slabe N., Meden-Vrtovec H., Verdenik I., Kosir-Pogacnik R., Ihan A. Cytotoxic t-cells in Peripheral blood in Women with Endometriosis // Geburtshilfe Frauenheilkd. 2013. № 73 (10). P. 1042–1048.
3. Worley M.J. Jr., Welch W.R., Berkowitz R.S., Shu-Wing Ng. Endometriosis-Associated Ovarian Cancer: A Review of Pathogenesis // International Journal of Molecular Sciences. 2013. № 14 (3). P. 5367–5379.
4. Favorov A., Lvovs D., Speier W. et al. OnionTree XML: A Format to Exchange Gene-Related Probabilities // J. Biomol. Struct. Dyn. 2011. № 29 (2). P. 417–423.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЛАНДШАФТ И СИСТЕМНАЯ ГЕНЕТИКА ЭНДОМЕТРИОЗА И МИОМЫ МАТКИ

В.С. Баранов

НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург

С позиции системной генетики рассмотрены генетические и эпигенетические основы патогенеза двух наиболее частых гинекологических заболеваний, существенно нарушающих женскую репродуктивную функцию, – эндометриоза (ЭМ) и миомы матки (ММ). Эти заболевания являются результатом трансформации нормальных соматических клеток эндометрия (ЭМ) и миометрия матки (ММ) в соответствующие доброкачественные опухоли: эндометриозные гетеротопии (ЭГТ) и миомы (лейомиомы) матки (ММ). Анализ генетических, иммунологических, гормональных и эпигенетических факторов позволил сформулировать гипотезу двухэтапного патогенеза этих МФЗ (Баранов, 2013; Баранов и др., 2014). В основу гипотезы положено известное представление К. Уоддингтона об эпигенетическом ландшафте как результате реализации возможных путей (каналов) дифференцировки эмбриональных клеток в процессе развития. Направления этих каналов, их конечная стадия, результат дифференцировки (эпигенетический ландшафт) зависят от действия многих внешних и внутренних факторов, суживающих на каждой стадии морфогенетические потенции клетки. В приложении к МФЗ, в данном случае к ММ и ЭМ, это положение имеет два важных следствия: 1) изменения эпигенетического ландшафта могут менять программу развития клетки; 2) комбинация различных генетических и эпигенетических регуляторов могут приводить к однотипным изменениям программы дифференцировки, т.е. канализировать процесс развития, следствием чего в конечном итоге может быть соответствующее МФЗ.

Это означает, что патологический процесс может быть индуцирован изменениями программы развития клеток эндометрия или миометрия как за счет действия внешних факторов, так и вследствие нарушений гормонального или иммунного гомеостаза или активации «ранних» генов, контролирующих деление клеток и приводящих к их метаплазии. При этом конечный результат будет одним и тем же. В случае ЭМ клетки эндометрия приобретают способность к инвазии брюшины, имплантации, индуцируют васкуляризацию и персистируют в виде ЭМГ. При ММ под влиянием онкогенного (мутации гена *MED12*, активации ранних генов и генов пролиферации вследствие транслокаций и хромосомных пере-

строек, связанных с хромотрипсисом) или метаболического стрессов (мутация гена фумаратгидролазы) на фоне гормональной дисрегуляции клетки миометрия активно делятся и формируют миоматозные скопления (узлы).

Согласно предлагаемой гипотезе на 1-м этапе патологического процесса неблагоприятные генетические и эпигенетические факторы вызывают дедифференцировку клеток эндометрия и миометрия или активируют дремлющие стволовые (эмбриональные) клетки в этих тканях, следствием чего является их трансформация в первичные эндометриозные или миоматозные клетки (ПЭК и ПМК). На 2-м этапе происходит аномальная дифференцировка ПЭК и ПМК, которая может существенно варьировать в зависимости от особенностей их пролиферации, имплантации, характера инвазивного роста (ПЭК), способности к формированию единичных или множественных миоматозных узлов (ПМК). Генетическая и эпигенетическая дисрегуляция метаболических путей гормонального и иммунологического контроля определяет индивидуальные особенности заболевания, наличие их различных клинических форм, разную чувствительность к лекарственной терапии.

Однако после появления ПЭК и ПМК патологический процесс уже запущен и, будучи канализированным, неотвратимо приводит к соответствующему заболеванию. Многочисленные клинические формы ЭМ и ММ, стадийность патологических процессов объясняются уникальностью генетических и эпигенетических факторов. Поиски соответствующих маркеров, точная иммунохимическая идентификация ПЭК и ПМК, выяснение молекулярных механизмов их возникновения и особенностей чувствительности к лекарственным препаратам являются решающими условиями успешной профилактики, ранней диагностики и лечения ЭМ и ММ.

Дальнейшие исследования с помощью методов полногеномного секвенирования и изучение функциональной активности генов-кандидатов ЭМ и ММ в норме и в условиях эпигенетических нарушений, связанных с ошибками процессов метилирования и дисрегуляцией микроРНК представляют собой магистральный стратегический путь для успешного решения проблемы этиологии и патогенеза ЭМ и ММ.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ПОД ВЛИЯНИЕМ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *IL-2* У БОЛЬНЫХ С РЕЦИДИВОМ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Д.А. Бутов¹, М.М. Кужко², А.Л. Степаненко¹

¹ Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

² Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф.Г. Яновского НАМН Украины, г. Киев, Украина

Цель исследования – определить изменения уровня интерлейкина-2 (ИЛ-2) под влиянием полиморфизма гена *IL-2* у больных с рецидивом туберкулеза легких (РТЛ).

Под наблюдением было 100 больных с РТЛ и 30 практически здоровых доноров европейского происхождения, которые проживают на территории Харьковской области, в возрасте с 20 до 70 лет.

Исследование полиморфизма T-330G гена *IL-2* проводилось методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной схемой детекции продуктов в режиме реального времени с использованием реагентов «SNP-Экспресс» (НВФ «Литех», Россия) согласно инструкции производителя.

Уровень ИЛ-2 в сыворотке венозной крови измеряли иммуноферментным методом с использованием набора для иммуноферментного исследования «Вектор-Бест» (Россия). Исследование уровня ИЛ-2 проводили до начала противотуберкулезной терапии и через 2 мес после ее применения.

До начала лечения у больных РТЛ наблюдалось статистически значимое повышение ИЛ-2 ($39,44 \pm 0,71$ пг/л) при сопоставлении с относительно здоровыми донорами ($21,60 \pm 0,80$ пг/л). После проведенной 2-месячной стандартной терапии ИЛ-2 ($29,59 \pm 0,55$ пг/л) статистически значимо снизился при сопоставлении с первоначальными показателями. При исследовании приведенного полиморфизма гена было установлено, что среди больных РТЛ чаще встречаются носители гетерозиготного генотипа, что наблюдалось у 74 (74%) больных. Более редкими были гомозиготные варианты, которые регистрировались у 26 (26%) больных, из которых 18 (18%) явля-

лись обладателями гомозиготы по мутантному аллелю и 8 (8%) – по нормальному аллелю. У практически здоровых доноров наблюдали противоположное значение приведенных выше показателей. Гетерозиготный генотип по полиморфному варианту T-330G гена *IL-2* у практически здоровых был выявлен у 5 (17%), а гомозигота по нормальному аллелю – у 18 (60%) и по мутантному аллелю – у 7 (23%).

На стадии воспаления у больных с рецидивом туберкулеза легких наблюдалось достоверное увеличение ИЛ-2 в сравнении с относительно здоровыми донорами. Высокие изменения ИЛ-2 у больных с рецидивом туберкулеза легких в большей степени ассоциированы с гетерозиготным полиморфизмом T-330G гена *IL-2*. Стандартная 2-месячная химиотерапия больных с рецидивом туберкулеза легких уменьшает и приводит к уменьшению воспалительных процессов в виде статистически значимого снижения уровня ИЛ-2. Для относительно здоровых доноров статистически значимо чаще регистрировались гомозиготные генотипы по полиморфному варианту T-330G, локализованному в промоторном участке гена *IL-2*, чем у больных с рецидивом туберкулеза легких, где преобладал гетерозиготный генотип по данному полиморфизму генов.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА 640A>G ГЕНА *СУВА* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА В ПОПУЛЯЦИИ РУССКИХ ЖИТЕЛЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ РОССИИ

О.Ю. Бушуева, В.П. Иванов, А.В. Полоников

Курский государственный медицинский университет, г. Курск

Введение

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) по-прежнему является основной причиной смертности во многих странах. Оксидативный стресс имеет важное значение в развитии атеросклероза – важнейшей причины развития ИБС. Основным источником активных форм кислорода (АФК) в сосудистой стенке является NAD(P)H-оксидаза. NAD(P)H-оксидаза – фермент, состоящий из двух мембранасоциированных субъединиц. Малая субъединица p22-phox, которая является каналом для транспорта электронов NAD(P)H-оксидазы через мембрану, представляет наибольший интерес. У человека субъединица p22-phox кодируется геном *СУВА*. Исследования относительно взаимосвязи полиморфизма 640A>G гена *СУВА* с риском ИБС относительно немногочисленны и отличаются в разных популяциях. Целью исследования стало изучение ассоциации данного полиморфизма с риском развития ИБС в популяции русских жителей Центральной России.

Материал и методы

Выборка для обследования была сформирована из числа русских жителей центрального региона России (преимущественно Курской области) общей численностью 932 человека, в том числе 536 пациентов с ИБС (339 мужчин, 197 женщин), проходивших стационарное лечение в кардиологических отделениях Курской областной клинической больницы и городской больницы скорой медицинской помощи г. Курска за период 2010–2013 гг. Контрольную груп-

пу (228 мужчин и 168 женщин) составили 396 относительно здоровых добровольцев. Средний возраст больных группы ИБС составил ($62,0 \pm 8,6$) года, лиц контрольной группы ($62,5 \pm 7,9$) года. Исследуемые группы были сопоставимы по полу и возрасту ($p > 0,05$). Геномную ДНК выделяли из венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфизма 640A>G гена *СУВА* проводилось методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad). Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере с использованием программных пакетов Statistica for Windows 8.0 (StatSoft, США) и Excel 2007 (Microsoft, США).

Результаты и обсуждение

Согласно приведенным в таблице результатам, вариантный аллель 640G ассоциировался с пониженным риском развития ИБС (OR = 0,82; 95%-й CI 0,68–0,99; $p = 0,04$). Частота гомозигот по дикому аллелю 640AA была выше у больных ИБС (OR = 1,64; 95%-й CI 1,21–2,23; $p = 0,001$), а в контрольной группе наблюдалось преобладание гетерозигот (OR = 0,70; 95%-й CI = 0,54–0,91; $p = 0,01$).

Исследование показало протективный эффект вариантного аллеля 640G и генотипа 640AG гена *СУВА* относительно риска развития ИБС у русских жителей Центральной России; в то же время гомозиготный генотип 640AA ассоциировался с заболеванием. Полученные результаты согласуются с данными проведенного метаанализа, в котором доказана

Анализ ассоциации полиморфизма 640A>G гена *CYBA* с риском развития ИБС

| Показатель | | Больные ИБС (536 человек), абс. (%) | Контроль (396 человек), абс. (%) | χ^2 (p) | OR (95%-й CI) |
|------------|-------------------|--|-------------------------------------|----------------|------------------|
| Аллели | 640A 640G | 0,537 0,463 | 0,489 0,511 | 4,32 (0,04)* | 0,82 (0,68–0,99) |
| Генотипы | 640AA 640AG 640GG | 161(30,0) | 82 (20,7) | 10,29 (0,001)* | 1,64 (1,21–2,23) |
| | | 254 (47,4) | 223 (56,3) | 7,26 (0,01)* | 0,70 (0,54–0,91) |
| | | 121 (22,6) | 91 (23,0) | 0,02 (0,88) | 0,98 (0,72–1,33) |

* Статистически значимые различия между группами.

взаимосвязь исследуемого маркера с риском развития ИБС [1]. У носителей вариантного аллеля 640G обнаружено значительное снижение продукции АФК [2]. По всей вероятности, протективный эффект носительства вариантного аллеля связан со снижением способности генерировать АФК, так как полиморфизм 640A>G может влиять на процессинг и стабильность мРНК. Таким образом, полиморфизм 640A>G является генетическим маркером предрас-

положенности к ИБС у русских жителей Центральной России.

Литература

1. Xu Q., Yuan F., Shen X. et al. Polymorphisms of C242T and A640G in *CYBA* Gene and the Risk of Coronary Artery Disease: A Meta-Analysis // PloS one. 2014. V. 9 (1). P. e84251.
2. Schirmer M., Hoffmann M., Kaya E. et al. Genetic polymorphisms of NAD (P) H oxidase: variation in subunit expression and enzyme activity // The pharmacogenomics journal. 2008. V. 8(4). P. 297–304.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА РЕЦЕПТОРА АНДРОГЕНА *AR* У ЖЕНЩИН С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ТИПА 2 В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

Л.В. Журавлева, Т.С. Бутова

Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

Цель работы – изучение генетических основ развития сочетанного течения артериальной гипертензии (АГ) и сахарного диабета типа 2 (СД-2) у женщин в постменопаузе. Для достижения поставленной цели проведен анализ 127 отечественных и зарубежных литературных источников за последние 7 лет.

Ожидаемая продолжительность жизни – один из основных индикаторов качества системы здравоохранения в критериях оценки Всемирной организации здравоохранения, имеет прямую корреляцию с показателем общих расходов на здравоохранение, по данным статистики ООН (2005–2011). Количество пожилых людей во всем мире растет, что обусловлено как общим улучшением жизни человечества, так и повышением качества медицинской помощи. По рейтингу средней продолжительности жизни среди женщин разных стран мира Украина занимает 124-е место среди 193, средняя продолжительность жизни составляет 73,8 года. То есть после менопаузы женщина живет в среднем 20–30 лет. Таким образом, проблема повышения качества жизни женщины в постменопаузе является актуальной.

На сегодня АГ является основным фактором риска развития сердечно-сосудистых осложнений у

больных СД-2. Так, сочетание АГ и СД повышает риск сердечных и цереброваскулярных осложнений в среднем в 5–6 раз по сравнению с больными АГ без СД и создает угрозу преждевременной инвалидизации и смерти от сердечно-сосудистых осложнений.

По данным различных научных исследований уровень тестостерона влияет на течение СД-2. Также в последнее время дискутируется вопрос о влиянии тестостерона на развитие и течение АГ. Реализация эффектов тестостерона зависит не только от концентрации его в крови и соотношения половых стероидов, но и от взаимодействия молекул тестостерона со специфическими рецепторами, т.е. эти гормоны трансформируют рецепторы с неактивной в активную форму. Через активацию определенных генов они вмешиваются в клеточный метаболизм и функции, способствуя синтезу специфических, необходимых для воспроизводства веществ.

Целесообразно исследовать генетические варианты полиморфизма гена рецептора андрогенов *AR* у больных АГ с СД-2, учитывая физиологическое снижение уровня половых гормонов в постменопаузе.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РИСКА РАЗВИТИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Е.Н. Каганович

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород

Преэклампсия (ПЭ) представляет собой системное нарушение неизвестной этиологии и характерна исключительно для беременных женщин после 20-й нед гестации [3]. Из всех характерных признаков данного синдрома перечень ее классических клинических проявлений включает в себя гипертензию,

вызванную беременностью протеинурию, чрезмерную прибавку массы тела и отечность [1]. Согласно данным исследований последних лет, генетическая компонента заболевания может составлять до 50% всех факторов, влияющих на развитие преэклампсии [2]. Поиск молекулярных маркеров, ассоцииро-

ванных с развитием преэклампсии – важнейшая задача для понимания патогенеза, лечения и профилактики заболевания.

Целью данного исследования явилось изучение сочетаний аллелей/генотипов генов цитокинов – 308G/A *TNFA* (rs1800629), +250A/G *Lta* (rs909253), –408G/A *RANTES* (rs2107538), –801G/A *SDF1* (rs1801157), +1931A/T *MIP1β* (rs1719153) у беременных с преэклампсией I степени тяжести и в контрольной группе.

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Общий объем исследуемой выборки составил 340 человек: 95 беременных с ПЭ I степени тяжести и 245 женщин контрольной группы. Формирование выборок больных (средний возраст варьировал от 18 до 42 лет) и популяционного контроля (средний возраст варьировал от 18 до 42 лет, $p > 0,05$) осуществлялось сплошным методом. В них включались индивидуумы русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального Черноземья России и не имеющие родства между собой. Контрольную группу составили 245 практически здоровых женщин в возрасте от 20 до 42 лет (средний возраст $31,2 \pm 7,5$ года), отобранных по национальному составу (русские) и месту рождения (уроженки Центрального Черноземья) соответственно группе беременных с ПЭ. Таким образом, контрольная группа не отличалась от группы беременных с ПЭ по полу, возрасту ($p > 0,05$), месту рождения и национальности. Исследование проведено с помощью программного обеспечения APSSampler (<http://sources.redhat.com/cygwin/>), использующего метод Монте-Карло марковскими цепями и байесовскую непараметрическую статистику.

В результате проведенного биоинформационного анализа в формировании генетической предрасположенности к ПЭ у беременных с различной степенью тяжести значимый вклад определили пять

изученных генетических полиморфизмов –308 G/A *TNFA* (rs1800629), +250 A/G *Lta* (rs909253), –408 G/A *RANTES* (rs2107538), –801 G/A *SDF1* (rs1801157), +1931 A/T *MIP1β* (rs1719153) При изучении распространенности сочетаний генов цитокинов у беременных с ПЭ I степени тяжести выявлены комбинации генетических полиморфизмов, оказывающие протективное влияние на формирование ПЭ. Это сочетание +1931A *MIP1β*, +250A *Lta*, –408G *RANTES* и –308G *TNFA* имеет значение OR = 0,42. Следующие две комбинации генетических маркеров +1931A *MIP1β*, –801G *SDF1*, +250A *Lta*, –308G *TNFA* и +1931A *MIP1β*, +250A *Lta*, –308G *TNFA* отмечают значение OR = 0,43. Также протективное значение OR = 0,44 определяет сочетания +1931A *MIP1β*, +250A *Lta* и –408G *RANTES*. Аналогичную направленность имеет комбинация генетических вариантов +1931A *MIP1β*, –801G *SDF1*, +250A *Lta* (OR = 0,46).

Таким образом, можно сделать вывод о значимом вкладе комбинаций полиморфных вариантов генов цитокинов –308G/A *TNFA* (rs1800629), +250A/G *Lta* (rs909253), –408G/A *RANTES* (rs2107538), –801G/A *SDF1* (rs1801157), +1931A/T *MIP1β* (rs1719153) в формирование патогенетических признаков ПЭ как степени тяжести данного осложнения беременности.

Литература

1. Левченко В.Г., Зорина В.Н., Баженова Л.Г., Зорина Р.М., Зорин Н.А. Некоторые аспекты патогенеза преэклампсии у беременных // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2010. № 3. С. 21–25.
2. Радзинский В.Е. Акушерская агрессия. М.: Изд-во журнала Status praesens, 2011. 688 с.
3. Сидорова И.С., Дмитриева Т.Б., Чехонин В.П. и др. // Материалы 36-го ежегодного конгр. Междунар. общества по изучению патофизиологии беременности. Москва, 24–28 мая 2004 г. М., 2004. С. 221–222.

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНА *GRM3* С РАЗВИТИЕМ ШИЗОФРЕНИИ У РАЗЛИЧНЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУПП ИЗ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

К.О. Киняшева, А.Э. Гареева, Э.К. Хуснутдинова

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Шизофрения – это тяжелое многофакторное психическое заболевание с приблизительно одинаковой распространенностью во всем мире (около 1% населения). Нарушение функционирования глутаматергической системы считается одним из важнейших компонентов этиопатогенеза шизофрении. Метаботропные рецепторы глутамата третьего типа (*GRM3*), локализованные на периферии пре- и постсинаптических нейронов, опосредуя передачу сигнала через системы G-белковых вторичных мессенджеров, принимают непосредственное участие в передаче сигналов глутамата в головном мозге, а потому структурно-функциональные изменения рецептора *GRM3* способны приводить к патофизиологическому состоянию глутаматергической системы [2]. Из литературных данных известна ассоциация полиморфных вариантов гена *GRM3*, расположенного в локусе 7q21.1 – q21.2, с развитием шизофрении, депрессии и наркомании [1].

Целью данного исследования явилось изучение роли трех полиморфных локусов rs274622, rs187993, rs6465084 гена *GRM3* в развитии шизофрении в этнических группах русских и татар из Республики Башкортостан. В исследовании приняли участие 338 индивидов, больных параноидной шизофренией (50% русских и 50% татар), и 350 здоровых индивидов (50% русских и 50% татар), соответствующих по возрасту и полу выборке больных. Изучение данных полиморфных локусов проводили методом ПЦР-ПДФ-анализа. Анализ неравновесия по сцеплению между локусами попарно проведен с использованием программы Haploview 4.1. Показатель относительного риска (odds ratio (OR)) и соответствующий 95%-й доверительный интервал рассчитывали в программе SISA Tables. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов гена *GRM3* в изученных группах соответствовало распределению Харди–Вайнберга.

В результате проведенного исследования выявлено, что генотип *GRM3* *G/*G полиморфного локуса rs187993 гена *GRM3* является маркером повышенного риска развития шизофрении в русской этнической группе (OR = 2,16; $p = 0,043$). У лиц татарской этнической принадлежности обнаружено, что генотип *GRM3* *A/*A (OR = 3,69; $p = 0,00003$) и аллель *GRM3* *A (OR = 2,55; $p = 0,0003$) полиморфного локуса rs6465084 гена *GRM3* являются рисковыми маркерами развития шизофрении, в то время как генотип *GRM3* *G/*G (OR = 0,21; $p = 0,0002$) и аллель *GRM3* *G (OR = 0,39; $p = 0,0003$) – протективными. Для полиморфного варианта rs274622 гена *GRM3* между группами «больные – контроль» русской и татарской этнической принадлежности статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов не обнаружено. Анализ неравновесия по сцеплению показал наличие умеренного сцепления между двумя локусами rs274622 и rs187993 гена *GRM3* ($D' = 0,51$) в русской этнической

группе. При анализе распределения частот гаплотипов между изученными группами лиц с шизофренией и контролем статистически значимые различия не выявлены.

Таким образом, данное исследование расширяет представление об участии глутаматергической системы в развитии шизофрении.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 14-04-97012p_поволжье_a).

Литература

1. Lencer R., Bishop J., Harris M. et al. Association of variants in DRD2 and GRM3 with motor and cognitive function in first-episode psychosis // *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2013. P. 335–350.
2. Wei Jia, Rui Zhang, Bin Wu et al. Metabotropic glutamate receptor 3 is associated with heroin dependence but not depression or schizophrenia in a chinese population // *PLoS One*. 2014. V. 9 (1). P. 110–123.

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ФАКТОРОВ РОСТА С ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ

М.Ю. Кириленко, Д.Г. Воронина, Е.В. Тикунова, М.И. Чурносков

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) – наиболее часто встречающаяся форма глаукоматозного процесса – составляет от 72,3 до 96,1% всех видов глауком [2]. В настоящий момент есть все основания относить ПОУГ к группе мультифакторных заболеваний с пороговым эффектом, развивающихся на фоне апоптоза [4]. Установлено, что важная роль в этиопатогенезе ПОУГ принадлежит факторам роста (ФР), регулирующим деление, миграцию, дифференцировку клеток, экспрессию белка, а также участвующим в процессах репарации, стимулируя ангиогенез и пролиферацию клеток [3].

Целью настоящего исследования было изучение связи полиморфных маркеров ФР *VEGF-A* с.-958 C>T (rs833061), *IGF-1* с.-1410 T>C (rs35767), C/T *IGFR-1* (rs4965425), *TGFβ-1* с.-1347 T>C (rs1800469) с риском развития ПОУГ.

Для исследования сформирована выборка из 453 человек: 252 больных первичной открытоугольной глаукомой различных стадий и 191 человека контрольной группы. В исследуемые выборки вошли индивидуумы русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не имеющие родства между собой. Пациенты включались в соответствующую группу больных только после установления диагноза заболевания, подтвержденного с помощью клинических, инструментальных и лабораторных методов обследования, проводимых на базе отделения офтальмологии Белгородской областной клинической больницы Святого Иоасафа. Оценка клинических проявлений изучаемой патологии основывалась на стадии ПОУГ [1]. Если у одного пациента были диагностированы разные стадии заболевания на парных глазах, то его относили в группу больных с более продвинутой стадией глаукомы.

Генотипирование четырех генетических полиморфизмов *VEGF-A* (rs833061), *IGF-1* (rs35767), *IGFR-1* (rs4965425), *TGFβ-1* (rs1800469) проводили

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. ПЦР проводилась на амплификаторе CFX-96 (Bio-Rad, США) с использованием олигонуклеотидных праймеров и зондов (для детекции методом TaqMan), синтезированных фирмой «Синтол».

Статистический анализ ассоциаций сочетаний генетических вариантов с ПОУГ проводили с помощью программного обеспечения APSampler [5, 6]. При проведении множественных сравнений использовали поправку Бонферрони. За статистически значимый уровень принимали $p_{cor} \leq 0,05$.

Исходя из стадии ПОУГ больные были распределены следующим образом: I стадия – 20 человек (7,94%), II стадия – 106 больных (42,06%) и III–IV стадии – 126 человек (50,00%). В результате проведенного комплексного анализа носительства сочетаний аллелей и генотипов исследуемых локусов ФР и их рецепторов выявлены статистически значимые различия между больными и контролем. Установлена ассоциация сочетания аллелей С *VEGF-A* (rs833061) и Т *IGFR-1* (rs4965425) с формированием II стадии ПОУГ. Данное сочетание генетических маркеров при II стадии ПОУГ встречается в 75,00% случаев, тогда как в контроле оно выявлено у 52,60% ($p = 0,0005$; $p_{cor} = 0,002$). Выявленная комбинация является фактором риска развития II стадии заболевания (OR = 2,70; 95%-й CI 1,50–4,86).

Таким образом, резюмируя полученные данные, можно сделать вывод о значимом вкладе ассоциации полиморфного варианта гена эндотелиального фактора роста *VEGF-A* с.-958 C>T (rs833061) и рецептора инсулиноподобного фактора роста С/Т *IGFR-1* (rs4965425) в формирование второй стадии заболевания ПОУГ.

Литература

1. Егоров Е.А. Глаукома: национальное руководство / под ред. Е.А. Егорова. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2013. 824 с.

2. Нестеров А.П. Глаукома. М.: Мед. информ. Агентство, 2008. 360 с.
3. Никитин Н.А., Кузбеков Ш.Р. Роль TGF β в офтальмологии // Цитокины и воспаление. 2009. Т. 8, № 1. С. 3–9.
4. Рахманов В.В., Никитина Н.Я., Захарова Ф.М. и др. Мутации и полиморфизмы генов миоцилина и оптиневрина как генетические факторы риска развития первичной открытоугольной глаукомы // Генетика. 2005. Т. 41, № 11. С. 1567–1574.
5. Favorov A.V., Andreevski T.V., Sudomoina M.A. et al. A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans // Genetics. 2005. V. 171. P. 2113–2121.
6. <http://sources.redhat.com/cygwin/>

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *GSTT1*, *GSTM1* И *GSTP1* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ МИОМЫ МАТКИ В ПОПУЛЯЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ РОССИИ

Т.В. Корогодина¹, О.К. Кудрявцева², М.В. Сорокина¹, О.Ю. Бушуева¹

¹ Курский государственный медицинский университет, г. Курск

² Курская областная клиническая больница, медико-генетическая консультация, г. Курск

Введение

Проблема миомы матки по-прежнему остается в центре внимания отечественных и зарубежных исследователей, поскольку является одной из основных причин оперативных вмешательств в гинекологической практике. В настоящее время не подвергается сомнению негативное влияние оксидантного стресса на возникновение заболеваний женской репродуктивной сферы, в том числе миомы матки. Обезвреживание ксенобиотиков и продуктов перекисного окисления представляет собой многоступенчатый процесс, в котором участвуют многие ферменты, в том числе семейство глутатион S-трансфераз. Наличие функционально неполноценных аллелей генов антиоксидантной системы приводит к повышенной чувствительности организма к повреждающим агентами, являясь фактором риска развития опухолевого процесса. В связи с этим целью исследования стало изучение вклада полиморфизмов генов ферментов глутатион S-трансфераз M1, T1 и P1 в формирование предрасположенности к развитию миомы матки в популяции русских жительниц Центрально-Черноземного региона России.

Материал и методы

Для исследования сформирована выборка из 300 пациенток отделения оперативной гинекологии

областного перинатального центра г. Курска, прошедших лечение в 2011–2012 гг. В основную группу вошли 180 человек с гистологически верифицированным диагнозом миомы матки, в группу контроля – 120 пациенток. Всем исследуемым проводилось стандартное клинико-лабораторное обследование. Геномную ДНК выделяли из венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование делеционных полиморфизмов генов *GSTM1* и *GSTT1* осуществлялось с помощью мультиплексной ПЦП согласно описанному в литературе протоколу [1]. Генотипирование полиморфизма I105V гена *GSTP1* проводилось методом ПЦП в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad). Статистическая обработка данных проводилась с использованием программных пакетов Statistica for Windows 8.0 (StatSoft) и Excel 2007 (Microsoft).

Результаты и обсуждение

Согласно приведенным в табл. 1 и 2 результатам, статистически достоверных различий в частотах генотипов между исследуемой группой больных миомой матки и здоровых выявлено не было. Анализ распределения частот аллелей статистически значимых различий между группами также не выявил.

Таблица 1

Распределение частот генотипов полиморфных вариантов генов *GSTT1* и *GSTM1* у больных миомой матки и здоровых

| Ген | Полиморфизм | Генотипы | Частоты генотипов | | | | Критерий различия $\chi^2(p)$ при d.f. = 1 | OR (95%-й CI) |
|--------------|-------------|----------|-------------------|------|----------|------|--|---------------------|
| | | | Больные | | Контроль | | | |
| | | | Абс. | % | Абс. | % | | |
| <i>GSTM1</i> | +/-del | + | 86 | 48,9 | 52 | 44,4 | 0,39 (0,53) | 0,84 (0,52–1,34) |
| | | Del | 90 | 51,1 | 65 | 55,6 | | |
| <i>GSTT1</i> | +/-del | + | 142 | 80,7 | 96 | 82,1 | 0,09 (0,77) | 1,09 (0,60–2,00) |
| | | Del | 34 | 19,3 | 21 | 17,9 | | |

Таблица 2

Распределение частот генотипов полиморфных вариантов гена *GSTP1* у больных миомой матки и здоровых

| Показатель | | Больные, абс. (%) | Контроль, абс. (%) | $\chi^2(p)$ | OR (95%-й CI) |
|------------|-------|-------------------|--------------------|----------------|---------------------|
| Аллели | 105I | 0,673 | 0,667 | 0,03 (0,87) | 0,97 (0,68–1328) |
| | 105V | 0,327 | 0,333 | | |
| Генотипы | 105II | 83 (46,4) | 50 (42,7) | 0,38 (0,54) | 1,16 (0,71–1,90) |
| | 105IV | 75 (41,9) | 56 (47,9) | 1,02 (0,31) | 0,79 (0,49–1,26) |
| | 105VV | 21 (11,7) | 11 (9,4) | 0,40 (0,53) | 1,28 (0,59–2,77) |

Проведенное исследование не установило ассоциации полиморфных вариантов генов глутатион S-трансфераз M1, T1 и P1 с риском развития миомы матки, что может быть обусловлено как особенностью данной выборки, так и недостаточным объемом исследованных групп.

Литература

1. Arand M., Muhlbauer R., Hengstler J. et al. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms // *Anal. Biochem.* 1996. V. 36. P. 184–186.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТЫ ГЛИКОЛИЗА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.В. Кудрявцева¹, А.В. Снежкина¹, А.Ф. Садритдинова¹, А.А. Дмитриев¹, Н.В. Мельникова¹, Е.Н. Славнова²

¹ Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, г. Москва

² Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена МЗ РФ, г. Москва

Канцерогенез характеризуется многочисленными генетическими и эпигенетическими нарушениями, которые приводят к активации или подавлению экспрессии многих генов, условно разделяемых на онкогены и гены-супрессоры опухолевого роста. Следствие этого происходит нарушение различных метаболических и сигнальных путей, например энергетического обмена. Изучение экспрессии генов, кодирующих ферменты основных путей метаболизма, имеет важное практическое значение (новые онкомаркеры и мишени для таргетной терапии), а также вносит важный вклад в понимание фундаментальных механизмов канцерогенеза.

Рак молочной железы (РМЖ) является социально значимым заболеванием, основную группу риска составляют женщины в возрасте старше 40 лет. Ежегодно во всем мире регистрируется более 1,2 млн случаев рака молочной железы и более 500 тыс. человек умирает по причине этого заболевания.

Проведен биоинформатический анализ транскриптомных баз данных EST, Oncomine и TCGA – cancer genome project, содержащих информацию для нормальных и опухолевых тканей молочной железы. При этом были исключены данные, полученные из клеточных линий и из редких специфических опухолей (тубулярный, медуллярный и муцинозный рак молочной железы). Эти результаты позволили провести предварительную оценку содержания мРНК генов, кодирующих ферменты гликолиза, и выбрать 13 потенциальных онкоассоциированных генов: *HK1*, *HK2*, *HK3*, *ADPGK*, *GPI*, *PFKP*,

ALDOA, *GAPDH*, *PGK1*, *PGAM1*, *BPGM*, *ENO1* и *PKM2*. С помощью метода ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проведена количественная оценка экспрессии генов, кодирующих ферменты гликолиза в 30 образцах тканей рака молочной железы. Для генов *HK1*, *HK2* и *HK3*, кодирующих ферменты первой основной стадии гликолиза (расщепление глюкозы до глюкозо-6-фосфата), выявлены частые изменения относительного уровня мРНК, значительное повышение регистрировалось в большинстве образцов РМЖ. Показана дерегуляция экспрессии генов *ALDOA*, *PFKP* и *PKM2* – наблюдались как случаи повышения, так и снижения уровня мРНК. Выявлено сохранение экспрессии генов *ADPGK*, *PGK1*, *PGAM1*, *GAPDH*, *GPI*, *BPGM* и *ENO1* в более чем 50% исследуемых образцов.

Таким образом, при раке молочной железы происходит частое и значительное нарушение экспрессии генов, кодирующих одни из ключевых ферментов гликолиза (гексокиназы 1, 2 и 3). Полученные результаты о нарушении экспрессии генов *PFKP* и *PKM2* согласуются с данными литературы для других типов рака, что свидетельствует об их вовлеченности в канцерогенез.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации МК-5666.2013.4 и грантом программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология». Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Геном» ИМБ РАН.

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ПОЛИМОРФНОГО МАРКЕРА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ α У БОЛЬНЫХ С ИНСУЛЬТОМ

С.Н. Миланова

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород

Введение

Инсульт является одной из самых распространенных причин смертности и инвалидизации взрослого населения во всем мире. На сегодняшний день этиология и механизмы протекания инсульта активно изучаются. Инсульт является мультифакторным заболеванием, в развитие которого вовлечены генетическая предрасположенность и внешнесредовые

факторы. Установлено, что с такими факторами, как высокое артериальное давление, курение, неправильное питание, ожирение и отсутствие физических нагрузок, связано 80% всех случаев возникновения инсульта. Тем не менее эти и традиционно называемые в качестве причин развития инсульта факторы не отражают в полной степени истинной картины, обуславливающей риск возникновения данного заболевания.

Целью исследования явилось изучение распределения генетических вариантов фактора некроза опухоли α ($-308G/A$ *TNF α*) у больных с инсультом.

Материал и методы

Были обследованы 144 больных (мужчин 64,3%, женщин 35,7%) в возрасте от 45 до 76 лет с установленным диагнозом «острое нарушение мозгового кровообращения на фоне гипертонической болезни». Все пациенты находились на стационарном лечении в неврологическом отделении Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа (г. Белгород). Средний возраст, участвующих в исследовании, 60,2 года. Пациенты были обследованы и диагноз «инсульт» подтверждался при помощи магнитно-резонансной томографии или компьютерной томографией головного мозга. Контрольную группу составили больные с артериальной гипертонией без инсульта (115 человек).

Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов венозной крови обследованных индивидумов методом фенольно-хлороформной экстракции. Анализ всех локусов проводили методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов. Статистическая обработка данных проводилась общепринятыми популяционно-генетическими методами.

Результаты и обсуждение

Исследование полиморфизма локуса $-308G/A$ *TNF α* выявило, что среди больных с инсультом наиболее часто встречался гомозиготный генотип GG (83,34%). Вторым по распространенности был гетерозиготный генотип AG (15,97%), на долю гомози-

готного генотипа AA приходилось 0,69%. При этом частота аллеля $-308G$ *TNF α* составила 0,91, а аллеля $-308A$ *TNF α* 0,09.

Сравнительный анализ полученных данных с контрольной группой (GG – 64,35%; AG – 33,91%; AA – 1,74%; A – 0,19%; G – 0,81%) показал, что частоты гетерозигот (AG) и гомозигот (AA) у больных инсультом были практически в 2 раза ниже, чем в группе контроля, однако статистически значимой разницы в распределении частот генотипов и аллелей не выявлено (таблица).

Распределение генотипов, наблюдаемой H_0 и ожидаемой H_E гетерозиготности, индекса фиксации D полиморфного маркера гена фактора некроза опухоли ($-308 G/A$ *TNF α*) среди больных с инсультом и в контрольной группе

| Показатель | Больные (144 человека) | Контрольная группа (115 человек) |
|-----------------------------|------------------------|----------------------------------|
| N_0 (N_E) для локуса: | | |
| –308GG | 120 (120,09) | 74 (64,35) |
| –308GA | 23 (22,83) | 39 (33,91) |
| –308AA | 1 (1,09) | 2 (1,74) |
| χ^2 (HWE) | 0,01 | 1,54 |
| p | >0,05 | >0,05 |
| H_0 (H_E) | 0,1597 (0,1585) | 0,3391 (0,3040) |
| $D = (H_0 - H_E)/H_E$ | +0,0075 | +0,1155 |
| t | 0,03 | 0,6 |

Примечание. N_0 (N_E) – наблюдаемое (ожидаемое) число число генотипов; t – критерий Стьюдента.

Таким образом, можно заключить, что генетический полиморфизм $-308G/A$ *TNF α* не ассоциирован с развитием инсульта у больных, страдающих гипертонической болезнью.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСОВ $-1586C>T$ *MMP-2* И $-1612 5A/6A$ *MMP-3* У БОЛЬНЫХ С ИНСУЛЬТОМ

М.И. Москаленко, О.А. Ефремова

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород

Ишемический инсульт представляет собой сложное мультифакторное заболевание со значительным влиянием генетических факторов. Вклад в патофизиологию данного заболевания вносят нарушения систем коагуляции, клеточной адгезии, липидного обмена и регуляции кровяного давления. Известно, что предикторами развития инсульта являются гипертония, курение, сахарный диабет, избыточная масса тела, однако эти факторы не в полной мере учитывают риск возникновения инсульта. Исследования последних лет показали, что несомненную роль в развитии инсульта играют матриксные металлопротеиназы (ММП). Эти молекулы отвечают за протеолитическое расщепление компонентов внеклеточного матрикса (КВМ), в том числе в центральной нервной системе [1]. Доказано, что ММП участвуют в регуляции функций клеток мозга и играют ключевую роль в реализации нейрональной пластичности, поэтому дисрегуляция их деятельности ведет к неконтролируемой деградации КВМ, нарушению нейrogenеза и формированию миелина, а также нейровоспалительным и нейротоксичным

эффектам [2]. Исследовательская группа А.С. Palei установила, что увеличение активности матриксной металлопротеиназы-2 (*MMP-2*) способствует эндотелиальной дисфункции; также эта протеаза коррелирует с высокой частотой кровоизлияний [3]. Матриксная металлопротеиназа-3 (*MMP-3*), как показано в работах J.P. Veilby, является важным фактором артериального ремоделирования, способствующего развитию гипертонии [4].

На сегодняшний день влияние полиморфизма генов ММП на восприимчивость к острым нарушениям мозгового кровообращения остается спорным, с противоречивыми данными в различных опубликованных исследованиях, поэтому целью данной работы является изучение полиморфизма локусов *MMP-2* $-1586C>T$ (rs243865) и *MMP-3* $-1612 5A/6A$ (rs3025058) в группах с инсультом и гипертонической болезнью (ГБ). Исследуемый SNP-полиморфизм локуса *MMP-2* находится в положении 1586 промоторной части (ген локализован в длинном плече хромосомы 16), а SNP-полиморфизм локуса *MMP-3* – в положении 1612

промоторной части (ген локализован в длинном плече хромосомы 11).

Материал и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенной из цельной венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Выборку для исследования составили 414 больных инсультом и ГБ, 416 больных ГБ и 185 индивидуумов без цереброваскулярной патологии и ГБ. Исследование проводили с помощью методов полимеразной цепной реакции с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров с последующим анализом полиморфизмов методом детекции TaqMan зондов с помощью ПЦР в реальном времени. При анализе распределения частот генотипов по изучаемым локусам среди больных и в контроле выявлено, что эмпирическое распределение генотипов соответствует теоретически ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга ($p > 0,05$).

Результаты и обсуждение

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *MMP-2* среди больных инсультом и ГБ выявил преобладание аллеля –1586 С *MMP-2* (75,85%). Частоты генотипов по изучаемому локусу распределились следующим образом: –1586 СС – 59,18%; –1586 СТ – 33,34%; –1586 ТТ – 7,48%. В группе больных ГБ (без инсульта) также преобладает аллель –1586 С *MMP-2* – 75,93%, а частоты генотипов составляют: –1586 СС – 57,69%; –1586 СТ – 36,30%; –1586 ТТ – 6,01%. В контроле частота аллеля –1586 С *MMP-2* составила 76,49%, частота аллеля –1586 Т *MMP-2* – 23,51%. Частоты генотипов полиморфного маркера –1586С>Т *MMP-2* в контрольной группе составили: –1586 СС – 58,92%; –1586 СТ – 35,13%; –1586 ТТ – 5,95%. Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *MMP-3* среди больных инсультом и ГБ выявил преобладание аллеля –1612 6А

(55,79%). Частоты генотипов по изучаемому локусу распределились следующим образом: –1612 5А/5А – 21,92%; –1612 5А/6А – 44,58%; –1612 6А/6А – 33,50%. В группе больных ГБ (без инсульта) также преобладает аллель –1612 6А *MMP-3* – 53,57%, а частоты генотипов составляют: –1612 5А/5А – 23,89%; –1612 5А/6А – 45,08%; –1612 6А/6А – 31,03%. В популяционном контроле частота аллеля –1612 5А *MMP-3* составила 54,01%, частота аллеля –1612 6А *MMP-3* – 45,99%. Частоты генотипов полиморфного маркера –1612 5А/6А *MMP-3* в популяционном контроле составили: –1612 5А – 32,62%; –1612 5А/6А – 42,78%; –1612 6А – 24,60%. Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов генов *MMP-2* и *MMP-3* между больными ГБ, больными инсультом с ГБ и контролем не выявил статистически значимых различий ($p > 0,05$). Таким образом, связь между генетическими вариантами локусов –1586С>Т *MMP-2* и –1612 5А/6А *MMP-3* и развитием инсульта на фоне гипертонической болезни не наблюдается.

Полученные данные могут быть использованы для изучения влияния данных генетических полиморфизмов на прогноз и клиническое течение инсульта.

Литература

1. Rosell A., Lo E.H. Multiphasic roles for matrix metalloproteinases after stroke // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2008. V. 8 (1). P. 82–89.
2. Candelario-Jalil E., Yang Y., Rosenberg G.A. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia // *Neuroscience.* 2009. V. 158.(3). P. 983–994.
3. Palei A.C., Sandrim V.C., Amaral L.M. et al. Association between matrix metalloproteinase (MMP)-2 polymorphisms and MMP-2 levels in hypertensive disorders of pregnancy // *Exp. Mol. Pathol.* 2012. V. 92.(2). P. 217–221.
4. Beilby J.P., Chapman C.M., Palmer L.J. et al. Stromelysin-1 (*MMP-3*) gene 5A/6A promoter polymorphism is associated with blood pressure in a community population // *J. Hypertens.* 2005. V. 23 (3). P. 537–542.

АНАЛИЗ СОЧЕТАНИЙ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ И ЦИТОКИНОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРЕДИКТОРОВ ИНФАРКТА МИОКАРДА

Т.Р. Насибуллин, Я.Р. Тимашева, В.В. Эрдман,
И.А. Туктарова, О.Е. Мустафина

Институт биохимии и генетики Уральского научного центра РАН, г. Уфа

Одним из подходов к изучению молекулярных основ наследственной предрасположенности к инфаркту миокарда (ИМ) является анализ полиморфизма ядерного и митохондриального геномов. Поскольку указанное заболевание, за исключением редких моногенных форм, представляет собой комплексную полигенную патологию, наиболее перспективным представляется анализ сочетаний полиморфных ДНК-маркеров генов, продукты экспрессии которых находятся в тесной функциональной взаимосвязи и играют важную роль в патогенезе заболевания.

Ключевым этапом патогенеза ИМ является атеросклеротическое повреждение коронарных сосудов, в развитии которого важную роль играет

локальное и системное воспаление. Начальным этапом развития этого процесса является адгезия лейкоцитов к поврежденной сосудистой стенке, где важную роль играют селектины (SELL, SELE, SELP) и иммуноглобулины (ICAM1, VCAM1, PECAM1), экспрессия которых регулируется цитокинами (IL1B, IL6, TNF).

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования являлось изучение сочетаний полиморфных маркеров rs2076059 (3832Т>С, ген SELE), rs6131 (S290N, ген SELP), rs1131498 (F206L, ген SELL), rs5498 (K469E, ген ICAM1), rs3917010 (1348А>С, ген VCAM1), rs668 (L125V, ген PECAM1), rs16944 (–511С>Т, ген IL1B), rs1800796 (–572G>С, ген IL6), rs1800629 (–308G>А,

TNF), rs767455 (36A>G, *TNFRSF1A*) как потенциальных предикторов ИМ.

Материалом для исследования служили образцы ДНК, выделенные из 5–6 мл венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. В исследование были включены мужчины (217 человек), перенесшие крупноочаговый ИМ в возрасте до 55 лет ((46,8 ± 6,98) года). Все больные обследованы на базе Республиканского кардиологического центра (г. Уфа). Из исследования исключены лица с сопутствующей эндокринной патологией и другими тяжелыми хроническими заболеваниями. Группу сравнения (179 человек) составили мужчины в возрасте от 30 до 60 лет ((44,24 ± 7,87) года) без клинических признаков сердечно-сосудистых заболеваний. Все участники исследования были русскими по этнической принадлежности.

Генотипирование по полиморфным маркерам проводили методом ПЦР с последующим ПДФ-анализом. При анализе ассоциаций сочетаний ал-

лелей/генотипов с ИМ применялась программа APSampler 3.6.0. Программа и ее описание представлены на сайте <https://code.google.com/p/apsampler>. В качестве поправки на множественность сравнений использовалась поправка Бонферрони. Различия считались значимыми при $p_{\text{Бонф}} < 0,05$.

С помощью алгоритма APSampler было получено 2 031 сочетание аллелей/генотипов по исследованным полиморфным маркерам, ассоциированное с ИМ. Из них 14 сочетаний оказались статически значимо ассоциированы с заболеванием. Наиболее значимыми из них были *PECAM1*V+IL6*G/G* (больные 54,07%, контроль 82,08%; $p_{\text{Бонф}} = 2,15 \cdot 10^{-6}$, OR = 0,24; CI 0,15–0,4), *VCAM1*A/A+PECAM1*L+IL6*C* (больные 13,88%, контроль 0,56%; $p_{\text{Бонф}} = 0,00019$, OR = 28,68; CI 3,84–212,8), *PECAM1*L+TNF*G+IL6*C* (больные 23,45%, контроль 12,16%; $p_{\text{Бонф}} = 0,00027$; OR = 5,78; CI 2,75–12,16), *SELP*S+TNF*G+IL6*C* (больные 38,6%, контроль 14,52%; $p_{\text{Бонф}} = 0,0001$; OR = 3,7; CI 2,25–6,09).

АНАЛИЗ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ФОРМИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

Е.В. Некипелова, М.И. Чурносков

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород

Распространенность хронической болезни почек (ХБП) сопоставима с такими социально значимыми заболеваниями, как гипертоническая болезнь и сахарный диабет, а также ожирение и метаболический синдром. Признаки ХБП выявляют у каждого десятого представителя общей популяции. В России на сегодняшний день около 14 млн человек имеют заболевания почек, которые в конечном счете приводят к хронической почечной недостаточности и смерти. Все это свидетельствует об актуальности проблемы для клиницистов многих специальностей и поиска этиопатогенетических причин ХБП.

Целью настоящего исследования явилось изучение полиморфизмов генов-кандидатов среди больных ХБП.

В исследовании использовали образцы ДНК, выделенной стандартными методами из цельной венозной крови 834 больных ХБП и 576 человек группы контроля, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России. Среди них было 408 больных хроническим гломерулонефритом (ХГН), 314 – хроническим пиелонефритом и 112 – сахарным диабетом I и II типов. У 352 больных отмечалась ХПН. Генотипирование проведено в геномном центре Гонконгского университета.

Проведено исследование 56 генетических полиморфизмов, связанных с обменом креатинина (596T>C *SLC22A2* (rs2279463), C>T *WDR37* (rs10794720), A>C *DACH1* (rs626277), –319C>T *CTLA4* (rs5742909), G>T *WDR72* (rs491567), 910A>G *SLC34A1* (rs6420094), G>T *SYPL2* (rs1933182), C>T *BCAS3* (rs9895661), C>A *GATM* (rs2453533), 2285T>C *ADPRT* (rs1136410), A>C *TFDP2* (rs347685), A>G *SHROOM3* (rs17319721), G>A *PRKAG2* (rs7805747), C>G *RNASEH2C* (rs4014195)), антиок-

сидантной системой (C>G *TXNRD1* (rs1128446), G>A *CAPN10* (rs3792267), G-463A *CAT* (rs769214), 4760 C>T *CAT* (rs1001179), T47C *SOD2* (rs4880), C609T *NQO1* (rs10517), Glu158Lys *FMO3* (rs2266782), C681G *PPARG2* (rs1801282), 549C>T *CYBA* (rs9932581), Gly173Val *GPX2* (rs35179634)), детоксикацией (T>C *NAT8* (rs13538), T>C *CYP2C19* (rs4986894), 344C>T *NAT1* (rs4986988), Ile462Val *CYP1A1* (rs2606345), Rev T>C *CYP1B1* (rs162557)), цитокинов (1291T >C *IL4R* (rs1805015), 8375/G *IL4* (rs2243270), –511C>T *IL1RN* (rs419598), 174C>G *IL-6* (rs1800795), 519G>A *SDF1* (rs1801157), 819CT *IL10* (rs1800871), A2756G *MTR* (rs1805087), T587G *TNFRSF1B* (rs1061622), 1560G>C *IL1B* (rs1143623), A>G *IL4R* (rs1801275), Gln144Arg *IL13* (rs20541), 836A>G *MMP9* (rs17576), –403G> *RANTES* (rs2107538), 524A>T *MIP-1B* (rs1719153), фолатов (G>A *SHMT1* (rs1979277), A80G *RFC1* (rs1051266), 1494del6 *TYMS* (rs16430)), факторов роста (–735G>A *PDGFB* (rs1800818), 95C>G *IGFBP3* (rs2471551)), апоптоза (A>G *PARP1* (rs3219023), 288A>G *BIRC5* (rs3764383), +309T>G *MDM2* (rs2279744)), вазоактивных гормонов (C3389T *AGT* (rs4762), Arg16gly *ADRB2* (rs1042713), M235T *AGT* (rs699), A>G *GNB3* (rs2301339)).

Выявлены различия в распределении генотипических вариант полиморфных локусов T>C *CYP2C19* (rs4986894), G>A *SHMT1* (rs1979277), 1291T>C *IL4R* (rs1805015), G>A *CAPN10* (rs3792267), –511C>T *IL1RN* (rs419598), G>T *WDR72* (rs491567), Gly173Val *GPX2* (rs35179634) между больными ХБП и контрольной группой.

Полученные данные послужат основой для более детального анализа вовлеченности данных полиморфных локусов в формирование ХБП.

СОМАТИЧЕСКАЯ ПРИРОДА МУТАЦИЙ ГЕНА *MED-12* У ЖЕНЩИН С МИОМОЙ МАТКИ

Н.С. Осиновская, Т.Э. Иващенко, И.Ю. Султанов, В.Ф. Беженарь, В.С. Баранов

НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург

Миома матки является наиболее распространенной доброкачественной опухолью у женщин, которая возникает в результате неконтролируемого деления клеток миометрия. Это доброкачественное новообразование является главной причиной гистерэктомии во многих странах, в том числе и в России (50–70%). Выяснение факторов предрасположенности к миоме матки может дать представление об его этиологии и, соответственно, позволит разработать и принять превентивные меры. Последние исследования предполагают важную роль мутаций гена *MED12* в возникновении и развитии миоматозных узлов. Продукт гена *MED12* входит в состав крупного белкового комплекса, контролирующего работу факторов транскрипции. «Горячей» областью данного гена являются последовательность экзона 2 и прилегающие к нему интронные области. Задача данной работы состояла в изучении спектра мутаций экзона 2 гена *MED12* у женщин с миомой матки и доказательство соматической природы данных мутаций.

Работа выполнена на образцах ДНК, выделенных из тканей биоптата опухолей и периферической крови исследуемых пациентов. Методом секвениро-

вания проанализированы 46 образцов ДНК из миоматозных узлов и 28 образцов, выделенных из периферической крови от 28 пациенток.

В 9 случаях (19%) идентифицированы делеции различной протяженности (от 3 до 24 нуклеотидов). В двух образцах установлена инсерция одного нуклеотида. В одном образце (3%) была выявлена однонуклеотидная замена в кодоне 36 и в 13 образцах (28%) идентифицированы различные однонуклеотидные замены в кодоне 44. В 23 изученных образцах ДНК (50%) из миоматозных узлов мутаций не выявлено.

Соматическая природа выявленных мутаций во всех случаях доказана отсутствием таких нарушений в гене *MED12* в образцах ДНК из периферической крови тех же пациенток. Таким образом, высокий процент (50%) мутаций в миоматозных узлах свидетельствует об их неслучайной роли в развитии миомы матки, что подтверждается их соматическим происхождением. Не исключено, что тип мутации может способствовать изменению скорости развития опухоли и ее расположению в органе. Дальнейшие исследования позволят проверить данное предположение.

ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *NETO2* КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАРКЕР СВЕТЛОКЛЕТОЧНОГО РАКА ПОЧКИ

А.В. Снежкина, А.Ф. Садритдинова, А.А. Дмитриев, Н.В. Мельникова, А.В. Кудрявцева

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

Канцерогенез – сложный, многоэтапный процесс перерождения нормальных клеток в злокачественные. Комплексное повреждение или изменение генетического аппарата клетки (соматические мутации, хромосомные aberrации, рекомбинации) считаются основной причиной опухолевой трансформации. В неопластической клетке таким изменениям подвергаются в первую очередь онкогены и гены-супрессоры опухолевого роста. Выявление чувствительных молекулярных маркеров онкологических заболеваний на основе изучения молекулярных особенностей активации онкогенов и реактивации генов-супрессоров при канцерогенезе актуально для современной биомедицины. В настоящее время не обнаружено «универсальных» онкомаркеров, однако для некоторых генов наблюдаются сходные тенденции в изменении экспрессии в определенных типах эпителиальных опухолей.

Был проведен комплексный биоинформатический анализ двух типов транскриптомных данных, публично доступных для рака почки: нуклеотидных последовательностей EST и гибридизации кДНК на микропанелях. Это позволило выявить новый потенциальный молекулярный маркер рака почки – ген *NETO2* и два ко-экспрессирующихся с ним гена *COX4B* и *NEFL*. Ген *NETO2* кодирует малоизученный трансмембранный белок, относящийся наряду со своим единственным паралогом *NETO1* к уникальному подсемейству CUB- и LDLa-содержащих белков. Известно, что белки *NETO1* и *NETO2* принимают участие в нейронспецифичных процессах, в

частности в образовании регуляторного комплекса с рецепторами каинатного типа. Впервые показана вовлеченность гена *NETO2* в канцерогенез, а также его экспрессия на уровне мРНК в эпителиальных тканях. Методом ПЦР в режиме реального времени изучено изменение уровня мРНК генов *NETO2*, *COX4B* и *NEFL* в образцах светлоклеточного рака почки (СРП), оценен вклад изоформы 1 и 2 гена *NETO2* в его экспрессию. Показано значительное повышение уровня мРНК гена *NETO2* – в 90% (до 100 раз) и гена *NEFL* – в 67% (до 83 раз) образцов светлоклеточного рака почки. Установлено, что в образцах СРП повышается экспрессия преимущественно изоформы 2 гена *NETO2*. Выявлено сохранение уровня экспрессии гена *COX4NB* в большинстве образцов СРП (81%). Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень экспрессии мРНК гена *COX4NB* не связан с экспрессией гена *NETO2*. Уровень экспрессии гена *NEFL* положительно коррелирует с уровнем экспрессии изоформы 2 гена *NETO2*. Таким образом, ген *NETO2* характеризуется значительным изменением уровня экспрессии при социально значимом онкологическом заболевании – светлоклеточном раке почки и может быть предложен в качестве нового перспективного маркера для данного типа карцином.

Представленная работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований № 14-04-32181 мол_а и №13-04-02072 А с использованием оборудования ЦКП «Геном» ИМБ РАН.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПОДВЕРЖЕННОСТИ К САХАРНОМУ ДИАБЕТУ ТИПА 1 И САХАРНОМУ ДИАБЕТУ ТИПА 2

Н.В. Тарасенко¹, И.А. Гончарова^{1,2}, А.Н. Кучер¹, А.В. Марков¹, В.П. Пузырёв¹

¹ НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

² НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, г. Кемерово

Широко распространенные социально значимые заболевания человека имеют многофакторный характер и формируются под влиянием большого числа генетических факторов и стимулов окружающей среды. Ассоциативные исследования, результаты которых анализируются с позиции вовлеченности генетических маркеров в биологические процессы функционирования организма, могут расширить понимание патогенеза таких патологических состояний.

Цель настоящего исследования состояла в сравнении структуры генетической подверженности для мажорных форм сахарного диабета – тип 1 и тип 2. Изучено 58 полиморфных вариантов (SNPs) 47 генов, продукты которых участвуют в различных метаболических путях и вовлечены в процессы фиброгенеза, формирование эндотелиальной дисфункции, иммунного ответа и воспаления. Для исследования использовалась ДНК из банка ДНК НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск). Группа больных сахарным диабетом типа 1 (СД-1) составила 285 человек; сахарным диабетом типа 2 (СД-2) – 96 индивидуумов. У всех больных СД-2 диагностировали ожирение, ишемическую болезнь сердца, артериальную гипертензию и инфаркт миокарда. В качестве контрольной группы была использована популяционная выборка (300 человек). По этнической принадлежности все обследованные являются русскими и проживают в Сибирском регионе (г. Томск, г. Кемерово). Генотипирование выполнено с помощью масс-спектрометрии на приборе Sequenom MassARRAY (США).

В результате проведенного исследования в трех выборках были охарактеризованы частоты аллелей и генотипов следующих полиморфных вариантов: *KRT19* (rs56051972), *ELN* (rs8326), *STXBP5L* (rs17740066), *DDX5* (rs1991401), *MMP1* (rs514921), *MMP3* (rs626750, rs679620), *MMP9* (rs17576, rs3918242), *COL1A1* (rs1107946, rs62062995, rs2075555), *OAS1* (rs111902215, rs1131454), *CD247* (rs6668182), *TGFB1* (rs1800469), *ITGB5* (rs1007856, rs6778643), *AQP2* (rs2878771), *IL28B* (rs12979860), *IGFBP7* (rs6841086), *ADAMDEC1* (rs10087305, rs3765124), *IGFBP7* (rs11133482), *CUX1* (rs803064, rs11540899), *IGFBP6* (rs9325154), *TIMP2* (rs2277698), *CCL8* (rs1133763), *GAS6* (rs77469272), *LIPC* (rs1800588), *TAS2R38* (rs1726866), *LDLR* (rs2738446), *CDKN2A* (rs11515), *ABCA1* (rs3890182), *KIAA1462* (rs3739998), *CETP* (rs708272), *KDR* (rs2071559), *TLR4* (rs4986790), *LIG1* (rs20579), *PARP4* (rs4986819), *APOA2* (rs5082), *CDKN2B-AS1* (rs1333049), *MTAP* (rs7023329), *ITGA4* (rs1143674), *DNMT3A* (rs7590760), *CAMK2D* (rs3733619), *ACSL1* (rs1996546), *IFNL2* (rs12980602), *HTR3B* (rs4938056), *NUP155* (rs12054703), *IFNGR1* (rs1817537), *IFNGR2* (rs41356148), *CD79A* (rs112543324, rs112385835, rs3810153), rs4290029, rs17181457. Во всех исследуемых группах по пяти полиморфным вариантам (*OAS1* rs111902215, *CD79A* rs112385835, *IFNGR2* rs41356148, *COL1A1* rs62062995, *MMP9* rs3918242) был выявлен только

один гомозиготный генотип. Отклонение наблюдаемого распределения генотипов от ожидаемого при равновесии Харди–Вайнберга было зафиксировано в группе контроля для пяти полиморфных маркеров (*IL28B* rs12979860, *CD79A* rs112543324, *MMP9* rs3918242, *GAS6* rs77469272, *IGFBP6* rs9325154). Эти 10 полиморфных вариантов были исключены из дальнейшего исследования.

Ассоциация с СД-1 выявлена для семи маркеров: *MMP3* rs679620 ($p = 0,004$), *ITGB5* rs1007856 ($p = 0,039$), *ITGA4* rs1143674 ($p = 0,002$), *LIG1* rs20579 ($p = 0,003$), *ADAMDEC1* rs3765124 ($p = 0,014$), *IFNL2* rs12980602 ($p = 0,029$), *PARP4* rs4986819 ($p = 0,043$). Гены, SNPs которых показали ассоциацию с СД-1, участвуют в процессах передачи сигнала, обеспечивают клеточные взаимодействия (*ITGB5*, *ITGA4*, *ADAMDEC1*), задействованы в метаболизме белков, нуклеиновых кислот (*MMP3*, *LIG1*, *PARP4*) и регуляции иммунного ответа (*IFNL2*). Эти данные свидетельствуют о том, что в патогенез СД-1, для которого характерна тотальная гибель β -клеток островков Лангерганса, могут быть вовлечены различные биологические процессы.

Для группы СД-2 получены ассоциации со следующими маркерами: *APOA2* rs5082 ($p = 0,035$), *LDLR* rs2738446 ($p = 0,017$), *MTAP* rs7023329 ($p = 0,008$), *CDKN2B* rs1333049 ($p = 0,029$), *KIAA1462* rs3739998 ($p = 0,003$). Генетические маркеры, ассоциированные с СД2, включены в процессы, регулирующие метаболизм, энергетический обмен (*APOA2*, *MTAP*), передачу сигнала, клеточные взаимодействия (*LDLR*, *CDKN2B*) и адгезию эндотелиальных клеток (*KIAA1462*). Патогенез развития СД-2 связан именно с метаболическими нарушениями и инсулинорезистентностью, образующими порочный круг для развития заболевания и присоединения макрососудистых патологических процессов (ишемия, гипертензия).

При сравнении распределения генотипов/аллелей между группами СД-1 и СД-2 статистически значимые различия были получены для пяти полиморфных вариантов, для четырех из которых, как отмечалось выше, показана ассоциация с СД-2 (*LDLR* rs2738446 ($p = 0,048$), *MTAP* rs7023329 ($p = 0,017$), *CDKN2B* rs1333049 ($p = 0,027$), *KIAA1462* rs3739998 ($p = 0,002$)), а для одного – с СД-1 (*IFNL2* rs12980602 ($p = 0,049$)).

В результате проведенного исследования не выявлено общих генетических маркеров, ассоциированных с развитием как СД-1, так и СД-2. Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что генетическая подверженность по изученным маркерам к СД-1 и СД-2 является специфичной. Однако наибольшее количество генов, показавших ассоциацию с СД-1 и СД-2 в настоящем исследовании, относятся к двум биологическим процессам: передаче сигнала и клеточным взаимодействиям. Возможно, данные биологические процессы являются общим звеном в формировании различных форм сахарного диабета.

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА G894T ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Н.С. Фаттахов¹, М.А. Василенко¹, Д.И. Куликов¹, Д.А. Скуратовская¹, А.Ю. Подунов¹, Р.Д. Лаунерт¹, Н.Ю. Кучинская¹, Д.А. Мурзаканова¹, Е.В. Кириенкова¹, П.А. Затолокин², Л.С. Литвинова¹

¹ Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград

² Областная клиническая больница Калининградской области, г. Калининград

Метаболический синдром представляет собой комплекс гормональных, метаболических и клинических нарушений, которые в совокупности обостряют развитие кардиоваскулярных заболеваний. Помимо участия в развитии метаболического синдрома таких факторов внешней среды, как гиподинамия и употребление продуктов высокой калорийности, во множестве работ отмечается генетическая этиология данного симптомокомплекса [1]. У животных, нокаутных по гену эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), катализирующей образование оксида азота в организме и экспрессирующей преимущественно в эндотелиоцитах, развивались артериальная гипертензия, гипертриглицеридемия и инсулинорезистентность [2].

В связи с этим целью настоящего исследования – выявление ассоциации полиморфизма G894T гена eNOS с риском развития метаболического синдрома в российской популяции.

В исследовании принимали участие 38 пациентов с метаболическим синдромом, проходивших лечение в областной клинической больнице Калининградской области (средний возраст $44,1 \pm 7,9$ года; 16 мужчин, 22 женщины; индекс массы тела (ИМТ) от 30,1 до 42,1), контрольную группу составляли 30 здоровых доноров (средний возраст $36,8 \pm 7,3$ года; 13 мужчин, 17 женщин; ИМТ от 18,0 до 24,9), имеющих нормальные антропометрические и биохимические показатели углеводного и липидного обмена. Диагноз «метаболический синдром» устанавливали согласно критериям Международной федерации диабета [3]. Выделение геномной ДНК из периферической венозной крови проводили с использованием коммерческих наборов «ДНК-Экстран-1» согласно протоколу производителя («Синтол», Россия). Исследование генотипов осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Statistica 8.0 (США).

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма G894T гена eNOS (абс., %) в исследуемых группах

| Показатель | Пациенты с метаболическим синдромом | Здоровые доноры | χ^2, p | OR (95%-й CI) |
|------------|-------------------------------------|-----------------|---------------------|------------------|
| GG | 13 (34,2) | 15 (50,0) | 2,03; $p = 0,36$ | 0,52 (0,20–1,39) |
| GT | 18 (47,4) | 12 (40,0) | | 1,35 (0,51–3,56) |
| TT | 7 (18,4) | 3 (10,0) | 2,11; $p = 0,15$ | 2,03 (0,48–8,64) |
| G | 44 (57,9) | 42 (70,0) | | 0,59 (0,29–1,21) |
| T | 32 (42,1) | 18 (30,0) | | 1,70 (0,83–3,47) |

Примечание. χ^2 – стандартный критерий Пирсона для сравнения частот генотипов и аллелей генов; OR – критерий отношения шансов, отражающий относительный шанс развития заболевания при определенном генотипе по сравнению со здоровыми донорами с 95%-м доверительным интервалом.

Таким образом, на основании полученных результатов (таблица) можно сделать вывод, что наблюдается тенденция к увеличению частоты редкого аллеля Т гена eNOS среди пациентов с метаболическим синдромом по сравнению с группой здоровых доноров. Дальнейшее расширение размеров исследуемых выборок позволит определить, является ли носительство данного аллеля у лиц европеоидной расы в российской популяции фактором риска развития метаболического синдрома.

Литература

1. Groop L. Genetics of the metabolic syndrome // Br. J. Nutr. 2000. V. 83 (Suppl. 1). P. S39–48.
2. Duplain H., Burcelin R., Sartori C. et al. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase // Circulation. 2001. V. 104. P. 342–345.
3. Alberti K.G., Zimmet P., Shaw J. IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome: a new worldwide definition // Lancet. 2005. V. 366. P. 1059–1062.

ВАЛИДАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ШИРОКОГЕНОМНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ АССОЦИИЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ С ПОВЫШЕННОЙ ЧАСТОТОЙ МАРКЕРОВ РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

М.В. Халюзова^{1,3}, Н.В. Литвяков^{1,3,4}, Д.С. Исубакова¹, Е.Н. Альбах¹, А.Э. Сазонов^{1,2}, А.Б. Карпов^{1,2}, Р.М. Тахауов^{1,2}

¹ Северский биофизический научный центр ФМБА России, г. Северск

² Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

⁴ НИИ онкологии СО РАМН, г. Томск

Образование хромосомных и генных мутаций в различных клетках-мишенях является характерным эффектом действия ионизирующего излучения (ИИ). Различная степень индукции хромосомных aberrаций (ХА) у отдельных индивидов при одинаковой

дозе может служить показателем индивидуальной радиочувствительности. Ранее для получения данных относительно генетических показателей, которые могли бы использоваться для прогнозирования высокой вероятности индукции ХА при контакте с

ИИ, было проведено широкогеномное исследование на микроматрице Cancer_SNP_Panel ассоциации 1 421 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) с уровнем ХА у 86 работников Сибирского химического комбината (СХК), подвергавшихся хроническому внешнему облучению в диапазоне доз 100–300 мЗв. В результате было идентифицировано 28 SNP, ассоциированных с повышенной частотой кольцевых и дицентрических хромосом (Радиационная биология. Радиозоология. 2013. Т. 53, № 2). Целью этого исследования явилась валидация ассоциации выявленных SNP с повышенной частотой дицентрических и кольцевых хромосом на независимой выборке работников СХК, подвергавшихся радиационному воздействию. Валидацию проводили на выборке, состоящей из 654 облученных работников СХК. Средняя доза внешнего облучения работников СХК составила $(160,9 \pm 9,25)$ мЗв, медиана – 88,23 мЗв, интерквартильный размах – 21,2–213,6 мЗв. Для всех обследованных лиц был проведен стандартный цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови. Генотипирование геномной ДНК проводили методом ПЦР в режиме реального времени с праймерами оригинального дизайна. Ранее была проведена валидация шести

SNP и подтверждена связь с повышенной частотой дицентриков и кольцевых хромосом для пяти SNP: *INSR* rs1051690, *PCTP* rs2114443, *VCAM1* rs1041163, *TNKS* rs7462102, *WRN* rs1800389.

В данном исследовании изучено еще шесть полиморфизмов: rs2288729, rs4227, rs2233679, rs2873950, rs1574154, rs4624596. Было установлено, что минорные генотипы генов apoptotic peptidase activating factor 1 *APAF1* rs2288729, mannose-P-dolichol utilization defect 1 *MPDU1* rs4227, peptidylprolyl cis/trans isomerase *PIN1* rs2233679 связаны с повышенной частотой возникновения кольцевых хромосом. У носителей мутантных генотипов по этим SNP частота кольцевых хромосом была выше в 1,8; 2,4 и 2,6 раза соответственно, чем у носителей мажорных и гетерозиготных генотипов. Ассоциацию полиморфизмов гена glycogen synthase kinase 3 beta *GSK3B* rs2873950, rs1574154, rs4624596 с повышенной частотой индукции дицентрических и кольцевых хромосом подтвердить не удалось.

Представленные результаты свидетельствуют о высокой значимости SNP, идентифицированных в результате микроматричных исследований, для прогнозирования риска индукции повышенного уровня ХА на фоне радиационного воздействия.

О ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОМ ЗНАЧЕНИИ КОМБИНАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ –889С/Т *IL-1A*, –511С/Т *IL-1B* И –113 Т/М *IL-9* ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ КАЛЬКУЛЕЗНОМ ХОЛЕЦИСТИТЕ

О.В. Черкашина

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород

Введение

Желчнокаменная болезнь (ЖКБ) является актуальной медицинской и социальной проблемой. До 10–15% взрослого населения страдают данным заболеванием. Статистические исследования последних десятилетий свидетельствуют о том, что за каждые 10 лет количество больных увеличивается почти в 2 раза [1]. Изучение механизмов развития и патогенеза ЖКБ является одной из наиболее важных проблем в современной медицине. В патогенезе формирования камней и прогрессирования заболевания выделяют два основных механизма: обменный и воспалительный [2, 3]. В ряду факторов риска ЖКБ важную роль играют генетические факторы [4]. Среди генов, участвующих в процессах воспаления, значимая роль отводится интерлейкинам.

Целью данного исследования стало изучение роли комбинации генетических вариантов интерлейкинов –889С/Т *IL-1A*, –511С/Т *IL-1B* и –113Т/М *IL-9* в формировании хронического калькулезного холецистита (ХКХ).

Материал и методы

Материалом для исследования стали данные ДНК типирования полиморфизмов генов –889С/Т *IL-1A*, –511С/Т *IL-1B* и –113Т/М *IL-9* у 250 больных ХКХ и 294 человек популяционного контроля. Биоинформатическое исследование проведено с помощью программного обеспечения APSampler, использующего метод Монте-Карло марковских цепей и байесовскую непараметрическую статистику. Представленные далее статистически значимые данные

получены с использованием пермутационного теста, т.е. статистической процедуры, минимизирующей вероятность получения ложноположительных результатов.

Результаты

В результате исследования сочетания аллелей –889Т *IL-1A*, –511Т *IL-1B* и –113Т *IL-9* выявлены статистически значимые различия между больными ХКХ и популяционным контролем по частоте: сочетание аллелей –889Т *IL-1A*, –511Т *IL-1B* и –113Т *IL-9* у больных ХКХ составляет 63,37%, тогда как в контрольной группе – 40,23% ($p_f = 0,0002$; $p_{perm} = 0,0001$; OR = 2,57; 95%-й CI 1,54–4,30).

Выводы

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что сочетание аллелей –889Т *IL-1A*, –511Т *IL-1B* и –113Т *IL-9* является фактором риска развития хронического калькулезного холецистита.

Литература

1. Ивашкин В.Т. Болезни печени и желчевыводящих путей: руководство для врачей. М.: М-Вести, 2002. 416 с.
2. Никитенко Т.М. Показатели литогенности желчи, липидов сыворотки крови и воспаление слизистой желчного пузыря у женщин с холестериновой желчнокаменной болезнью // Бюл. СО РАМН. 2006. Т. 122, № 4. С. 160–163.
3. Полунина Т.Е. Желчнокаменная болезнь // Лечащий врач. 2005. № 2. С. 27–32.
4. Мараховский Ю.Х. Желчнокаменная болезнь: современное состояние проблемы // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2003. Т. 1, № 1. С. 81–92.

РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ RS1799750 И RS484915 ГЕНА *MMP1* В РАЗВИТИИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ ЖЕЛУДКА И ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН

Э.Х. Шаймарданова¹, А.Х. Нургалиева¹, Я.В. Валова¹, А.А. Гизатуллина¹,
Д.Д. Надыршина¹, Л.В. Габбасова³, О.А. Курамшина³, А.Я. Крюкова³,
И.М. Хидиятова^{1,2}, Э.К. Хуснутдинова^{1,2}

¹ Башкирский государственный университет, г. Уфа

² Институт биохимии и генетики, Уфимский научный центр РАН, г. Уфа

³ Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Язвенная болезнь (ЯБ) – это хроническое заболевание желудочно-кишечного тракта, основным проявлением которого является формирование достаточно стойкого язвенного дефекта слизистой оболочки желудка и (или) двенадцатиперстной кишки [2]. Распространенность язвенной болезни двенадцатиперстной кишки (ЯБДПК) составляет от 6 до 15% [2], распространенность язвенной болезни желудка (ЯБЖ) в 3–4 раза ниже, чем дуоденальной язвы [3]. Внеклеточный матрикс слизистой оболочки желудка состоит из нескольких видов макромолекул, таких как коллаген, ламинин, эластин, фибронектин и гаилуроновая кислота, и ее деградация играет важную роль в формировании язвы желудка и двенадцатиперстной кишки [4]. Известно, что матричные металлопротеиназы (ММП) представляют собой семейство ферментов, которые разрушают все белки внеклеточного матрикса [5], но и участвуют в воспалительной реакции слизистой оболочки желудка, являясь идеальными генами-кандидатами для генетических исследований предрасположенности к ЯБ [4]. Важную роль в патогенезе заболевания играет коллагеназа (ММП-1), получившая свое название за способность расщеплять коллаген I типа, а кодирующий его ген *MMP1* картирован на длинном плече хромосомы 11 [6].

Целью данного исследования являлось проведение анализа ассоциаций полиморфных вариантов rs1799750 и rs484915 гена *MMP1* с язвенной болезнью в Республике Башкортостан.

Было обследовано 238 больных (ЯБЖ (37 человек); ЯБДПК (201 человек)) различного этнического происхождения (русские, татары, башкиры), среди которых 106 индивидов были инфицированы бактерией *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Контрольную группу составили 254 практически здоровых индивида без признаков желудочно-кишечной патологии. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование проводили с помощью полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами и последующей рестрикцией.

При разделении групп испытуемых на подгруппы согласно этнической принадлежности установлено, что гетерозиготный генотип rs484915*A/G является маркером повышенного риска развития изучаемой патологии для лиц русской и татарской этнической принадлежности ($p = 0,02$; $\chi^2 = 4,83$;

OR = 1,86; 95%-й CI 1,06–3,25 и $p = 0,001$; $\chi^2 = 10,19$; OR = 2,58; 95%-й CI 1,43–4,66 соответственно). Также выявлена ассоциация генотипа rs484915*A/G с риском развития ЯБ у мужчин ($p = 0,005$; $\chi^2 = 7,74$; OR = 1,79; 95%-й CI 1,18–2,70). Установлено, что у лиц татарской этнической принадлежности в контрольной группе статистически значимо чаще (53,61% случаев), чем в группе больных (36,78% случаев), встречался генотип rs484915*A/A ($p = 0,01$; $\chi^2 = 6,16$; OR = 0,48; 95%-й CI 0,27–0,86), подобная статистически значимая закономерность обнаружена и для мужчин – частота встречаемости гомозигот rs484915*A/A у больных и здоровых индивидов – 41,66 и 54,21% соответственно ($p = 0,01$; $\chi^2 = 6,02$; OR = 0,61; 95%-й CI 0,40–0,91). При анализе распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs1799750 обнаружено, что русские, носители генотипа 1G/1G, и татары с генотипом 2G/1G имеют повышенный риск развития ЯБ ($p = 0,05$; $\chi^2 = 7,65$; OR = 2,7; 95%-й CI 1,37–5,30 и $p = 0,03$; $\chi^2 = 4,25$; OR = 1,94; 95%-й CI 1,07–3,51 соответственно). Также выявлено, что для татар сочетание генотипов A/A-2G/2G полиморфных вариантов rs1799750 и rs484915 гена *MMP1* является маркером пониженного риска развития ЯБ ($p = 0,04$; $\chi^2 = 3,91$; OR = 0,12; 95%-й CI 0,01–1,00). Таким образом, в результате проведенного исследования было показано, что полиморфные варианты rs1799750 и rs484915 гена *MMP1* могут вносить вклад в развитие ЯБ.

Литература

1. Hayat K.S., Ul H.M., Shahzad A.A. Perforated peptic ulcer a review of 36 cases // Professional Med. J. Mar. 2011. V. 18. P. 124–127.
2. Бебурешвили А.Г., Михин И.В., Зюбин Е.Н. Язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки // Метод. рекомендации для врачей. Волгоград, 2007. 72 с.
3. Christie D.A., Tansey E.M. Peptic Ulcer: Rise and Fall // Welcome Witnesses to Twentieth Century Medicine. 2002. V. 14. 157 p.
4. Hellmig S., Ott S., Rosensteil R. et al. Genetic variants in matrix metalloproteinase genes are associated with development of gastric ulcer in *H. pylori* infection // Gastroenterology. 2005. V.101. P. 29–35.
5. Клишова Е.В., Кондакова И.В., Е.Л. Чойнзонов Е.Л. Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе // Сиб. онколог. журнал. 2003. № 2. С. 62–71.
6. Gerhard D.S., Jones C., Bauer E.A. et al. Human collagenase gene is localized to 11q // Cytogenet. Cell Genet. 1987. V. 46. P. 619.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ БИОГЕНЕЗА ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ В ЕВРОПЕОИДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ СИБИРИ

Е.В. Шахтшнейдер, Ю.И. Рагино, В.Н. Максимов, Ю.П. Никитин, С.К. Малютина, М.И. Воевода

НИИ терапии и профилактической медицины СО РАМН, г. Новосибирск

Введение

Структурная патология генов, участвующих в биогенезе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), может приводить к развитию тяжелых форм дислипидемии. Цель работы – изучение молекулярно-генетической основы структурных изменений в генах *ABCA1*, *APOA1*, *APOCIII*, *CETP*, *SR1B* как фактора риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Материал и методы

Исследование проведено на популяционной репрезентативной выборке европеоидного населения г. Новосибирска в возрасте 45–69 лет, общее количество основной выборки 9 360 человек, из них 50% мужчин и 50% женщин (проект НАРПЕЕ). Для анализа методом случайных чисел сформирована подвыборка 300 человек, средний уровень общего холестерина сыворотки (ОХС) 234 мг/дл. Для всех обследованных получено информированное согласие. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НИИ терапии и профилактической медицины» СО РАМН (г. Новосибирск).

Забор крови из локтевой вены проводился утром натощак через 12 ч после приема пищи. Показатели липидного профиля крови: ОХС, триглицериды (ТГ), холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) – определены энзиматическим методом с использованием стандартных реактивов Bioson (Германия) на биохимическом анализаторе FP-901 Labssystem. Показатель холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) рассчитан по формуле W.T. Friedewald и соавт. (1972). ДНК выделена из крови методом фенолхлороформной экстракции по модифицированной методике (К. Смит, 1990). Полиморфизм генов *APOA1*, *APOCIII*, *ABCA1*, *CETP*, *SR-B1* анализировался с использованием методов PCR-RFLP. Статистическая обработка результатов проведена с использованием пакета статистических программ SPSS for Windows 12.

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование выявило ассоциацию полиморфизма –75G>A гена *APOA1* с некоторыми параметрами липидного профиля крови: ОХС, ХС-ЛПНП, индексом атерогенности (ИА). Редкий аллель А ассоциирован с атерогенным липидным профилем крови.

В исследовании выполнен анализ 3238C>G (Sst1) полиморфизма гена *APOCIII* (rs5128). Частота

генотипов соответствует теоретически ожидаемой и находится в равновесии Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 0,059$; $p = 1$). Частота аллелей полиморфизма гена *APOCIII* составила Sst1+ 87,8%, Sst1– 12,2%. Частота распространенности минорного аллеля Sst– соответствует другим европеоидным популяциям (0,09–0,16). Для генотипов Sst1–/– определено повышение средних значений ОХС, ХС-ЛПНП, ИА.

Частота генотипов полиморфизма V771M (замена G на A) гена *ABCA1* в популяции соответствует теоретически ожидаемой и находится в равновесии Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 0,965$; $p = 0,58$). Частота аллеля V составила 89%, частота аллеля M – 11%. Частота генотипов VV, VM, MM в популяции составила 80,4; 17,4 и 2,2% соответственно. Также был выполнен анализ полиморфизма R219K гена *ABCA1*. Частота аллеля R составила 75%, частота аллеля K – 25%. Частота генотипов RR, RK, KK в популяции составила 53, 44 и 3% соответственно. Частота генотипов в популяции соответствует теоретически ожидаемой и находится в равновесии Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 2,501$; $p = 0,19$).

Частота аллелей полиморфизма Taq1B гена *CETP* составила: B1 – 53,5%, B2 – 46,5%. Частота генотипов B1B1, B1B2, B2B2 – 39,3; 46,4 и 14,3% соответственно. Проведена оценка соответствия частоты генотипов равновесию Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 2,920$; $p = 0,12$). У мужчин в популяционной группе выявлена ассоциация полиморфизма Taq1B гена *CETP* с уровнем холестерина липопротеинов высокой плотности ($p < 0,05$). Генотип B2B2 ассоциирован с высоким уровнем ХС-ЛПВП и низкими значениями ОХС, ХС-ЛПНП, ИА.

Частота генотипов полиморфизма гена *SR1B* в популяции соответствует теоретически ожидаемой и находится в равновесии Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 0,356$; $p = 0,66$). Ассоциации с изменениями уровня липидов крови в популяционной группе не выявлены.

Частота аллелей и генотипов полиморфизмов генов *APOA1*, *APOCIII*, *ABCA1*, *CETP*, *SR-B1* в европеоидной популяции Западной Сибири статистически значимо не отличается от популяционной частоты в странах Центральной и Восточной Европы. Данные, полученные на европеоидной популяции Западной Сибири, не противоречат ранее выявленным ассоциациям с нарушениями липидного обмена в других странах. Особенности полиморфизма генов *APOA1*, *APOCIII*, *ABCA1*, *CETP*, *SR-B1* не являются определяющими детерминантами высокого уровня распространенности и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в европеоидной популяции Западной Сибири.

Раздел 4

МЕДИЦИНСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА. МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ

ОСОБЕННОСТИ МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНСУЛЬТИРОВАНИЯ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ

Н.И. Барбова

*Центр репродуктивного здоровья и медицинской генетики Института матери и ребенка
Республики Молдова, г. Кишинев*

Открытие молекулярно-генетической природы первичного дефекта при муковисцидозе (МВ), а также разработка информативных и практических методов тестирования наиболее распространенных мутаций повышает эффективность профилактических мероприятий. Одним из важнейших этапов в профилактике МВ является медико-генетическое консультирование (МГК) в семьях высокого риска.

Основная задача МГК с медицинской точки зрения заключается в составлении медико-генетического прогноза для обратившейся за консультацией семьи. Существенным компонентом генетического консультирования и тестирования является оценка генетического риска [1]. Генетический риск (вероятность рождения ребенка с наследственной патологией) оценивается как низкий и не считается противопоказанием к деторождению в данной семье, если он не превышает 5%. Риск от 6 до 20% принято считать средним. Если генетический риск выше 20%, семья относится к категории высокого риска [2–4].

МВ (*Cystic Fibrosis*) – наиболее частая из моногеннонаследуемых полиорганная патология, обусловленная мутацией гена *CFTR* – регулятора трансмембранной проводимости ионов хлора [5]. Тип наследования заболевания – аутосомно-рецессивный. Патогенез болезни обусловлен мутациями в обоих аллелях одного гена, локализованного на 7q31.2. Известно более 1 900 мутаций в гене *CFTR*. Самая частая (70%) из них – F508del [6–8].

Предыдущими исследованиями было показано, что в Молдове на современном этапе доминирует клиническая диагностика МВ, так как в 37,4% случаев мутации гена *CFTR* остаются неидентифицированными и лишь в 16,3% удается идентифицировать обе мутации гена *CFTR*. В нашей стране мутация F508del встречается с частотой 58,0% [9].

Одним из эффективных способов профилактики МВ является пренатальная диагностика в семьях высокого риска. С этой целью используются молекулярно-генетические методы исследования в первом или во втором триместре беременности. Выявление мутаций гена *CFTR* у плода позволяет с абсолютной достоверностью устанавливать его генетический статус, а также решать вопрос о целесообразности сохранения или прерывания беременности [3, 9].

Актуальность исследования продиктована тем, что генетическое консультирование семей высокого риска МВ в условиях нашей страны имеет ряд особенностей, связанных с трудностями клинической и

молекулярной диагностики, отсутствием неонатального скрининга и достоверных данных о частоте МВ в популяции Республики Молдова.

Цель исследования – оценить эффективность МГК в семьях с высоким генетическим риском МВ.

Материал и методы

Проведен анализ результатов ретроспективного МГК за период с 2001 по 2013 г. 58 семей, в которых 67 детей в возрасте от 1 мес до 18 лет (35 мальчиков и 32 девочки) были больны МВ. МГК семьи с МВ сводилось к следующим этапам: установление клинического диагноза МВ; ДНК-диагностика и оценка ее результатов; разъяснение консультирующимся степени генетического риска и возможностей проведения пренатальной диагностики в этой семье; помощь врача в принятии решения относительно дальнейшего репродуктивного поведения; применение пренатальной диагностики в «информативных» семьях в случае продолжения деторождения.

Методы исследования на предварительном этапе: клинико-генеалогический и лабораторно-биохимические методы с целью определения концентрации ионов хлора в поте. Клинический диагноз МВ устанавливался на основании характерных клинических симптомов или случая МВ в семье, положительной потовой пробы (более 60 ммоль/л на аппарате Macroduct) или идентифицированных мутаций гена *CFTR* [10]. ДНК-диагностика проводилась сотрудниками лаборатории молекулярной генетики Центра репродуктивного здоровья и медицинской генетики Института матери и ребенка (г. Кишинев).

После установления клинического диагноза МВ всем больным и их родителям, а в отдельных семьях и сибсам проводилась ДНК-диагностика. В случае идентификации одной или двух мутаций гена *CFTR* семья считалась «частично информативной» или «информативной» соответственно, и при повторном МГК обсуждались возможности проведения дородовой диагностики МВ в каждой конкретной семье.

Все консультируемые семьи были разделены на три группы. В I группу вошли 42 семьи, имеющие по одному ребенку, страдающему МВ, во II группу – 8 семей, в которых было двое и более детей с МВ, а III группу составляли 8 семей, в которых были умершие от МВ дети.

Анализ эффективности МГК в перечисленных группах семей проводился автором на основе катamnестических наблюдений с учетом 22-летней практики консультирования семей с МВ, проживаю-

щих в Республике Молдова. Оценка эффективности МГК при МВ проводилась путем анализа репродуктивного поведения супругов. Оценивались следующие показатели: информированность родителей о заболевании ребенка, т.е. уровень понимания ими полученной генетической информации; «информативность» семьи и принятие решения о дальнейшем деторождении после МКГ. При этом решение о дальнейшем деторождении принимали сами супруги, получившие максимально объективную информацию.

Результаты и обсуждение

В I группе консультирование было ретроспективным, так как семьи обращались к врачу-генетику уже после рождения ребенка с МВ. По возрастному составу больные распределились следующим образом: в возрасте до 5 лет – 26,2%, 5–10 лет – 21,4% детей, больные от 10 до 13 лет составили 9,5%, преобладала возрастная группа от 13 до 18 лет – 42,9%. Смешанной формой МВ страдали 81,0% больных, легочной – 11,9%, кишечной – 7,1% детей. У большинства пациентов (71,4%) отмечалось тяжелое течение болезни, у 28,6% – средней тяжести.

Три четверти опрошенных родителей из этой группы знали причину заболевания и были информированы о генетическом риске заболевания МВ следующего ребенка с вероятностью 25%. Шесть (14%) семей являлись полностью «информативными» для пренатальной диагностики, так как у них были идентифицированы обе мутации гена *CFTR*, а у 20 (48%) семей было выявлено по одной мутации гена *CFTR*, т.е. они являлись «частично информативными» для пренатальной диагностики. В 62% случаев больной МВ являлся единственным ребенком в семье, однако ни одна семья не воспользовалась возможностями дородовой диагностики и пока воздерживается от рождения детей. Анализ результатов МГК семей I группы показал, что в процессе консультирования возникают не только генетические и медицинские, но и этические проблемы. Нормальные семейные взаимоотношения до установления диагноза наблюдались во всех 42 семьях этой группы, после установления диагноза 16 семей распались. Около 80% матерей боялись повторной беременности, хотя каждая из них мечтала о здоровом ребенке. Отец одного ребенка имел здоровую дочь в предыдущем браке, а учитывая, что мутация была идентифицирована у его больной дочери от второго брака и у жены, решил, что в ее болезни виновата только жена, и отказался от ответственности за лечение ребенка. Такая модель поведения отцов, когда в болезни ребенка обвиняется только его мать, встречалась в каждой четвертой семье этой группы.

Во II группу вошли 8 семей, в которых было 14 детей, страдающих МВ. Среди пациентов было 4 девочки и 12 мальчиков. В двух семьях было по трое больных МВ, в остальных шести – по двое больных детей. Учитывая неуклонное прогрессирование хронической инфекции в легких и тяжелое течение МВ у больных этой группы, на настоящий момент в 4 семьях осталось по двое больных детей, а в двух семьях – по одному ребенку. Возраст умерших колебался от 1 года до 22 лет. Изучение семей из этой группы позволило выяснить влияние диагноза МВ на планирование деторождения. По-

вторные случаи рождения детей с МВ в каждой из этих семей заставили родителей изменить репродуктивное поведение и воспользоваться советом генетика о возможной пренатальной диагностике с целью рождения здорового ребенка. В 4 семьях дородовая диагностика МВ не проводилась: в одной семье по религиозным убеждениям родителей, в остальных семьях из-за отсутствия необходимых генетических знаний у родителей и ложной уверенности в том, что следующий ребенок обязательно будет здоров. Две трети отцов и матерей этой группы имели среднее образование, одна треть – высшее.

На рис. 1 представлена родословная семьи верующих, у которых было 3 детей с МВ, двое из них умерли. Всего у женщины было 15 беременностей, две из которых завершились выкидышами в первом триместре, что не исключает наличие МВ у этих абортусов. Остальные 8 детей в семье здоровы. После рождения от седьмой беременности дочери, страдающей МВ, были идентифицированы обе мутации в гене *CFTR*, что позволило рекомендовать семье дородовую диагностику, но родители отказались по религиозным убеждениям, что привело в дальнейшем к рождению еще одной больной дочери, умершей в возрасте до 1 года. В данной семье МГК можно считать неэффективным.

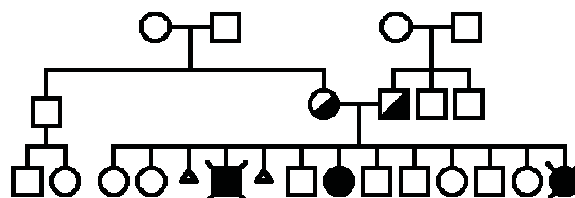


Рис. 1. Родословная семьи К.

Еще в одной семье, в которой был больной тяжелой формой МВ, гомозигота по мутации *F508del*, была запланирована пренатальная диагностика, но мать ребенка не явилась на процедуру из-за боязни ошибки врачей, хотя семья была полностью «информативной». Родившуюся дочку не показывали специалистам. Диагноз МВ был установлен в 5 лет, но даже сейчас родители не проводят лечение в полном объеме, отказываясь верить в диагноз и снижая тем самым эффективность терапии. Оба родителя в этой семье имеют высшее образование. Можно заключить, что уровень их понимания полученной генетической информации оказался низким, а рождение больного МВ ребенка – результат неэффективного МГК.

Резюмируя вышесказанное, можно констатировать, что в семьях, где двое и более детей больны МВ, родители мечтают о рождении здорового ребенка, но не используют метод пренатальной диагностики как один из эффективных способов профилактики МВ. Возрастает роль врача-генетика в работе с такими семьями. Она заключается в детальном информировании родителей о смысле и результатах проведенных исследований, а также в детальном объяснении всех нюансов существующей ситуации и прогноза.

Особенностью МГК I и II групп семей с МВ было альтернативное поведение консультирующихся, направленное как на желание предупредить появление больного ребенка в семье, так и на адаптацию к диагнозу МВ. Дети, страдающие МВ, нужда-

ются в ежедневном и систематическом комплексном лечении (регулярный прием ферментов, муколитиков, антибиотиков и других лекарственных препаратов, проведение кинезитерапии). Участие родителей в этом процессе обязательно. В беседе с врачом почти все родители отмечали, что они отказываются от рождения здорового ребенка в пользу ухода за больным МВ и увеличения продолжительности и качества его жизни. Долг врача в случае принятия пациентами такого решения, иррационального с точки зрения здравого смысла, проинформировать родителей об ограниченной продолжительности жизни больных МВ. В этом случае врач-генетик должен полагаться на решение, принятое консультирующимися, как наиболее подходящее в психологическом отношении для данной семьи.

Таким образом, можно констатировать, что МКГ в первых двух группах наряду с целью профилактики МВ имело цель достижения психологического благополучия в адаптации к риску и самому заболеванию.

В III группу вошли 8 семей, в которых не было здоровых детей, но были умершие от МВ. Возраст умерших колебался от 1,5 мес до 18 лет. В 6 семьях было по одному умершему ребенку, в 2 семьях умерли по двое – трое детей с МВ. В 2 семьях дети умерли в возрасте 18 и 22 лет. Учитывая возраст родителей (45–50 лет), в этих семьях не думали о последующем рождении детей. Одна семья из этой группы, несмотря на детородный возраст родителей, отказалась от последующего рождения детей. Половина семей согласилась на рождение следующего ребенка под контролем дородовой диагностики.

На рис. 2 представлена родословная семьи М., в которой было 4 детей: здоровая дочь 16 лет погибла в результате несчастного случая, мальчик 3,5 года и 2 девочки-близнецы умерли в возрасте соответственно 1,5 и 3,5 мес от МВ. После проведения пренатальной ДНК-диагностики МВ родился здоровый мальчик, которому в настоящее время 17 лет.

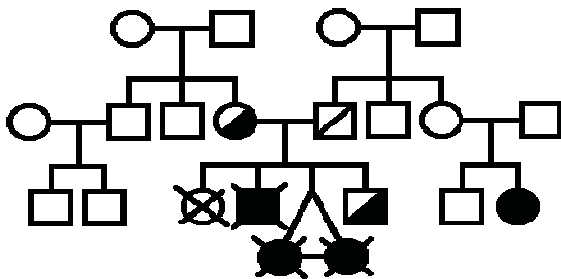


Рис. 2. Родословная семьи М.

Особенностью дородовой диагностики в другой семье было то, что родители обратились за помощью к врачу-генетику, когда женщина уже была беременна, а двое детей в семье умерли ранее от МВ: мальчик в возрасте 4 дней и девочка в возрасте 3 мес. При жизни дети не были обследованы, диагноз был выставлен на основании патоморфологических исследований. Молекулярно-генетическими методами было установлено, что оба родителя являются гетерозиготными носителями наиболее распространенной при МВ мутации F508del, это позволило предположить, что у умерших детей эта мутация была в гомозиготном состоянии. Она привела к ранней манифестации МВ, а при отсутствии соответ-

ствующего лечения – к ранней смерти детей. Учитывая 100%-ю информативность семьи и желание родителей иметь здорового ребенка, была предложена пренатальная ДНК-диагностика с целью предупреждения рождения больного МВ. Молекулярно-генетические исследования показали, что от родителей будущая дочь унаследовала лишь один аллель с мутацией F508del и фенотипически будет здорова. В дальнейшем родилась здоровая девочка.

В результате проведенной дородовой диагностики в 4 семьях из этой группы родились четверо здоровых детей. В половине из этих семей родители имели высшее образование и проживали в городской местности, в другой половине – среднее и проживали в сельской местности. Ни одна из семей не распалась во многом благодаря надежде родить здорового ребенка, базирующейся на информации, полученной при генетическом консультировании и результатам ДНК-тестирования семьи.

Подводя итоги изучения влияния МВ на планирование деторождения в семьях, в анамнезе которых были умершие от этой тяжелой наследственной патологии дети, можно сказать, что в половине случаев родители настаивают на проведении дородовой диагностики. Образование родителей и проживание в городской или сельской местности не влияет на принятие ими решения относительно обращения к врачу-генетику.

В процессе генетического консультирования при МВ в 57 семьях из 58 консультируемых возникали трудности морально-этического характера. Эти проблемы появляются на этапе уточнения диагноза, так как МВ является тяжелым наследственным заболеванием, а также при выявлении носительства патологического гена у родителей. После первой консультации генетика родители очень часто испытывают шок, им необходимо время для осмысления и понимания той информации о МВ, которую они получают от врача. Роль врача-генетика заключается в корректном отношении к проблемам семьи и поиску взаимопонимания.

В таблице представлены сравнительные данные, собранные в ходе МКГ анализируемых семей.

Результаты медико-генетического консультирования семей с высоким риском муковисцидоза, %

| Показатель | Группа | | |
|--|--------|-------|--------|
| | I | II | III |
| Образование матерей: | | | |
| среднее | 66,7 | 50,0 | 50,0 |
| высшее | 33,3 | 50,0 | 50,0 |
| Образование отцов: | | | |
| среднее | 71,4 | 50,0 | 62,5 |
| высшее | 28,6 | 50,0 | 37,5 |
| Проживание в городской местности | 40,5 | 50,0 | 37,5 |
| Проживание в сельской местности | 59,5 | 50,0 | 62,5 |
| Информированность родителей о генетической природе МВ | 66,7 | 66,7 | 100,0 |
| Выявлены две мутации | 14,3* | 33,3 | 50,0 |
| Идентифицирована одна мутация | 47,6 | 50,0 | 25,0* |
| Неинформативные семьи | 38,1 | 16,7* | 25,0 |
| Проведена пренатальная диагностика | 0 | 0 | 50,0** |
| Эффективность МКГ (больные дети не родились или родились здоровые) | 90,5 | 66,7* | 100,0 |

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$.

Уровень образования матерей во всех группах не имел значимых отличий. Так, число матерей с высшим образованием в I группе составило 33,3%, а во II и в III группах – по 50%. Среди отцов I группы 28,6% имели высшее образование, что было статистически значимо ниже соответствующего показателя во II и III группах (по 50%). Из таблицы видно, что 40,5% семей I группы, половина семей II группы и 37,5% семей III группы проживали в городской местности. Несмотря на то что большинство семей из III группы проживали в сельской местности, только в этой группе проводилась дородовая диагностика. Самый высокий уровень информированности родителей о генетических аспектах МВ наблюдался в III группе, возможно, это связано еще и с отягощенным анамнезом в этих семьях и желанием избавиться от чувства вины, присущей родителям, потерявшим ребенка от тяжелого наследственного заболевания. Семьи из первых двух групп не воспользовались возможностями дородовой диагностики, хотя количество «неинформативных» семей в I группе составило 38,1%, а во II группе лишь 16,7%. В качестве критерия эффективности МГК расценивалось предупреждение рождения больного МВ. В III группе эффективность МГК составила 100,0%, так как в ней не только не родились больные дети, но и появились здоровые. В I и II группе этот показатель составил соответственно 90,5 и 66,7%, потому что в семьях из этих групп родились больные МВ дети.

Подводя итоги изучения влияния МВ на планирование деторождения в семьях с МВ, можно сказать, что рождение здорового ребенка под контролем дородовой диагностики отмечено в 50% случаев в тех семьях, где были умершие от МВ дети. Образование родителей и проживание в городской или сельской местности не влияло на принятие ими решения относительно обращения к врачу-генетику.

Лишь в 6 семьях из 58 обследованных родились здоровые дети, что составляет 10,3% от общего числа. Наследственный анамнез в этих семьях был отягощен наличием от одного до трех умерших от МВ детей. При этом 12 семей (20,7%) были полностью «информативными» (идентифицированы обе мутации), что позволяет практически в 96–100% случаев гарантировать рождение здорового ребенка. Еще 15 (25,9%) семей были частично «информативными», что значительно снижало возможности пренатальной диагностики соответственно до 48–50%, но она была возможна. «Неинформативными» (не идентифицированы обе мутации гена *CFTR*) оказалось 19 семей, что составило 32,8% от общей выборки. Получив от врача достоверную информацию о высоком генетическом риске в сочетании с нецелесообразностью применения дородовой диагностики, родители приняли решение отказаться от последующего деторождения. В 6 семьях (10,3%) из 58 проконсультированных родились дети, больные МВ. Это означает, что эффективность МГК в обследованных семьях с МВ составила 89,7%. Учитывая, что, по данным литературы, эффективность МГК при наследственной патологии составляет 60–90% [2], можно констатировать что МГК является высокоэффективным методом профилактики МВ в семьях высокого генетического риска этого тяжелого наследственного заболевания.

Таким образом, критерием эффективности МГК в семьях с МВ являлось изменение поведения суп-

ругов, обращающихся в консультацию по вопросам деторождения. Главный итог МГК 58 семей, отягощенных МВ, что в 52 из них не родились больные дети (без консультации они бы родились): в 6 семьях родились здоровые дети после предварительного ДНК-исследования плода, а 46 семей не планировали рождение следующего ребенка.

Выводы

1. Медико-генетическое консультирование является необходимым звеном медицинской помощи семьям с наследственной отягощенностью муковисцидозом, эффективность его составляет 89,7%.

2. Основными его этапами является уточнение диагноза «муковисцидоз» с помощью молекулярно-генетических методов, определение медико-генетического прогноза в семье и выбор профилактических мероприятий для предупреждения рождения больного ребенка.

3. Хорошая информированность родителей о высоком генетическом риске при МВ влияет на принятие решения об изменении репродуктивного поведения, основанного на собственных ценностях и обстоятельствах жизни.

4. При уточнении диагноза МВ часто возникают трудности морально-этического характера. Проблема разрешается корректным отношением врача к пациенту.

5. Применение пренатальной ДНК-диагностики в «информативных» семьях высокого генетического риска МВ позволяет избежать рождения больного ребенка.

Литература

1. Петрова Н.В. Молекулярно-генетические и клинико-генотипические особенности муковисцидоза в российских популяциях: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2009. С. 3, 28.
2. Козлова С.И., Демикова Н.С. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование: атлас-справочник. М.: Т-во научных изданий КМК; Авторская академия, 2007. С. 328–366.
3. Ощепкова О.М., Семинский И.Ж. Современные аспекты медико-генетического консультирования // Сиб. мед. журнал. 2009. № 4. С. 5–9.
4. Иллариошкин С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование. М.: МИА, 2004. С. 61–62, 134–165.
5. Муковисцидоз (современные достижения и актуальные проблемы): метод. Рекомендации / под ред. Н.И. Капранова, Н.Ю. Каширской. М., 2008. С. 5, 45.
6. Riordan J.M., Rommens J.M., Kerem B. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA // *Sciens*. 1989. № 245. С. 1066–1073.
7. Резник Б.Я., Бабий И.Л., Лившиц Л.А. Муковисцидоз у детей и подростков. Киев, 1994. С. 80–86.
8. Барбова Н.И., Егоров В.В., Широкова Н.А. Эффективность пренатальной диагностики муковисцидоза в Республике Молдова // XI Национальный конгресс по муковисцидозу с международным участием «Муковисцидоз у детей и взрослых» М., 24–25 мая, 2013. С. 11.
9. Барбова Н.И., Егоров В.В., Гаврилюк А.П., Стратула М.С. Пренатальная диагностика муковисцидоза в Республике Молдова // *Mater. Conf. Națion. «Mucoviscidoza la copii»*. 21 noiembrie 2008. Chișinău, 2008. С. 16–21.
10. Rosenstein B.J., Cutting G.R. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel // *J. Pediatr*. 1998. № 132. С. 589–595.

АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ СРЕДИ НОВОРОЖДЕННЫХ БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

С.В. Виноглядова¹, И.Н. Сорокина², И.С. Белозерова², К.О. Порохина²

¹ Белгородская областная клиническая больница Святого Иоасафа, г. Белгород

² Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород

Значимое место в структуре наследственной патологии человека занимают болезни обмена веществ, которые встречаются с разной частотой во всех популяциях. Болезни обмена, как правило, имеют тяжелые и необратимые последствия. Для ряда наследственных болезней обмена разработаны методы лечения, эффективные при их ранней диагностике [1]. Одной из наиболее часто встречающихся патологий новорожденных является фенилкетонурия (ФКУ), для которой при условии начала терапии на раннем доклиническом этапе разработаны эффективные способы лечения [2].

В настоящее время термином «фенилкетонурия» (ФКУ) объединяют несколько клинически сходных, но генетически гетерогенных заболеваний: классическую ФКУ, или ФКУ I типа, обусловленную дефицитом печеночного фермента – фенилаланин-гидроксилазы (ФАГ), и атипичные (злокачественные) формы болезни, связанные с дефектом птеринового кофактора: ФКУ II, III типов и некоторые другие варианты [3]. Дефицит ФАГ приводит к гиперфенилаланинемии, которая оказывает токсическое влияние на центральную нервную систему и при отсутствии с самых первых дней жизни ребенка соответствующей коррекции сопровождается поражением головного мозга и развитием умственной отсталости.

Следует также отметить, что популяционно-генетические аспекты данного заболевания изучены лишь в отдельных регионах Российской Федерации [1–6], хотя разработка вопросов генетической эпидемиологии НБО принципиально важна как с практической, так и с теоретической точек зрения.

Цель работы – изучить частоту и популяционные особенности распространенности ФКУ среди новорожденных в Белгородской области (21 район) за период с 2006 по 2013 г.

В работе проанализированы данные областной медико-генетической консультации по количеству родившихся детей с наследственной патологией обмена веществ. Изучены показатели рождаемости в каждом из 21 районов Белгородской области с 2006 по 2013 г. (данные управления статистики Белгородской области). Охват неонатальным скринингом в Белгородской области составляет 100%.

За 8-летний период в Белгородской области обследовано 133 134 новорожденных. В период новорожденности диагноз «фенилкетонурия» был установлен у 17 детей. Частота встречаемости ФКУ среди новорожденных Белгородской области составила 1 : 7 831. Максимальное количество больных ФКУ по Белгородской области зарегистрировано в 2012 г. (1 : 4 481), в 2010 г. случаев рождения детей с ФКУ не отмечалось (таблица).

Анализ территориальной вариабельности ФКУ по районным популяциям Белгородской области показал, что максимальные значения частоты ФКУ за исследуемый период отмечены в Валуйском (1 : 1 862), Борисовском (1 : 2 322), Красногвардейском (1 : 3 015), Ракитянском (1 : 3 221), Губкинском (1 : 4 723) районах, минимальные – в Белгородском

(1 : 8 261), Старооскольском (1 : 7 684), Шебекинском (1 : 7 308) районах Белгородской области. В Вейделевском, Волоконовском, Грайворонском, Ивнянском, Корочанском, Красненском, Краснояружском, Новооскольском, Прохоровском, Ровеньском, Чернянском и Яковлевском районах за период 2006–2013 гг. случаев ФКУ не зарегистрировано.

Динамика частоты ФКУ среди новорожденных Белгородской области за период с 2006 по 2013 г.

| Год | Количество родившихся | Количество случаев ФКУ | Частота ФКУ |
|-------|-----------------------|------------------------|-------------|
| 2006 | 14 380 | 3 | 1 : 4 793 |
| 2007 | 15 695 | 1 | 1 : 15 695 |
| 2008 | 16 793 | 2 | 1 : 8 397 |
| 2009 | 16 845 | 2 | 1 : 8 423 |
| 2010 | 16 635 | – | – |
| 2011 | 16 980 | 2 | 1 : 8 490 |
| 2012 | 17 923 | 4 | 1 : 4 481 |
| 2013 | 17 883 | 3 | 1 : 5 961 |
| Итого | 133 134 | 17 | 1 : 7 831 |

Анализ литературных данных показывает значительную вариабельность частоты ФКУ в зависимости от популяции (рисунок). Так, на территории РФ наибольшая частота – 1 : 4 100 зарегистрирована в Тамбовской области, в Самарской области – 1 : 5 500, а минимальная – в Новосибирской области – 1 : 10 000, в Башкирии – 1 : 10 329. Частота ФКУ в Татарстане составила 1 : 6 000, в Краснодарском крае – 1 : 9 272, в Кабардино-Балкарской Республике – 1 : 5 900 [4]. Следует отметить, что частота ФКУ в Белгородской области несколько ниже, чем в Москве (1 : 6 772) и Свердловской области (1 : 6 500), и в целом находится в рамках среднероссийских значений, которые, по разным данным, составляют 1 : 6 000–10 000 [4–6].

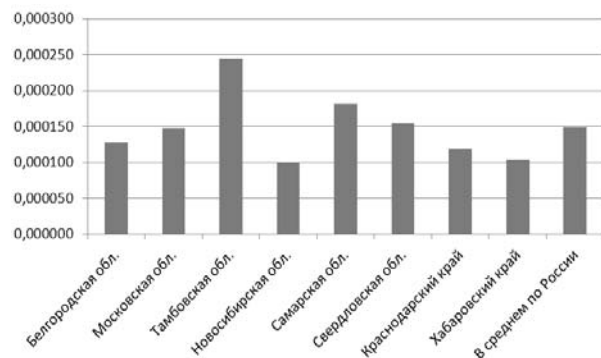


Рис 1. Частота ФКУ в различных регионах РФ

В европейских странах средняя частота ФКУ составляет 1 на 10 тыс. новорожденных при вариабельности от 1 : 4 560 в Ирландии и 1 : 4 370 в Турции до 1 : 16 000 в Швейцарии и Голландии. Во Франции ФКУ встречается с частотой 1 : 13 715, в Италии 1 : 12 000. Наименьшая частота ФКУ среди европейцев была выявлена в Финляндии – 1 : 100 000 новорожденных. В США данная патология встречается с частотой

1 : 13 914, в Китае 1 : 50 000, а в Японии – 1 : 100 000 [4].

Таким образом, по данным неонатального скрининга, частота ФКУ среди новорожденных Белгородской области за период с 2006 по 2013 г. составила 1 : 7 831, что в целом сопоставимо с данными по РФ. ФКУ является одним из наиболее распространенных наследственных заболеваний (после врожденного гипотиреоза), включенных в программу скрининга новорожденных в Белгородской области.

Литература

1. Матулевич С.А. Массовый скрининг новорожденных на наследственные болезни обмена как часть системы медико-генетической помощи населению: дис. ... д-ра мед. наук. М., 2009. 211 с.

2. Симакова Т.С., Брагин А.Г., Зайцева М.А., Павлов А.Е. Роль высокопроизводительного секвенирования в неонатальном скрининге наследственных нарушений обмена веществ // Мед. генетика. 2013. № 9. С. 11–13.
3. Тебиева И.С., Лакуева Ф.К., Логачев М.Ф. и др. Массовое обследование новорожденных на наследственные заболевания: мировой и отечественный опыт, проблемы и перспективы // Мед. генетика. 2011. № 9. С. 20–29.
4. Тебиева И.С. Эффективность неонатального скрининга в выявлении клинико-эпидемиологических особенностей наследственных болезней и оптимизации системы их диагностики, лечения и реабилитации в РСО – Алания: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2012. 26 с.
5. Справочник педиатра. 2-е изд. / под ред. Н.П. Шабалова. СПб.: Питер, 2007. 720 с.
6. Зинченко Л.В. Генетико-эпидемиологическое исследование фенилкетонурии в популяции Краснодарского края: дис.... канд. биол. наук. Томск, 2006. 169 с.

АНАЛИЗ РАБОТЫ МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ В РЕСПУБЛИКЕ БУРЯТИЯ

Е.Р. Еремина^{1,2}

- ¹ Республиканский перинатальный центр, г. Улан-Удэ
- ² Бурятский государственный университет, г. Улан-Удэ

Значительное место в снижении детской заболеваемости, инвалидности и смертности принадлежит одному из видов оказания специализированной медицинской помощи населению – медико-генетическому консультированию. В Республике Бурятия этот вид помощи оказывает медико-генетическая консультация (МГК), которая работает в составе ГБУЗ «Республиканский перинатальный центр» Министерства здравоохранения Республики Бурятия. В МГК осуществляются организация и проведение медико-генетического консультирования, доклиническая диагностика наследственных болезней обмена веществ у новорожденных, инвазивная пренатальная диагностика, диспансерное наблюдение семей с наследственными и врожденными заболеваниями.

Медико-генетическое консультирование

За консультацией к врачу-генетику в 2005–2013 гг. в МГК г. Улан-Удэ обратилось 30 576 семей, при этом ежегодно число принятых семей возрастает. Структура консультаций изменялась на протяжении 9 лет. Так, в период 2005–2010 гг. консультацию врача-генетика получили 76,2% семей по поводу прогноза наследственного здоровья будущего потомства, а в 2011–2013 гг. частота таких обращений возросла до 86,2%. Рост доли проспективного консультирования в 2011–2013 гг. определяется работой МГК с 2011 г. в структуре перинатального центра (до этого периода отделение работало в составе детской республиканской больницы). Изменение структуры обращений в МГК отмечено также в Краснодарском крае с 1980 по 2003 г., при этом доля беременных, прошедших консультацию генетика, в среднем составила 68,2% [1]. Увеличение роста обращений за прогнозом здоровья будущего потомства до 62% зарегистрировано в генетической клинике г. Томска [2]. Близкая потребность в медико-генетическом консультировании для амбулаторных пациентов акушерско-гинекологического профиля (60–70%) определена в межклиническом отделении медицинской генетики Московской медицинской

академии им. И.М. Сеченова [3]. По данным МГК Национального центра медицины Республики Саха (Якутия), в 1989–1999 гг. частота семей, обратившихся по поводу прогноза здоровья будущего ребенка, составила 54,1% [4], что ниже по сравнению с данными МГК Бурятии.

Анализ обращений за консультацией генетика в МГК по месту проживания пациентов демонстрирует, что частота сельских жителей снизилась с 51,4 до 29,5% в 2005 и 2013 г. соответственно. Уменьшение доли семей из сельской местности, прошедших медико-генетическое консультирование, связано с оттоком трудоспособного, а значит, в основном находящегося в фертильном возрасте сельского населения в города, что подтверждают статистические данные [5].

Доклиническая диагностика наследственных заболеваний

Проведение неонатального скрининга на наследственные болезни позволяет повысить выявляемость наследственных дефектов обмена, сократить сроки постановки диагноза и период до начала лечения, тем самым предотвратить развитие тяжелых осложнений и летальность от этих патологий, а также определить данные о частоте скринируемых нозологий в регионе для организации профилактических мероприятий.

Неонатальный скрининг на фенилкетонурию (ФКУ) начал проводиться в городских родильных домах г. Улан-Удэ с 1993 г. с последующим распространением на сельские районы. Охват скринингом новорожденных в республике к 1997 г. достиг 95%, а в последующие годы возрос и поддерживается на уровне 99%. Средняя частота ФКУ в Бурятии за период 2005–2013 гг. составила 1 : 15 504, что ниже аналогичных показателей по регионам России. Частота ФКУ варьирует от 1 : 6 500 в Свердловской области [6] до 1 : 9 722 в Краснодарском крае [7], а средний показатель по стране составляет 1 : 7 697 [8]. Необходимо отметить, что всех случаях ФКУ выявлена в русских семьях, у бурят это заболевание

не обнаружено за весь период массового обследования новорожденных с 1993 г. Дети, страдающие ФКУ, получают диетотерапию под контролем врача-генетика МГК.

В 1997 г. в Бурятии начат массовый неонатальный скрининг на врожденный гипотиреоз (ВГ). Охват скринингом на ВГ в 1998–1999 гг. составлял 80–95% в связи с нерегулярными поставками тест-систем, а с 2001 г. стабильно сохраняется на уровне 99%. Средняя частота ВГ в Бурятии в 2005–2013 гг. представлена величиной 1 : 3 549, что близко к показателям в Удмуртской Республике и Ханты-Мансийском автономном округе Тюменской области, где данный показатель составил 1 : 3 444 и 1 : 3 680 соответственно [9, 10]. В то же время частота ВГ на территории страны колеблется от 1 : 2 100 в Свердловской области [6] до 1 : 4 116 в Краснодарском крае [7], а в среднем в России составляет 1 : 4 132 [8]. Дети, выявленные по скринингу с диагнозом ВГ, передаются на диспансерное наблюдение эндокринологу.

С 2006 г. массовое обследование новорожденных на наследственные заболевания в Бурятии было расширено за счет включения в перечень скринируемых нозологий адреногенитального синдрома, муковисцидоза и галактоземии по приоритетному национальному проекту «Здоровье». За период проведения скрининга на адреногенитальный синдром (АГС) в республике обследовано 122 912 новорожденных и частота этой патологии составила 1 : 11 174, что близко к аналогичным показателям в Краснодарском крае (1 : 10 070) [7] и Ивановской области (1 : 11 934) [11]. Одновременно с этим АГС чаще встречается в ряде российских регионов – Ханты-Мансийском автономном округе Тюменской области (1 : 6 308) [10], Удмуртской Республике (1 : 7 927) [9], Свердловской области (1 : 8 300) [6], Республике Башкортостан (1 : 8 974) [12]. Согласно данным П.В. Новикова, частота классической формы врожденной дисфункции коры надпочечников в целом по России составляет 1 : 8 662 [8]. Дети, диагноз АГС которым был поставлен в результате неонатального скрининга, получают лечение у эндокринолога.

Диагностика муковисцидоза (МВ) в МГК Бурятии проводится по схеме: иммунореактивный трипсиноген (ИРТ) двукратно и потовая проба у младенцев с превышением пороговых показателей ИРТ. Скринирование на МВ в 2006–2013 гг. было осуществлено 109 122 новорожденным, и частота заболевания в данном контингенте составила 1 : 21 824. В других российских регионах встречаемость муковисцидоза выше. Так, в различные годы в г. Москве частота заболевания варьировала от 1 : 6 432 до 1 : 13 863 [13], в Свердловской области данный показатель составил 1 : 8 300 [6], в Удмуртии – 1 : 10 190 [9], в Краснодарском крае – 1 : 11 130 [7], в Ханты-Мансийском автономном округе Тюменской области 1 : 13 263 [10]. Средняя частота МВ в России – 1 : 11 585 [8]. Невысокая встречаемость МВ в Бурятии может быть связана с неоднородным этническим составом населения, проживающего в республике, поскольку на территории России в отдельных федеральных округах и некоторых регионах отмечается более низкая частота по сравнению со средними величинами по стране [13, 14].

Несмотря на то что скрининг на ГАЛ включен в федеральную программу массового просеивания новорожденных, ведутся дискуссии о целесообразности

его осуществления, поскольку безлактозная диета не всегда предотвращает развитие поздних осложнений болезни, несмотря на надежный метод диагностики [15, 16]. В Бурятии на ГАЛ за 2006–2013 гг. обследовано 87 029 новорожденных, частота классической формы этой патологии составила 1 : 29 009, что является одной из высоких частот среди регионов России. Частота ГАЛ в среднем по России составляет 1 : 32 692 [8], при этом зарегистрирован широкий диапазон встречаемости классической формы заболевания по регионам – от 1 : 35 803 в Ивановской области [11] до 1 : 87 000 в Свердловской области [6].

Пренатальная диагностика нарушений развития ребенка

Значительная роль в комплексе мероприятий по профилактике и предупреждению наследственных и врожденных болезней принадлежит пренатальной диагностике, которая позволяет предотвратить рождение детей с тяжелыми некорректируемыми пороками развития и хромосомными болезнями.

В период 2008–2012 гг. частота выявления хромосомной патологии плода по результатам инвазивной пренатальной диагностики составила 7,4%, что близко к средним показателям по МГК России, например в МГК г. Сургута в 2006–2009 гг. пренатально было обнаружено 8,3% хромосомных аномалий [17]. Введение биохимического скрининга в первом триместре в женских консультациях г. Улан-Удэ в 2010–2011 гг. не отразилось на выявлении хромосомных аномалий плода, лишь единичные случаи отклонений биохимических маркеров от нормативных показателей привели к выявлению этого вида патологии.

Наиболее эффективным методом массовой диагностики хромосомных аномалий у плода считается комбинированный скрининг в первом триместре беременности [18–20]. Формирование группы высокого риска беременных женщин по хромосомной патологии происходит на основании результатов биохимической и ультразвуковой диагностики.

В национальный проект «Пренатальная (дородовая) диагностика нарушений развития ребенка» Бурятия вступила с февраля 2013 г. Обследование беременных женщин проводится в женских консультациях г. Улан-Удэ и районах республики по новому для России алгоритму массового пренатального скрининга беременных на врожденные пороки развития (ВПР) и хромосомные аномалии (ХА) у плода в первом триместре беременности (11–13,6 нед). Расчет комбинированного риска хромосомной патологии у плода производится с помощью программного обеспечения, при этом учитываются данные ультразвукового исследования, анамнеза, возраст беременной, результаты определения в крови сывороточных маркеров (свободная β -субъединица хориогонического гонадотропина человека (β -ХГЧ) и плазма-протеин А ассоциированный с беременностью (РАРР-А)).

В 2013 г. в Бурятии по алгоритму раннего пренатального скрининга обследована 10 161 беременная женщина (80,3% от взятых на учет в сроке до 14 нед), группа риска по хромосомной патологии, сформированная на основании подсчета комбинированного риска, составила 323 женщины. Инвазивная пренатальная диагностика проведена 244 женщинам, 53 отказались от инвазивной диагностики,

26 беременных не явились по вызову к врачу-генетику из сельской местности, в том числе из отдаленных районов республики.

Среди женщин, попавших в группу риска, хромосомная патология выявлена в 38 случаях, 33 беременности прервано. Женщины с выявленными хромосомными аберрациями у плода, отказавшиеся от прерывания беременности, пролонгировали беременность с установленным диагнозом. Частота выявленной хромосомной патологии от числа обследованных по комбинированному скринингу беременных женщин составила 15,6%. Чувствительность скрининга в 11–13,6 нед беременности в 2013 г. в Бурятии составила 75,7%, при этом не все женщины, родившие детей с хромосомными болезнями, были обследованы по данному алгоритму. Данные по другим регионам, работающим по пренатальной диагностике нарушений развития ребенка, демонстрируют более высокую чувствительность скрининга [20, 21]. Этот факт может быть связан с тем, что в 2013 г. ранним пренатальным скринингом не могли быть охвачены все беременные женщины республики в связи с постепенным вхождением в проект отдельных территорий и неполным годом осуществления данного обследования. Кроме того, в отдельных МГК используется больший спектр лабораторных методов для пренатального кариотипирования. Лаборатории, имеющие в своем арсенале метод QF-ПРЦ для пренатального кариотипирования, обладают большими возможностями для диагностики структурных аномалий кариотипа плода.

В МГК республики в настоящее время начал использоваться метод молекулярной генетики FISH с ДНК-зондами на специфичные районы хромосом 13, 18, 21, X, Y, что позволяет провести пренатальное кариотипирование амниоцитов плода в сроке 16–18 нед.

В период работы по новому алгоритму пренатальной диагностики нарушений развития ребенка произошло изменение структуры инвазивных вмешательств. В 2013 г. проведено 69,3% аспирации ворсин хориона, 25,0% плацентоцентеза, 5,7% кордоцентеза. При этом доля кордоцентеза значительно снизилась по сравнению с предыдущими годами [22], что объясняется тем, что мероприятия по пренатальной диагностике нарушений развития ребенка направлены на выявление патологии плода в первом триместре беременности.

Анализ работы цитогенетической лаборатории показал, что за период 2007–2013 гг. было выявлено 108 детей первого года жизни с хромосомной патологией. В большинстве случаев (95,4%) матери этих детей не были проконсультированы врачом-генетиком в силу различных причин (отсутствие ультразвукового (УЗ) скрининга в нормативные сроки, отсутствие УЗ-маркеров хромосомной патологии при своевременно проведенном УЗ-осмотре, неявка на повторную консультацию генетика), комбинированный скрининг в первом триместре беременности не назначался. Таким образом, анализ информации по медико-генетическому консультированию новорожденных с хромосомными заболеваниями показывает, что большинство случаев рождения детей с данной патологией возможно было предупредить при своевременном направлении на консультацию к врачу-генетику и проведении инвазивной пренатальной диагностики.

Постнатальная цитогенетическая диагностика

Одним из наиболее востребованных лабораторных исследований в МГК является цитогенетическая диагностика. По данным Н.П. Бочкова [3], примерно для 10–15% больных многопрофильного клинического центра требуются цитогенетические исследования.

В целом в МГК г. Улан-Удэ частота хромосомной патологии (постнатальное кариотипирование) по направлениям врачей составляет 6,4%. Сопоставимая доля аномальных кариотипов при обращении в МГК описана в Якутии (5,7%) [4]. Выявляемость хромосомной патологии выше в генетической клинике г. Томска – 10,4% [2]. Незначительное снижение выявления хромосомных аномалий в Кубанской МГК в период 1996–2009 гг. до 11,3% по сравнению с 1986–1996 гг. (12,5%) [23] авторы связывают с расширением показаний для цитогенетического обследования за счет супружеских пар с отягощенным акушерским анамнезом, а также с изменениями в Международной номенклатуре хромосом ISCN. В межклиническом отделении медицинской генетики Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова потребность в цитогенетических исследованиях (в основном дифференциальная окраска, G-метод) от числа проконсультированных составляет 11,9%, при этом аномальные кариотипы выявлены у 7,7% пациентов акушерско-гинекологического контингента и 5,5% пациентов клиник другого профиля [24].

Необходимо отметить, что перспективами развития медико-генетической службы в регионе является широкое использование молекулярно-генетических методов для диагностики хромосомных и моногенных болезней, а также генетического тестирования предрасположенности к мультифакторным заболеваниям.

Литература

1. Матулевич С.А. Опыт работы Кубанской межрегиональной медико-генетической консультации // Мед. генетика. 2005. № 1 (43). С. 45–49.
2. Назаренко Л.П., Сивоха В.М., Филиппова М.О. и др. Оказание специализированной помощи семье в генетической клинике // Мед. генетика. 2005. Т. 4, № 5. С. 235.
3. Бочков Н.П., Филиппова Т.В., Морозов П.Н. Медико-генетическая служба в многопрофильном клиническом центре // Мед. генетика. 2006. № 1. С. 42–44.
4. Ноговицына А.Н. Отягощенность населения Республики Саха (Якутия) наследственной патологией и анализ работы региональной медико-генетической консультации: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2001. 24 с.
5. http://atlas.socpol.ru/graph/3_18.pdf
6. Никитина Н.В., Беляева Т.И., Николаева Е.Б. и др. Что открыл для нас скрининг на 5 наследственных заболеваний // Мед. генетика. Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков. Ростов н/Д, 2010. С. 127.
7. Голихина Т.А., Шумливая Е.О., Матулевич С.А. Неонатальный скрининг на наследственные болезни обмена в Краснодарском крае // Мед. генетика. Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков. Ростов н/Д, 2010. С. 46.
8. Новиков П.В. Наследственная патология в структуре болезней детского возраста и организация медико-генетической помощи детям в Российской Федерации // Мед. генетика. 2008. Т. 7, № 12. С. 3–7.
9. Осипова Е.В., Кузнецова О.П., Шахтарина Н.Г. Анализ результатов неонатального скрининга на 5 наследственных заболеваний в Удмуртии // Мед. генетика. Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков. Ростов н/Д, 2010. С. 135–136.

10. Кунцевич Н.В., Карцева О.В., Гильнич Н.А. и др. Итоги проведения неонатального скрининга новорожденных в ХМАО – Югре за 2006–2009 гг. // Мед. генетика. Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков. Ростов н/Д, 2010. С. 99.
11. Жукова Т.П., Артемичева И.Л., Кутлова Е.И. и др. Итоги реализации программы массового обследования новорожденных на адреногенитальный синдром, муковисцидоз, галактоземию на территории Ивановской области // Мед. генетика. Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков. Ростов н/Д, 2010. С. 63.
12. Рахимкулова А.А., Ахметова В.Л., Малиевский О.А. и др. Врожденная дисфункция коры надпочечников: клинико-генетические аспекты // Мед. генетика. 2013. № 6. С. 3–14.
13. Шерман В.Д., Капранов Н.И., Каширская Н.Ю. и др. Роль неонатального скрининга в оптимизации медицинской помощи больным муковисцидозом // Мед. генетика. 2013. № 11. С. 24–28.
14. Капранов Н.И., Красовский С.А., Кондратьева Е.И. и др. Клинико-генетическая характеристика муковисцидоза в Московском регионе // Мед. генетика. 2013. № 11. С. 17–23.
15. Тебиева И.С., Лагуева Ф.К., Логачев М.Ф. и др. Опыт мировой и отечественной практики неонатального скрининга на наследственные заболевания // Педиатрия. 2012. Т. 91, № 1. С. 128–132.
16. Воскобоева Е.Ю., Байдакова Г.В., Денисенкова Е.В. и др. Галактоземия в России: молекулярно-генетические особенности, неонатальный скрининг, подтверждающая диагностика // Мед. генетика. 2009. № 6. С. 25–33.
17. Вагина В.В., Ильк Н.Я., Гильнич Н.А. Итоги цитогенетических исследований в пренатальной диагностике за 2006–2009 гг. // Мед. генетика. Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков. Ростов н/Д, 2010. С. 31.
18. Николаидес К. Ультразвуковое исследование в 11–13 недель беременности. СПб.: Петрополис, 2007. 144 с.
19. Кащеева Т.К., Джуган И.В. Особенности работы с программами пренатального биохимического скрининга // Лаборатория. 2012. № 4. С. 20–22.
20. Кащеева Т.К., Николаева Ю.А., Талантова О.Е. и др. Проблемы и перспективы пренатального биохимического скрининга в Санкт-Петербурге // Редкие (орфанные) заболевания и врожденные пороки развития. Современные возможности диагностики, профилактики, лечения и реабилитации: сб. тр. к 45-летию Медико-генетического центра. СПб., 2014. С. 307–309.
21. Матулевич С.А., Бареева О.В., Шумливая Е.О. и др. Первые итоги пренатального скрининга в первом триместре беременности в Краснодарском крае // Редкие (орфанные) заболевания и врожденные пороки развития. Современные возможности диагностики, профилактики, лечения и реабилитации. Сборник трудов к 45-летию Медико-генетического центра. СПб., 2014. С. 307–309.
22. Еремичина Е.Р., Мункуева Л.Д., Дузарова Г.О. и др. Состояние пренатальной диагностики в Республике Бурятия // Генетика человека и патология. Томск: STT, 2011. С. 28–29.
23. Крюкова Н.М., Матулевич С.А. Организация и развитие цитогенетической лаборатории Кубанской межрегиональной медико-генетической консультации // Медицинская генетика. Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков. Ростов н/Д, 2010. С. 96.
24. Филиппова Т.В., Бочков Н.П. Анализ медико-генетического консультирования амбулаторного контингента многопрофильного клинического центра // Мед. генетика. 2007. Т. 6, № 3 (57). С. 15–18.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ БИОСЕНСОРНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ОКСИДА ГРАФЕНА ДЛЯ ДНК-ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.А. Кузнецов^{1,2}, Н.Р. Максимова^{1,2}, Г.Н. Александров¹, С.А. Смагулова¹

¹ Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, г. Якутск

² Якутский научный центр комплексных медицинских проблем СО РАМН, г. Якутск

В последнее время за рубежом ведутся интенсивные исследования в области создания биосенсорных тест-систем. Перспективным направлением использования тест-систем является ДНК-диагностика – один из самых высокотехнологичных методов анализа. ДНК-диагностика широко применяется для выявления наследственных, онкологических заболеваний и предрасположенности к ним, для диагностики инфекций, установления родства, в судебно-медицинской практике, а также для контроля окружающей среды и качества продуктов питания. Объем производства тест-систем для ДНК-диагностики в 2010 г. в России оценивался в 15,7 млн штук [1].

Актуальность ДНК-диагностики наследственных, онкологических, инфекционных заболеваний обусловлена как их широкой распространенностью, так и тяжестью последствий при несвоевременном выявлении. Запоздалая диагностика данных заболеваний часто обуславливает значительное сокращение продолжительности жизни больных, несмотря на интенсивное и дорогостоящее лечение. С другой стороны, информация о наличии высокого риска возникновения заболевания у пациента позволяет проводить профилактические мероприятия, снижающие риск. Пренатальная диагностика наследственных заболеваний имеет очень важное значение при медико-генетическом консультировании [2], поскольку она позволяет прогнозировать здоровье

ребенка в семьях с генетическими осложнениями: в случае возникновения заболевания оно будет диагностировано на ранней стадии и своевременная терапия позволит исключить серьезные для жизни и трудоспособности последствия.

Моногенные заболевания, несмотря на низкую частоту их отдельных форм, являются довольно распространенной формой наследственной патологии человека – науке уже известно более 6 тыс. вариантов моногенных наследственных болезней [3]. Для данного типа болезней возможна прямая диагностика на уровне анализа структурных изменений последовательности в молекуле ДНК. Важной областью ДНК-диагностики является диагностика гетерозиготного носительства мутаций для выявления опасных групп риска среди населения, а также медико-генетического консультирования пар, вступающих в брак. Особенно важна задача осуществления ДНК-диагностики в популяциях (например, таких как якутская), в которых наблюдается накопление некоторых форм этноспецифической патологии или отдельных мутаций.

Поэтому задача осуществления ДНК-диагностики с целью профилактики и снижения генетического груза населения в настоящий момент особенно актуальна. Важным аспектом ДНК-диагностики должна стать ее массовость – широкое внедрение диагностики в медицинскую практику позволит значительно снизить

генетический груз популяции, улучшить здоровье и качество жизни населения. Для ускорения этого процесса необходимо наличие биосенсорных тест-систем для ДНК-диагностики, позволяющих проводить быстрые, качественные и недорогие анализы.

В основе всех методов ДНК-диагностики лежит полимеразная цепная реакция (ПЦР), суть которой сводится к получению большого числа копий требуемого участка ДНК (ампликонов). В настоящий момент существует несколько основных принципов ДНК диагностики [4], которые включают в себя метод секвенирования ДНК, метод ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR), классические методы ПЦР и ПЦР-ПДРФ с регистрацией результатов по электрофорезу. Но у каждого из используемых стандартных методов анализа есть как достоинства, так и недостатки.

Метод секвенирования ДНК наиболее полноценный и достоверный, однако ввиду его огромной стоимости и низкой производительности он не подходит для рутинного анализа.

Методы ПЦР и ПЦР-ПДРФ с регистрацией результатов по электрофорезу, наоборот, являются самыми простыми и недорогими и часто применяются при потоковой диагностике, однако имеют довольно низкое качество получаемых результатов. Метод ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR) позволяет количественно определять ампликоны непосредственно в процессе ПЦР. Данная методика в течение последних пяти лет успешно применяется в крупнейших диагностических и научно-исследовательских центрах развитых стран мира благодаря простоте ее выполнения, высокой надежности получаемых результатов, экономии производственных площадей, уменьшению количества персонала и востребованности количественного определения ДНК/РНК. Однако лучшие существующие тест-системы для Real-Time PCR (TaqMan, LightCycler, Scorpion, Molecular Beacons) основаны на использовании схем с применением различных ДНК-зондов. Данные зонды должны содержать фрагмент молекулы флуорофора, а также фрагмент молекулы тушителя флуоресценции. Применение такой структуры действительно обеспечивает высокую достоверность получаемых результатов и позволяет проводить даже количественную ДНК-диагностику. Однако из-за сложности структуры возникают проблемы со стабильностью подобных ДНК-зондов, и это приводит к дороговизне стоимости самой тест-системы из-за сложного синтеза зондов.

Таким образом, у тест-систем, пригодных для рутинной ДНК-диагностики, достаточно высокое соотношение цена/качество, и существует проблема доступности качественных диагностических тест-систем для широкого использования в клинической практике. Распространенные в мире методы ДНК-диагностики, дающие качественные результаты, являются довольно время- и ресурсозатратными, что в итоге отражается на конечной стоимости анализов. Поэтому актуальной задачей является также создание тест-систем для ДНК-диагностики, основанных на новых принципах работы, позволяющих одновременно получать качественные результаты и улучшить экономическую рентабельность диагностики.

Не случайно в последние годы большое внимание исследователей было привлечено к разработке биосенсорных тест-систем с использованием наноматериалов [5]. Наноматериалы обладают уникальными оптическими, электронными, магнитными и каталитическими свойствами, которые делают их идеальными кандидатами для генерации сигналов в

биосенсорных системах. Один из новейших и уникальнейших наноматериалов – графен – двумерный нанокристалл углерода толщиной в один атом, широко используемый в нанoeлектронике и нанокompозитах. В частности, оксид графена, который представляет собой водорастворимое производное графена, привлекает все больший интерес в области биологических применений из-за своих уникальных характеристик, таких как хорошая диспергируемость в воде, легкость модификации поверхности и высокая механическая прочность [6]. Биологические приложения графена и оксида графена требуют дополнительных исследований. Возможности создания контактных площадей взаимодействия для производных графена с биомолекулами делают данный наноматериал перспективным чувствительным элементом для разработки диагностических тест-систем. Структура химически модифицированного графена с его латеральными размерами в микронных масштабах хорошо сопоставима с размерами клеток и некоторых биомолекул [7, 8].

Исследования возможностей применения графена и его производных в области ДНК-диагностики активно ведутся за рубежом в течение последних 5 лет. Благодаря уникальным свойствам графена и его производных существует множество областей его применения в ДНК-диагностике: электрохимические биосенсоры, флуоресцентные тест-системы, системы на основе анализа ДНК-графеновых нанокompозитов [9]. Использование модифицированного графена в качестве основы для создания новых классов биосенсорных тест-систем для ДНК-диагностики заболеваний дает мощные конкурентные преимущества для таких тест-систем перед существующими методами анализа.

Уникальные свойства графеновых материалов в целом, в том числе низкая себестоимость и относительная простота производства химическим методом, позволяют разрабатывать перспективные биосенсорные системы с такими отличительными чертами, как простота принципов работы, относительно низкая себестоимость, высокая экспрессность, селективность и чувствительность проведения ДНК-анализа, а также возможность миниатюризации и создания портативных устройств для экспресс-диагностики заболеваний в клинических лабораториях.

Особенно перспективной представляется возможность создания флуоресцентных тест-систем на основе оксида графена. Последние исследования показали, что оксид графена является эффективным тушителем флуоресценции различных флуоресцентных соединений [10] и квантовых точек [11]. По сравнению с органическими тушителями флуоресценции графен продемонстрировал наивысший эффект тушения различных флуорофоров [12, 13]. Вдобавок благодаря наличию аффинности у оксида графена по отношению к одноцепочечным молекулам ДНК (в отличие от двуцепочечных) существует возможность разрабатывать на его основе биосенсорные тест-системы – аналоги флуоресцентных тест-систем на основе ПЦР в реальном времени, обладающие низким соотношением цена – качество. Создание подобных тест-систем открывает перспективы к массовому внедрению ДНК-диагностики в область практического здравоохранения.

Последние несколько лет в мире ученые активно начали работать в области поиска подходов применения производных графена с целью создания тест-систем для ДНК-диагностики. Были созданы базовые принципы функционирования подобных

тест-систем, заложены общие идеи создания прототипов флуоресцентных биосенсорных тест-систем с использованием оксида графена, основанных на различных схемах генерации сигнала [14–19].

Необходимо отметить, что до сих пор все вышеупомянутые исследования в целом направлены на демонстрацию потенциала использования оксида графена при создании биосенсорных тест-систем и пока не нашли применения в области лабораторной ДНК-диагностики заболеваний: разработанные прототипы биосенсорных тест-систем испытывались на синтетических олигонуклеотидах и на специализированной приборной базе, пока нет работ по внедрению разработанных методик под классическую приборную базу генетической лаборатории (например под Real-Time амплификаторы). В настоящее время в Российской Федерации отсутствуют научные группы, проводящие исследования в области применения производных графена для создания тест-систем для ДНК-диагностики.

С учетом обозначенной актуальности данной проблемы авторами начали проводиться работы по созданию первых опытных образцов биосенсорных тест-систем на основе оксида графена, пригодных для лабораторной ДНК-диагностики наследственных заболеваний. На первом этапе провели литературный поиск по подходам к разработке тест-систем на основе оксида графена для ДНК-диагностики, определили стратегические пути создания тест-систем, взяв за основу работы [14] и [19]. Затем был проведен эксперимент, по результатам которого суспензия оксида графена, синтезируемая сотрудниками УНТЛ «Графеновые нанотехнологии», была признана пригодной для создания тест-систем. Суть эксперимента заключалась в определении зависимости степени тушения флуоресценции олигонуклеотида, меченного FAM-меткой, от соотношения концентраций оксида графена и олигонуклеотида в растворе, а также времени инкубации. Было установлено, что исследуемая суспензия оксида графена обладает характеристиками, близкими к описанным в литературе [14–19], также у имеющегося в наших лабораториях оборудования есть необходимый запас чувствительности для регистрации флуоресценции. На следующем этапе были разработаны адаптированные к клинической практике принципиальные схемы работы тест-систем для ДНК-диагностики мутаций. В качестве целевого заболевания для ДНК-диагностики был выбран синдром 3-М – аутосомно-рецессивное заболевание, имеющее повышенную частоту встречаемости в якутской популяции. Для данного заболевания был полностью произведен дизайн праймеров и всех необходимых для создания тест-системы биохимических компонентов. В ближайшие 1,5 года планируется разработать, провести испытания и внедрить в клиническую практику тест-системы на основе оксида графена для ДНК-диагностики синдрома 3-М у населения Республики Саха (Якутия).

Заключение

Разработка новых биосенсорных тест-систем на основе оксида графена для ДНК-диагностики заболеваний и их внедрение в область практического здравоохранения имеет большую актуальность и значимость: расширение области прикладного применения современных наноматериалов как инновационная составляющая современной науки позволяет добиться повышения эффективности ДНК-диагностики и повысит доступность медицинских услуг в сфере генетического тестирования. С учетом сло-

жившегося мирового задела по применению производных графена в биосенсорных тест-системах, а также современного научно-технического потенциала существуют все возможности для создания в ближайшие годы первых рабочих прототипов биосенсорных тест-систем на основе оксида графена для ДНК-диагностики наследственных заболеваний.

Литература

1. Рынок диагностических ПЦР-тест-систем в 2009–2010 годах. Режим доступа: <http://abercade.ru/research/reports/7116.html> (дата обращения: 24.06.2014).
2. Демикова Н.С., Асанов А.Ю. Современное состояние, перспективы и роль клинической генетики в педиатрии // Педиатрия. 2012. Т. 91, № 3. С. 53–58.
3. Genes Associated with Diseases. Режим доступа: <http://www.genecards.org/cgi-bin/listdiseasecards.pl?type=full>. (дата обращения: 24.06.2014).
4. Иллариошкин С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование. М.: МИА, 2004. 207 с.
5. Yang H., Xia Y. Ionanotechnology: Enabling biomedical research with nanomaterials // Adv. Mater. 2007. V. 19. P. 3085.
6. Li D., Muller M.B., Gilje S. et al. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets // Nat. Nanotechnol. 2008. V. 3. P. 101.
7. Sun X., Liu Z., Welsher K. et al. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery // Nano Res. 2008. V. 1. P. 203.
8. Mohanty N., Berry V. Graphene-based single-bacterium resolution biodevice and DNA transistor: interfacing graphene derivatives with nanoscale and microscale biocomponents // Nano Lett. 2008. V. 8. P. 4469.
9. Tang L., Wang Y., Liu Y., Li J. DNA-directed self-assembly of graphene oxide with applications to ultrasensitive oligonucleotide assay // ACS Nano. 2011. V. 5, № 5. P. 3817–3822.
10. Miguel M., Alvaro M., Garcia H. Graphene as a Quencher of Electronic Excited States of Photochemical Probes // Langmuir. 2012. V. 28, № 5. P. 2849–2857.
11. Dong H., Gao W., Yan F. et al. Fluorescence Resonance Energy Transfer between Quantum Dots and Graphene Oxide for Sensing Biomolecules // Anal. Chem. 2010. V. 82, № 13. P. 5511–5517.
12. Kasry A., Ardakani A.A., Tulevski G.S. et al. Highly Efficient Fluorescence Quenching with Graphene // J. Phys. Chem. C. 2012. V. 116, № 4. P. 2858–2862.
13. Li F., Pei H., Wang L. et al. Nanomaterial-Based Fluorescent DNA Analysis: A Comparative Study of the Quenching Effects of Graphene Oxide, Carbon Nanotubes, and Gold Nanoparticles // Adv. Funct. Mater. 2013. V. 23. P. 4140–4148.
14. He S., Song B., Li D. et al. A Graphene Nanoprobe for Rapid, Sensitive, and Multicolor Fluorescent DNA Analysis // Adv. Funct. Mater. 2012. V. 20. P. 453–459.
15. Li J., Huang Y., Wang D. et al. A power-free microfluidic chip for SNP genotyping using graphene oxide and a DNA intercalating dye // Chem. Commun. 2013. V. 49. P. 3125–3127.
16. Zhao X.H., Ma Q.J., Wu X.X., Zhu X. Graphene oxide-based biosensor for sensitive fluorescence detection of DNA based on exonuclease III-aided signal amplification // Analytica Chimica Acta. 2012. V. 727. P. 67–70.
17. Zhang M., Le H.N., Ye B.C. Graphene Oxide-Based Fluorescent «on/off» Switch for Visual Bioassay Using «Molecular Beacon» – Hosted Hoechst Dyes // ACS Applied Materials & Interfaces. 2013. V. 5, № 17. P. 8278–8282.
18. Xiang D.S., Zheng A.H., Luo M. et al. Graphene oxide and molecular beacons-based multiplexed DNA detection by synchronous fluorescence analysis // Science China Chemistry. 2013. V. 56, № 3. P. 380–386.
19. Xu H., Yang Q., Li F. et al. A graphene-based platform for fluorescent detection of SNPs // Analyst. 2013. V. 138, № 9. P. 2678–2682.

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА НА ТЕРРИТОРИИ АЛТАЙСКОГО КРАЯ

А.М. Никонов, О.В. Чекрий, Е.А. Корзникова, В.А. Никонова, А.А. Шипилов,
О.В. Плотникова, О.В. Цыпченко

Диагностический центр Алтайского края, медико-генетическая консультация, г. Барнаул

Пrenатальная диагностика – комплекс врачебных мероприятий и диагностических методов, направленных на выявление морфологических, структурных, функциональных или молекулярных нарушений внутриутробного развития человека [1]. На сегодняшний день пренатальная диагностика является самым действенным методом профилактики наследственной и врожденной патологии [2]. В Алтайском крае пренатальная диагностика осуществляется с 1991 г. В 2011 г. Алтайский край был включен в национальную программу по пренатальной диагностике. Были выделены федеральные субсидии для укрепления материально технической базы медико-генетической консультации [3], и в 2012 г. начата реализация программы.

Технология проведения пренатальной диагностики строго регламентирована. В сроке 11–14 нед беременности проводится ультразвуковой скрининг врачом, имеющим сертификат Международной федерации медицины плода (FMF). В этом же сроке делается анализ на маркерные сывороточные белки беременности [4]. По результатам этих исследований с помощью специальной компьютерной программы оценивается индивидуальный риск рождения ребенка с хромосомной патологией. Если он выше установленного порога, беременной рекомендуется пройти инвазивную пренатальную диагностику для кариотипирования плода [5].

Учитывая, что главным требованием программы является строгое соблюдение сроков проведения обследования [6], соответствующая подготовка специалистов и применение определенного лабораторного оборудования, принято решение централизовать все

этапы пренатальной диагностики. Для этого были созданы филиалы медико-генетической консультации, выполняющие функции межрайонных центров пренатальной диагностики, обучены специалисты – врачи ультразвуковой диагностики, медицинские сестры и регистраторы. Использование Интернета позволило в постоянном режиме осуществлять контроль выполнения технологии пренатальной диагностики на всех ее этапах. Осуществляются телеконсультации врачом-генетиком беременных группы риска по наследственной и врожденной патологии.

В 2013 г. по программе пренатальной диагностики в первом триместре было обследовано 17 840 беременных (табл. 1), что составило 56,6% от взятых на учет до 12 нед. Было выявлено 74 случая хромосомной патологии плода – все беременности прерваны. Из 481 беременности с диагностированным морфологическим дефектом плода прерваны 84, остальные женщины по разным причинам отказались от прерывания.

Замечен значительный рост показателей оказания медико-генетической помощи по программе пренатальной диагностики в 2013 г. по сравнению с предыдущими годами. В большой степени это связано с открытием двух межрайонных центров пренатальной диагностики – филиалов медико-генетической консультации.

Более чем в 3 раза увеличилось число обнаруженных пренатально случаев синдрома Дауна – самой частой хромосомной болезни (табл. 2). Этому способствовало внедрение метода комбинированного расчета риска по хромосомной патологии в первом триместре беременности.

Таблица 1

Показатели пренатальной диагностики за период 2011–2013 гг.

| Показатель | 2011 г. | 2012 г. | 2013 г. |
|---|---------|---------|---------|
| Число беременных, стоявших на учете в женской консультации, за отчетный год | 30 863 | 32 694 | 32 461 |
| Обследовано беременных в МГК, всего | 12 355 | 28 144 | 38 734 |
| из них на первично консультативном приеме | 4 280 | 7 366 | 13 158 |
| Число ультразвуковых исследований в МГК, всего | 8 213 | 28 144 | 38 734 |
| в том числе по генетическому скринингу (11–13 нед + 6 дней) | 4 280 | 11 325 | 17 840 |
| выявлено ВПР | 333 | 374 | 481 |
| Проведено исследований материнских сывороточных факторов в МГК: | | | |
| ХГЧ | 5 730 | 12 113 | 16 756 |
| РАРР-А | 5 737 | 12 113 | 16 756 |
| Проведено инвазивных процедур в МГК по генетическим показаниям, всего | 137 | 512 | 623 |
| из них биопсия хориона | 19 | 122 | 297 |
| кордоцентез | 118 | 390 | 326 |
| Проведено исследований плодного материала, всего | 137 | 512 | 623 |
| цитогенетических | 137 | 512 | 623 |
| биохимических | 2 | 1 | 0 |
| ДНК-диагностика | 2 | 8 | 6 |
| Выявлено патологии, всего | 15 | 55 | 76 |
| из них метаболических дефектов | 0 | 1 | 2 |
| хромосомных aberrаций | 15 | 54 | 74 |
| Прервано беременностей, всего | 161 | 185 | 158 |
| из них по ВПР | 146 | 131 | 84 |
| по хромосомной патологии | 15 | 54 | 74 |
| Совпадение с патоморфологическим диагнозом | 161 | 182 | 158 |

Таблица 2
Структура хромосомной патологии плода, диагностированной пренатально

| Хромосомная патология | 2011 г. | 2012 г. | 2013 г. |
|-------------------------|---------|---------|---------|
| Синдром Дауна | 10 | 25 | 33 |
| Синдром Эдвардса | 3 | 8 | 12 |
| Синдром Патау | – | 4 | 5 |
| Синдром Тернера | – | 3 | 10 |
| Синдром Клайнфельтера | 1 | 1 | 2 |
| 47,XXX | – | 2 | 2 |
| Синдром кошачьего крика | – | 1 | – |
| Другие | 2 | 9 | 10 |
| Всего | 16 | 53 | 74 |

Таблица 3

Относительная частота хромосомной патологии при различных факторах риска

| Фактор риска | Проведено инвазивных процедур | | Выявлена хромосомная патология | |
|---|-------------------------------|-------|--------------------------------|--|
| | Абс. | % | Абс. | % от числа обследованных с данным фактором риска |
| Комбинированный риск не менее 1:100 | 139 | 22,0 | 10 | 10,1 |
| Возраст не менее 39 лет | 86 | 14,0 | 3 | 5,5 |
| Два и более ультразвуковых маркера | 23 | 4,0 | 3 | 20,4 |
| Толщина воротникового пространства не менее 3 мм | 57 | 9,0 | 3 | 8,2 |
| Врожденный порок развития плода | 25 | 4,0 | 5 | 27,6 |
| Комбинированный риск не менее 1:100 + ультразвуковой маркер | 293 | 47,0 | 50 | 22,2 |
| Всего | 623 | 100,0 | 74 | |

Показаниями для кариотипирования плода являлись комбинированный риск по хромосомной патологии более 1 на 100, врожденные пороки развития плода, два и более ультразвуковых маркера, возраст беременной 39 лет и более и др.

Высокая частота хромосомной патологии встречалась при врожденных пороках развития плода (табл. 3). Если инвазивная пренатальная диагностика проводилась только по возрасту беременной, аномалии хромосом плода обнаруживались только в 5,5% случаях. Систематический анализ этих результатов позволит более эффективно проводить отбор пациенток для проведения кариотипирования плода.

В структуре выявленных врожденных пороков развития преобладали врожденные пороки развития центральной нервной системы – 1,27 случая на 1 тыс. родившихся. Множественные врожденные пороки развития диагностировались с частотой 0,92%, а врожденные пороки сердца – 0,44%. В течение 2013 г. в 34 случаях возникла необходимость подготовки к направлению новорожденного с врожденным пороком сердца в центр сосудистой хирургии.

Таким образом, как видно из представленных данных, пренатальная диагностика в Алтайском крае выполняется в полном объеме. Развитие сети

филиалов медико-генетической консультации повышает доступность пренатальной диагностики в самых отдаленных районах Алтайского края.

Литература

1. Бочков Н.П. Медицинская генетика. М.: Академия, 2003. 193 с.
2. Новиков П.В. Наследственная патология в структуре болезней детского возраста и организация медико-генетической помощи детям в Российской Федерации // Мед. генетика. 2008. Т. 7, № 12 (78). С. 3–7.
3. О мерах по реализации постановления Правительства Российской Федерации от 27 декабря 2010 г. № 1141 «О порядке предоставления субсидий из федерального бюджета бюджетам субъектов Российской Федерации на финансовое обеспечение мероприятий, направленных на проведение пренатальной (дорождовой) диагностики нарушений развития ребенка». Приказ МЗ и СР РФ от 1 февраля 2011 г. № 71н.
4. Основы пренатальной диагностики / под ред. Е.В. Юдиной и М.В. Медведева. М.: Реальное время, 2002. 184 с.
5. Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней / под ред. акад. РАМН, проф. Э.К. Айламазяна, чл.-корр. РАМН, проф. В.С. Баранова. М.: МЕДпресс-информ. 2006. 16 с.
6. Баранов В.С. и др. Современные алгоритмы пренатальной диагностики наследственных болезней: метод. пособие. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. 130 с.

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ И СПЕКТРА МУТАЦИЙ ГЕНА *CFTR* ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ НЕОНАТАЛЬНОГО СКРИНИНГА В ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

О.Н. Одинокова, Л.П. Назаренко

НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

Муковисцидоз – очень тяжелое гетерогенное и наиболее распространенное аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, связанное с нарушениями гена *CFTR*, кодирующего трансмембранный регуляторный белок муковисцидоза (ТРБМ) [1]. Частота заболевания в разных популяциях, эт-

нических группах существенно варьирует [2–5]. Сложность ДНК-диагностики болезни связана с огромным разнообразием мутаций гена *CFTR*: к настоящему времени описаны более 1 900 мутаций в гене *CFTR* (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). Самой распространенной в мире является мутация

F508del, а среди других известных мутаций гена *CFTR* большая часть генных нарушений являются достаточно редкими (с частотами 1–3–5%) или единичными. Вместе с тем спектры встречаемости мутаций гена *CFTR* обладают популяционной специфичностью, и для практической ДНК-диагностики муковисцидоза необходимо знание всего диапазона возможных мутаций в конкретных регионах (этнических группах). Муковисцидоз, несомненно, является важной медико-социальной проблемой для практического здравоохранения, что связано с ранней инвалидизацией больных, необходимостью постоянного лечения, активного диспансерного наблюдения и медико-социальной адаптации пациентов, а также с актуальностью ранней диагностики болезни. При этом в мире достигнуты существенные успехи в разработке эффективной современной тактики ведения этого тяжелого моногенного заболевания.

В связи с медико-социальной значимостью и актуальностью ранней диагностики болезни с 2006 г. в рамках приоритетного национального проекта «Здоровье» муковисцидоз включен в перечень заболеваний обязательного тестирования у новорожденных (наряду с фенилкетонурией, гипотиреозом, адреногенитальным синдромом и галактоземией). Скрининг новорожденных Томской области на муковисцидоз проводится в Научно-исследовательском институте медицинской генетики СО РАМН (г. Томск) с 1 июня 2006 г.

Целью настоящего исследования является определение по итогам 8-летнего функционирования программы неонатального скрининга в Томской области частоты муковисцидоза среди новорожденных Томской области, а также анализ частот и

спектра отдельных мутаций гена *CFTR*, определяемых у новорожденных с муковисцидозом.

Материал и методы

Новорожденные высокого риска развития муковисцидоза выявлялись посредством определения иммунореактивного трипсина (ИРТ) с использованием наборов «Дельфия неонатал (ИРТ)» фирмы Wallac Oy (Финляндия) в образцах сухой крови, взятой у новорожденных на четвертый день жизни. В институте была отработана приводимая ниже схема лабораторного обследования (рис. 1). С начала июня 2006 г. до конца мая 2014 г. было протестировано 103 636 новорожденных.

При определении высоких значений ИРТ (более 70 нг/мл), тест повторялся в повторно взятых пятнах крови, а при подтверждении высокого уровня ИРТ (более 40 нг/мл), семья приглашалась в генетическую клинику института, где у новорожденного исследовался уровень хлоридов пота; также одновременно проводился забор крови для ДНК-исследований.

Для молекулярно-генетической диагностики муковисцидоза методами ПЦР, рестрикции и анализа ДНК-фрагментов электрофорезом в агарозном и акриламидном гелях нами проводилось исследование группы частых мутаций гена *CFTR*: F508del, I507del, 1677delTA, CFTRdele2,3 (del21kb), R334W, R347P, G551D, R553X, G542X, 2143delT, 2184insA, 394delTT, 306delTAGA, 3821delT, L138ins, N1303K, W1282X, 2176insC, 2184delA, 2183delAA, 2183AA→G, R117H, 3944delGT, 3849+10kbC→T, E92K и др. мутации [6], а также исследовались варианты аллелей политимидинового тракта в интроне 8 гена *CFTR* (IVS8-Tn: IVS8-5T, IVS8-7T, IVS8-9T).

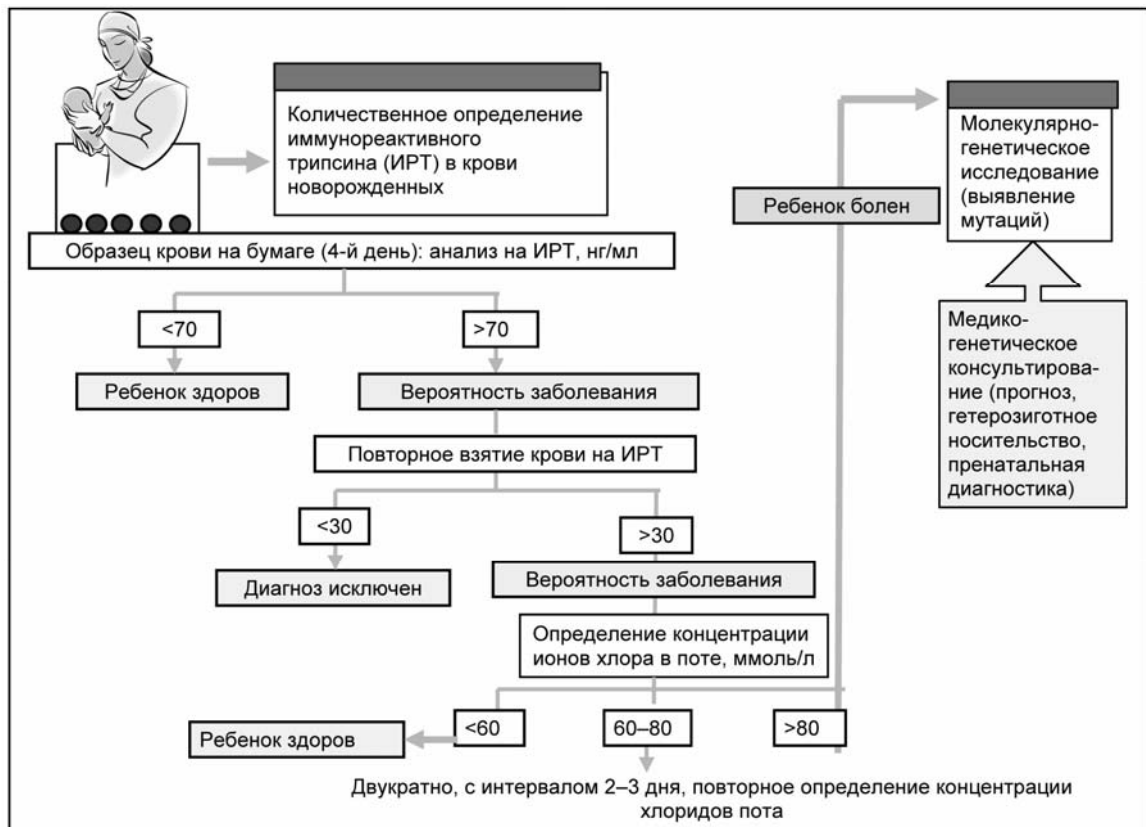


Рис. 1. Схема организации скрининга на муковисцидоз у новорожденных Томской области

Результаты и обсуждение

Таблица 1

Охват скринингом на муковисцидоз в Томской области

| Период скрининговой программы | Количество родившихся детей | Количество обследованных детей | % обследованных новорожденных |
|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 2006 г. | 11 305 | 7 123 | 63,01 |
| 2007 г. | 11 944 | 9 477 | 79,35 |
| 2008 г. | 13 579 | 11 220 | 82,63 |
| 2009 г. | 13 661 | 13 367 | 97,85 |
| 2010 г. | 13 725 | 13 662 | 99,54 |
| 2011 г. | 13 675 | 13 543 | 99,03 |
| 2012 г. | 14 761 | 14 599 | 98,90 |
| 2013 г. | 14 809 | 14 565 | 98,35 |
| 2014 г. (январь – май) | 6 116 | 6 080 | 99,41 |

В настоящее время скрининг новорожденных на муковисцидоз проводится во многих странах. Описание в 1979 г. повышенного уровня иммунореактивного трипсина (ИРТ) в сыворотке крови новорожденных с муковисцидозом на первой неделе их жизни [7] заложило основу для последующей разработки и внедрения в отдельных странах массового тестирования новорожденных с использованием образцов высушенной крови. Как оказалось, увеличенный уровень ИРТ – высокочувствительный признак, но вместе с тем он не является специфичным исключительно для муковисцидоза. В связи с чем в дальнейшем предпринимались различные приемы усовершенствования программы неонатального скрининга [8, 9]. Для этого помимо первичного ИРТ-теста обоснована необходимость проведения второго этапа обследования, который может включать один из трех этапов (либо их комбинацию): повторный тест на ИРТ на 21–28-й день жизни ребенка, потовый тест (золотой стандарт диагностики МВ) и ДНК-диагностику мутаций гена *CFTR*. Интересно, что сам протокол второго, т.е. подтверждающего этапа неонатального скрининга на муковисцидоз может отличаться по своей структуре в различных странах [9]. То есть на первом этапе всегда определяется уровень ИРТ на 1-й нед жизни, далее на втором проводится либо повторный ИРТ на 3–4-й нед жизни, либо потовый тест, либо ДНК-исследование, либо комбинация (одновременная или последовательная) этих этапов; в отдельных странах предусмотрен только один из этапов (например, потовый тест либо ДНК-анализ). Причем определяется это не только финансовыми возможностями здравоохранения отдельных стран, но и спектром (или диапазоном) мутаций, имеющихся у значимой доли больных данного региона или этнической группы, а также этнической структурой региона скрининга.

Протокол скрининга новорожденных на муковисцидоз в России включает три обязательных этапа: первичный ИРТ-тест в образцах высушенной крови новорожденных на 1-й нед жизни, повторный ИРТ и потовый тест. Этап ДНК-диагностики в официальном протоколе в настоящее время не предусмотрен в обязательном порядке.

Начиная в 2006 г. в Томской области скрининг новорожденных на муковисцидоз и имея уже достаточно большой опыт обследования больных региона с данной патологией (молекулярно-генетические исследования мутаций гена *CFTR* проводятся в НИИ медицинской генетики Томска с 1991 г.), наряду с традиционной схемой скрининга с самого начала функционирования программы неонатального тестирования на муковисцидоз ставилась задача включения обязательного этапа ДНК-диагностики у новорожденных с высоким риском.

Поэтому вслед за первым этапом (первичный ИРТ-тест) при определении высоких значений ИРТ (более 70 нг/мл) проводился ретест в повторно взятых пятнах крови, а далее при обнаружении уровня ИРТ выше 40 нг/мл семья новорожденного высокого риска приглашалась в генетическую клинику института, где у новорожденного исследовался уровень хлоридов пота, а также одновременно проводился забор крови для ДНК-исследований.

Количество новорожденных, обследованных по внедренной программе на муковисцидоз, приведено в табл. 1. В Томской области скрининг осуществлялся с начала июня 2006 г. В первые годы функционирования программы (2007–2008 гг.) у нас, как и в других регионах, существовала проблема с плановой поставкой биохимических наборов для обеспечения непрерывного осуществления скрининга новорожденных в Томской области, в связи с чем были протяженные этапы отсутствия скрининга на муковисцидоз, что сказывалось на охвате новорожденных (табл. 1), далее проблема была решена.

Всего за 8-летний период функционирования программы скрининга с июня 2006 г. по май 2014 г. в Томской области было протестировано 103 636 новорожденных.

Внедренная схема обследования, в том числе молекулярно-генетическая диагностика у выявленных новорожденных высокого риска с исследованием группы частых мутаций гена *CFTR*: F508del, I507del, 1677delTA, CFTRdele2,3 (del21kb), R334W, R347P, G551D, R553X, G542X, 2143delT, 2184insA, 394delTT, 306delTAGA, 3821delT, L138ins, N1303K, W1282X, 2176insC, 2184delA, 2183delAA, 2183AA→G, R117H, 3944delGT, 3849+10kbC→T, E92K и др. мутаций, – а также с привлечением анализа вариантов аллелей политимидинового тракта в интроне 8 гена *CFTR* (IVS8-Tn: IVS8-5T, IVS8-7T, IVS8-9T), позволила установить муковисцидоз в 18 случаях.

Анализ мутаций гена *CFTR* у новорожденных высокого риска, выявленных при реализации неонатального скрининга, позволил обеспечить действительно максимально раннюю диагностику муковисцидоза. У каждого из обследованных новорожденных с последующим диагнозом «муковисцидоз» были выявлены мутации гена *CFTR*. В семьях выявленных больных в дальнейшем возможно проведение пренатальной (дородовой) диагностики посредством тестирования мутаций или информативных ДНК-полиморфных маркеров.

Примечательно, что при вызове для подтверждающей диагностики в НИИ медицинской генетики у многих младенцев с подтвержденным в дальнейшем диагнозом «муковисцидоз» не было никаких видимых признаков заболевания, кроме очень медленной прибавки массы тела. Но после точной постановки диагноза детям начиналось лечение, специфичное для муковисцидоза, и лишь после этого восстанавливалась прибавка массы тела.

Выявленные генотипы по мутациям гена *CFTR* среди новорожденных с муковисцидозом представлены в табл. 2.

Таблица 2

Мутации гена *CFTR* у новорожденных с муковисцидозом, выявленных за время реализации программы неонатального скрининга в Томской области

| Выявленные среди новорожденных больные муковисцидозом | Выявленные мутации гена <i>CFTR</i> |
|---|-------------------------------------|
| Новорожденный с МВ № 1 | F508del/F508del |
| Новорожденный с МВ № 2 | F508del/F508del |
| Новорожденный с МВ № 3 | R334W/– (н.о.) |
| Новорожденный с МВ № 4 | F508del/CFTRdele2,3 (del21kb) |
| Новорожденный с МВ № 5 | F508del/F508del |
| Новорожденный с МВ № 6 | 2184insA/E92K |
| Новорожденный с МВ № 7 | F508del/дупликация |
| Новорожденный с МВ № 8 | F508del/F508del |
| Новорожденный с МВ № 9 | F508del/– (н.о.) |
| Новорожденный с МВ № 10 | F508del/CFTRdele2,3 (del21kb) |
| Новорожденный с МВ № 11 | F508del/F508del |
| Новорожденный с МВ № 12 | F508del/F508del |
| Новорожденный с МВ № 13 | CFTRdele2,3 (del21kb)/– (н.о.) |
| Новорожденный с МВ № 14 | F508del/F508del |
| Новорожденный с МВ № 15 | F508del/– (н.о.) |
| Новорожденный с МВ № 16 | IVS8-5T/I148T |
| Новорожденный с МВ № 17 | F508del/2184insA |
| Новорожденный с МВ № 18 | F508del/F508del |

Примечание. н.о. – мутация на настоящее время не определена.

У обследуемых были определены мутации F508del, CFTRdele2,3 (del21kb), 2184insA, R334W, E92K, I148T, а также в одном случае был установлен аллельный вариант IVS8-5T политимидинового тракта в интроне 8 гена *CFTR*.

Наряду с мелкими нуклеотидными мутациями гена муковисцидоза (табл. 2) удалось также выявить одну крупную генную дупликацию, включающую, по крайней мере, интрон 6 – экзон 10 гена *CFTR* (табл. 2, случай № 7). Отметим, что такие крупные перестройки, по литературным данным, составляют до 3–5% мутаций гена *CFTR* и представляют проблему в связи со сложностью их идентификации при обычно используемом ДНК-тестировании.

По результатам исследования на данном этапе возможна оценка относительных частот встречаемости в Томской области отдельных мутаций гена *CFTR* у новорожденных с муковисцидозом: основная мутация F508del наблюдалась в 61,11% хромосом больных новорожденных, вторая мутация CFTRdele2,3 (del21kb) имела частоту 8,33%, относительно редкие точечные мутации выявлены в 16,67%, а также один случай крупной генной дупликации (2,78%). Всего идентифицированы 88,89% мутантных вариантов гена *CFTR* у новорожденных с муковисцидозом. Не определяемые на настоящее время мутации гена составили 11,11% (табл. 3).

Таблица 3

Оценка частот мутаций гена *CFTR* у родившихся за время реализации программы неонатального скрининга в Томской области

| Мутация гена <i>CFTR</i> | Количество, абс. | Частота, % |
|---------------------------------|------------------|------------|
| F508del | 22 | 61,111 |
| CFTRdele2,3 (del21kb) | 3 | 8,333 |
| R334W | 1 | 2,778 |
| 2184insA | 2 | 5,555 |
| E92K | 1 | 2,778 |
| IVS8-5T | 1 | 2,778 |
| I148T | 1 | 2,778 |
| Крупная внутригенная дупликация | 1 | 2,778 |
| Всего идентифицированы | 32 | 88,889 |
| Не идентифицированы | 4 | 11,111 |

В целом проблемы ДНК-диагностики болезни связаны с огромным разнообразием мутаций гена *CFTR*, при этом для популяций могут быть характерны различные спектры типичных мутаций у больных, особенно сложно с определением необходимой достаточной панели тестируемых мутаций бывает в популяциях со смешанной этнической структурой.

Следует отметить, что согласно современным стандартам генетический анализ мутаций гена *CFTR* может считаться эффективным при более чем 95%-й вероятности обнаружения мутаций гена *CFTR*, что к настоящему времени для большого числа стран (вследствие недостаточности изученности всего спектра популяционно-специфичных мутаций, приводящих к муковисцидозу) очень проблематично. В последние годы молекулярная диагностика муковисцидоза в России существенно совершенствуется, однако в настоящее время при тестировании даже достаточно обширного спектра «европейских» мутаций ДНК-диагностика у больных муковисцидозом в России не всегда является информативной, приблизительно 20% мутантных генов остаются неидентифицированными.

В связи с этим одной из ключевых задач по оптимизации молекулярно-генетической диагностики муковисцидоза является расширение панели тестируемых мутаций и при необходимости, в сложных диагностических случаях, использование прямого секвенирования нуклеотидной последовательности гена. Это позволит окончательно определяться с молекулярно-генетическим диагнозом, а в последующем и корректировать терапию в зависимости от выявленной мутации.

Проводимый неонатальный скрининг также позволяет оценить частоту болезни у новорожденных Томской области. По итогам тестирования 103 636 новорожденных (июнь 2006 г. – май 2014 г.), муковисцидоз выявлен в 18 случаях, что предполагает высокую встречаемость заболевания – у 1 из 5 758 новорожденных.

Частота заболевания в разных популяциях, этнических группах существенно варьирует. Напри-

мер, у европейцев средняя встречаемость составляет примерно 1 случай на 3 тыс. новорожденных [2, 3]. Согласно результатам российского скрининга, заболеваемость муковисцидозом на начало 2011 г. составила 1 на 10 498 новорожденных [4], а согласно данным скрининга за 2010–2012 гг. частота муковисцидоза среди новорожденных определена на уровне 1:9 550, при этом она варьирует от 1:7 642 в Сибирском округе до 1:18 881 в Северо-Кавказском регионе [5].

Таким образом, по итогам 8-летнего функционирования программы неонатального скрининга новорожденных Томской области на муковисцидоз можно констатировать, что успешно внедрена схема неонатального скрининга, включающая обязательный этап подтверждающей молекулярно-генетической диагностики – проведение ДНК-анализа у большого и, желательнее, тестирование носительства мутаций у его близких родственников. По итогам работы оценены спектр и встречаемость отдельных мутаций гена *CFTR* у новорожденных с муковисцидозом, частота муковисцидоза среди новорожденных составила 1 к 5 758.

Литература

1. Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of

complementary DNA // *Science*. 1989. V. 245. P. 1066–1073.

2. Lewis P.A. The epidemiology of cystic fibrosis // Hodson M.E., Geddes D. (eds.) *Cystic Fibrosis*. 2nd ed. London: Arnold, 2000. P. 2–23.
3. Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. СПб.: Интермедика, 2002. 256 с.
4. Капранов Н.И. Современные аспекты муковисцидоза // Сборник трудов XXII Национального конгресса по болезням органов дыхания. 2012. С. 12–15.
5. Новиков П.В. Массовый скрининг новорожденных на наследственные болезни в России: первые итоги расширенного скрининга // XII Российский конгресс «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии». М., 2012. С. 98–99.
6. Одинокова О.Н., Назаренко Л.П. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование при муковисцидозе в Сибирском регионе // *Генетика человека и патология*. Вып. 8. Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2007. С. 173–178.
7. Crossley J.R., Elliott R.B., Smith P.A. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn // *Lancet*. 1979. № 1 (8114). P. 472–474.
8. Southern K.W., Munck A., Pollitt R. et al. A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe // *Journal of Cystic Fibrosis*. 2007. V. 6, № 1. P. 57–65.
9. Castellani C., Southern K.W., Brownlee K. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening // *Journal of Cystic Fibrosis*. 2009. V. 8, № 3. P. 153–173.

ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВ И МУЖСКОЕ БЕСПЛОДИЕ

С.А. Руднева, Е.Е. Брагина, В.Б. Черных, Т.М. Сорокина, Л.В. Шилейко,
С.А. Ермолаева, Л.Ф. Курило

Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва

Введение

Фрагментация ДНК сперматозоидов (наличие двухцепочечных и одноцепочечных разрывов молекулы) – одна из относительно недавно открытых причин мужского бесплодия [1]. Чем больше в клетке таких повреждений, тем ниже степень целостности генетического материала. Следует отметить, что сперматозоиды даже со значительным количеством повреждений ДНК могут сохранить способность оплодотворять ооциты, однако в дальнейшем эмбриональное развитие может блокироваться, что приводит к прерыванию беременности. В ряде работ отмечено, что в супружеских парах, где мужчины имели уровень фрагментации ДНК сперматозоидов более 30%, были низкими и частота формирования blastocyst, и частота наступления беременности в циклах ЭКО и ICSI, а также повышена вероятность невынашивания беременности [2]. В других работах авторы показали, что фрагментация ДНК может не оказывать влияния на оплодотворение, но имеет важное значение для формирования blastocyst и имплантации [3–5]. Необходимо отметить, что ни один другой из рекомендованных ВОЗ параметров спермы, таких как объем, концентрация сперматозоидов в эякуляте, подвижность и морфология сперматозоидов, не дает прогноза низкой частоты формирования blastocyst. В настоящее время патофизиологические механизмы, приводящие к фрагментации ДНК, еще не до конца изучены. Предполагают, что их причиной могут быть дефекты

ремоделирования хроматина, связанные с потерей гистонов и их заменой на протамины в ходе сперматогенеза, апоптоз и окислительные процессы [6]. Предположение о корреляции между морфологическими параметрами сперматозоидов и частотой фрагментации ДНК было выдвинуто на основании того, что важная роль апоптоза в соматических клетках состоит в устранении дефектных клеток. ДНК разрушается в аномальных сперматозоидах по аналогии с различными типами соматических клеток [7]. Аномалии хроматина сперматозоидов часто ассоциированы с низкими показателями спермограммы, однако многие исследователи констатируют, что частота фрагментации не имеет четкой корреляции с параметрами сперматозоидов, рекомендованными ВОЗ при сперматологическом исследовании (концентрацией, подвижностью, морфологией). Сперматозоид, морфологически (с использованием световой фазово-контрастной микроскопии) оцененный как нормальный, может иметь поврежденную ДНК [5, 8]. В других исследованиях найдены отрицательные корреляции между частотой фрагментации ДНК и характеристиками спермограммы: концентрацией, подвижностью и уровнем морфологически аномальных сперматозоидов [5]. Однако во всех приведенных исследованиях были небольшие выборки. Цель работы – выявление корреляции между морфологическими параметрами сперматозоидов и повышенной частотой фрагментации ДНК на выборке из 461 мужчины с диагнозом «бесплодие», 106 из которых имели частоту фрагментации ДНК выше нормы (15%).

Материал и методы

Обследование включало следующие методы: клиническое, стандартное спермиологическое и специальное спермиологическое исследование (анализ фрагментации ДНК с помощью метода TUNEL).

Критериями отбора служили:

1. Первичное и вторичное бесплодие у мужчин, наличие невынашивания беременности, замершая беременность у супружеской пары, неудачные попытки ЭКО.

2. Отсутствие в анамнезе и по данным обследования явных причин мужского бесплодия: аномалий кариотипа, отсутствие непроходимости семявыносящих путей.

Спермиологический анализ эякулята выполняли по стандартной методике, рекомендованной ВОЗ (2010). При анализе эякулята оценивали: объем эякулята, цвет, консистенцию, pH, концентрацию сперматозоидов в 1 мл эякулята и их общее количество, степень подвижности, количественный анализ патологических форм сперматозоидов. Фрагментацию ДНК определяли методом TUNEL на мазках эякулята. Образцы спермы наносили на адгезивные стекла (Histo Bond) и обрабатывали по протоколу фирмы изготовителя (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, PROMEGA). Препараты окрашивали DAPI (4,6-diamino-2-phenylidole, Sigma (США)) для специфической окраски ДНК. Просмотр осуществляли с помощью микроскопа Axiovert 200V (Carl Zeiss, Германия).

Результаты и обсуждение

Уровень фрагментации ДНК в сперматозоидах у обследованных мужчин с нарушением репродуктивной функции варьировал от 1 до 84%. Средний уровень составил 12,6%. На рис. 1 показан график распределения пациентов с различной степенью фрагментации ДНК сперматозоидов. Наглядно видно, что частотный максимум приходится на область от 4 до 14%, при этом у 23% мужчин с бесплодием частота

фрагментации ДНК сперматозоидов была выше нормы, у 18% пациентов находилась в диапазоне от 15 до 30%, а у 5% превышала 30%-й уровень.

Для дальнейшего спермиологического анализа было отобрано 94 пациента. На основании собственных и литературных данных о пороговых уровнях фрагментации ДНК в сперматозоидах [2] обследованные пациенты с различным состоянием репродуктивной функции были разделены на три группы. В первую группу вошли мужчины с уровнем фрагментации ДНК ниже нормы – меньше 15% (42 человека, возраст мужчин варьировал от 29 до 49 лет, средний возраст 35 лет), вторую группу представляли мужчины, у которых степень фрагментации ДНК сперматозоидов находилась в диапазоне от 15 до 30% (41 человек, возраст мужчин варьировал от 27 до 51 года, средний возраст 37 лет), третью группу составили мужчины, у которых степень фрагментации ДНК сперматозоидов превышала 30% (11 человек, возраст мужчин варьировал от 37 до 51 года, средний возраст 40 лет).

На рис. 2 показано распределение количества пациентов в зависимости от частоты фрагментации ДНК и концентрации сперматозоидов. Наглядно видно, что среди мужчин, имеющих концентрацию сперматозоидов менее 20 млн/мл, количество пациентов, у которых частота фрагментации ДНК сперматозоидов была выше нормы, обратно пропорционально зависит от концентрации сперматозоидов (рис. 2). Таким образом, показано, что степень тяжести олигозооспермии у пациентов коррелирует с частотой фрагментации ДНК в сперматозоидах. Чем тяжелее форма олигозооспермии, тем больше вероятность того, что у пациента частота фрагментации ДНК сперматозоидов будет выше нормы. Среди пациентов, у которых концентрация сперматозоидов в эякуляте превышала 20 млн/мл (астенотератозооспермия и тератозооспермия), доля тех, у которых частота фрагментации ДНК сперматозоидов превышала нормативные показатели, составила 63%.

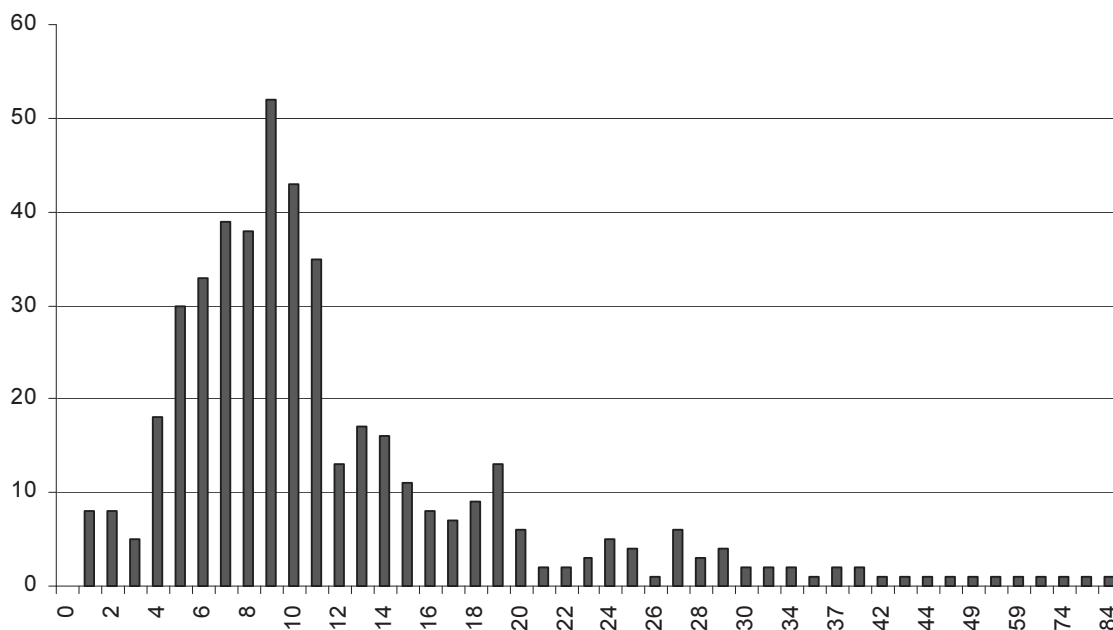


Рис. 1. Распределение частоты встречаемости пациентов с различной степенью фрагментации ДНК сперматозоидов

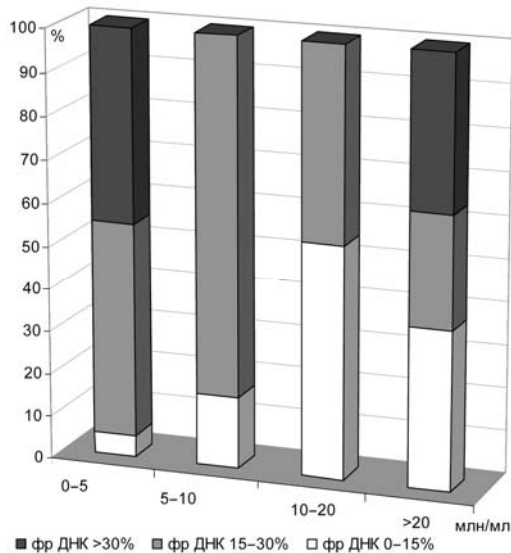


Рис. 2. Распределение числа пациентов в зависимости от частоты фрагментации ДНК и концентрации сперматозоидов

Такое увеличение частоты фрагментированной ДНК мужских гамет у пациентов с концентрацией сперматозоидов выше 20 млн/мл, вероятно, не связано с активацией апоптоза и элиминацией поврежденных сперматозоидов, а, возможно, обусловлено другими причинами возникновения разрывов в ДНК: окислительным стрессом или нарушением в ремоделировании хроматина либо с наличием сразу нескольких механизмов, приводящих к увеличению уровня фрагментации ДНК сперматозоидов.

Следует особо отметить, что у 9 из обследованных пациентов с повышенной частотой фрагментации ДНК в мужских гаметах наблюдали падение концентрации сперматозоидов при повторных исследованиях. В таблице приведены данные по динамике концентрации сперматозоидов у пациента Г.М.М. с повышенной частотой фрагментации ДНК в мужских гаметах (58%) и (для сравнения) данные пациента Н.Е.В. (контроль) с частотой фрагментации ДНК сперматозоидов в пределах нормы (9,6%).

Изменения концентрации сперматозоидов в 1 мл с течением времени у пациентов с различной степенью фрагментации ДНК

| Пациент Г.М.М. (фр. ДНК 58%) | | Пациент Н.Е.В. (фр. ДНК 9,6%) (контроль) | |
|---------------------------------|-------------------|---|-------------------|
| Концентрация, млн/мл | Дата обследования | Концентрация, млн/мл | Дата обследования |
| 17 | 05.11.2009 | 16,5 | 09.12.2009 |
| 8,0 | 04.03.2010 | 10,4 | 23.04.2010 |
| 8,5 | 31.09.2010 | 20,5 | 21.05.2010 |
| 6,75 | 26.05.2011 | 19,5 | 28.06.2010 |
| 1,85 | 03.09.2013 | 16 | 20.09.2010 |

На рис. 3 и 4 показано распределение количества пациентов в зависимости от частоты фрагментации ДНК и доли (%) атипичных сперматозоидов соответственно. Видно, что график зависимости числа пациентов (частота фрагментации ДНК в гаметах которых превышала 30%) от количества морфологически аномальных сперматозоидов имеет единственный максимум с последующим значительным падением (рис. 3). У большей части (64%) обследованных мужчин данной группы уровень атипичных

сперматозоидов составил 95–100%, причем у 28% из них отмечали тотальную тератозооспермию.

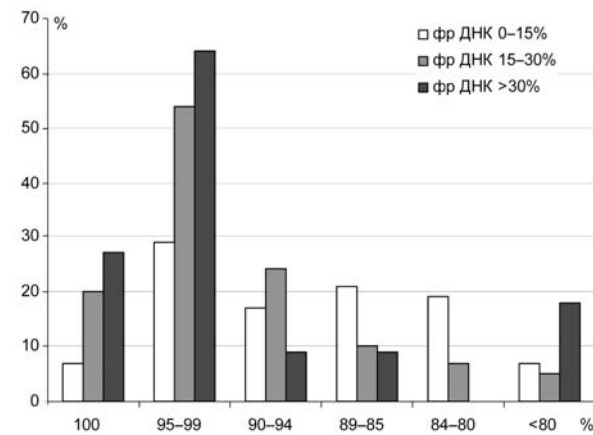


Рис. 3. Распределение количества пациентов в зависимости от частоты фрагментации ДНК и доли атипичных сперматозоидов

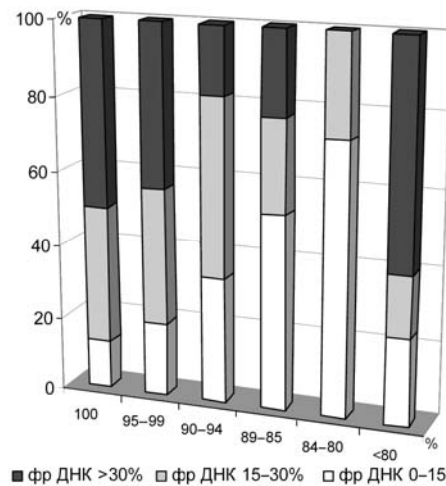


Рис. 4. Долевое распределение количества пациентов в зависимости от частоты фрагментации ДНК и доли атипичных сперматозоидов

График зависимости числа пациентов (частота фрагментации ДНК которых была в диапазоне от 15 до 30%) от количества морфологически аномальных сперматозоидов сходен с аналогичным графиком для пациентов, частота фрагментации ДНК сперматозоидов которых превышала 30%, и также имеет единственный максимум с последующим экспоненциальным падением. Большая часть (54%) мужчин данной группы имели 95–100% атипичных сперматозоидов, причем у 20% из них в эякуляте не было обнаружено ни одного типичного сперматозоида. У тех пациентов, у которых частота фрагментации ДНК сперматозоидов была ниже нормы, график зависимости числа пациентов от количества морфологически аномальных сперматозоидов имеет более равномерное распределение.

Как видно из приведенных на рис. 4 данных, среди пациентов с тотальной тератозооспермией доля мужчин с повышенной фрагментацией ДНК составила 87%. Рассматривая выборки мужчин с различным уровнем атипичных сперматозоидов в диапазоне от 80 до 100%, видно, что в этих группах число пациентов, у которых частота фрагментации

ДНК сперматозоидов была выше нормы, линейно зависит от количества (%) атипичных сперматозоидов. Таким образом, показано, что количество (%) атипичных сперматозоидов, по крайней мере в диапазоне от 80 до 100% морфологически аномальных гамет, коррелирует с частотой фрагментации ДНК. Чем больше число атипичных сперматозоидов, тем выше вероятность, того, что частота фрагментации ДНК будет превышать норму (15%). Однако и среди мужчин, у которых количество типичных сперматозоидов составило более 20%, число пациентов, у которых фрагментация ДНК сперматозоидов была выше нормы, составило 77%. Увеличение частоты фрагментированной ДНК сперматозоидов у пациентов со степенью атипичности мужских гамет менее 80%, так же как и при увеличении их концентрации более 20 млн/мл, не может объясняться факторами апоптоза, связанными с элиминацией поврежденных сперматозоидов, а, возможно, связано с другими причинами возникновения разрывов в ДНК. Также оценена взаимосвязь частоты фрагментации ДНК сперматозоидов от степени их подвижности (рис. 5, 6). Как видно из рис. 5, график зависимости числа пациентов с высокой степенью фрагментации ДНК сперматозоидов (более 30%) от степени подвижности сперматозоидов имеет единственный максимум. У большинства (45%) мужчин данной группы число прогрессивно подвижных (PR) сперматозоидов составило менее 5%. График зависимости числа пациентов (степень фрагментации ДНК сперматозоидов которых была в диапазоне от 15 до 30%) от степени подвижности сперматозоидов имеет два максимума. Первый максимум (24% пациентов данной группы) отмечен при количестве подвижных сперматозоидов 0–5%. Второй максимум (29% пациентов, с той же частотой фрагментации) наблюдали при количестве подвижных сперматозоидов от 20 до 30%. График зависимости частоты пациентов с нормальным уровнем фрагментации от количества подвижных сперматозоидов имеет единственный сдвинутый максимум. Большая часть (30%) пациентов данной группы имели количество подвижных сперматозоидов в диапазоне от 30 до 40%.

Среди мужчин с долей подвижных сперматозоидов менее 5% число пациентов с повышенной фрагментацией ДНК составило 91%. Рассматривая группу мужчин, у которых степень подвижности сперматозоидов находилась в диапазоне от 0 до 20%, видно, что число тех пациентов, у которых частота фрагментации ДНК сперматозоидов была выше нормы, обратно пропорционально зависело от числа подвижных сперматозоидов. Чем ниже подвижность сперматозоидов, тем выше вероятность того, что частота фрагментации ДНК будет выше нормы. Однако у пациентов с количеством подвижных сперматозоидов более 20% количество мужчин с повышенным уровнем фрагментации ДНК составило 73%. Данное увеличение частоты фрагментированной ДНК у пациентов с высокой подвижностью сперматозоидов, так же как это было и при высоких концентрациях сперматозоидов, не может объясняться факторами апоптоза, связанными с элиминацией поврежденных сперматозоидов, а, возможно, определяется другими причинами возникновения разрывов в ДНК: окислительным стрессом или нарушением в ремоделировании хроматина, либо с наличием сразу нескольких

механизмов, приводящих к фрагментации ДНК сперматозоидов.

Таким образом, полученные результаты позволили выделить диапазон патозооспермии, в котором существует корреляция между морфологическими параметрами и частотой фрагментации ДНК сперматозоидов.

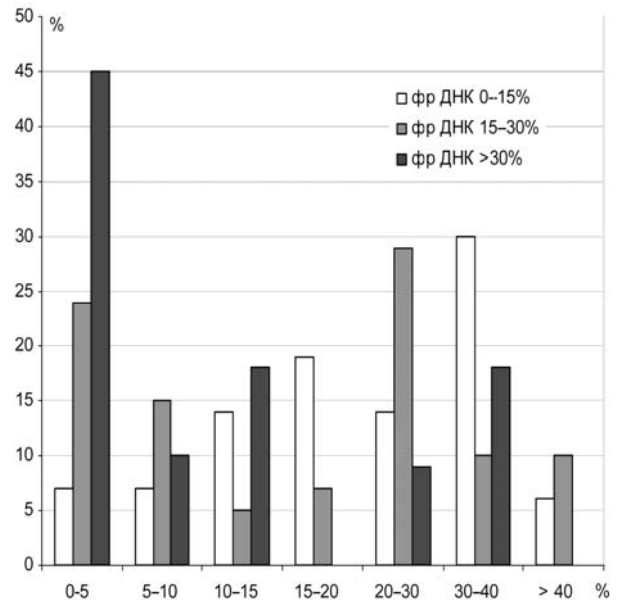


Рис. 5. Распределение количества пациентов в зависимости от частоты фрагментации ДНК и степени подвижности сперматозоидов

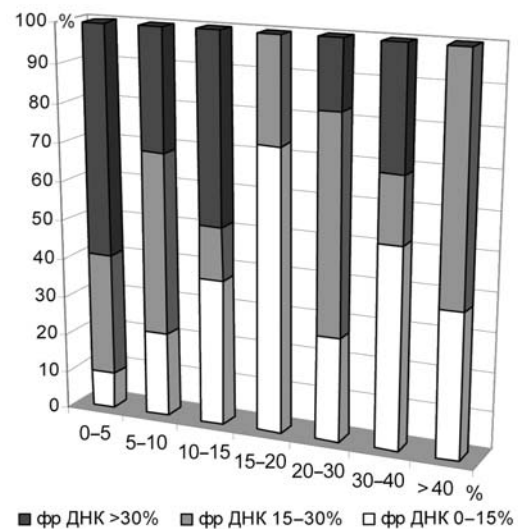


Рис. 6. Долевое распределение количества пациентов в зависимости от частоты фрагментации ДНК и степени подвижности сперматозоидов

Полученные данные подтверждают предположение о корреляции между морфологическими параметрами сперматозоидов в области патозооспермии и частотой фрагментации их ядерной ДНК. Показано, что степень нарушения сперматогенеза у пациентов коррелирует с частотой фрагментации ДНК в их сперматозоидах. Чем тяжелее форма патозооспермии, тем больше вероятность того, что у пациента частота фрагментации ДНК мужских гамет будет выше нормы. В то же время в каждой группе пациентов с аномальными параметрами спермо-

граммы (с патозооспермией) присутствовала часть мужчин, которые не имели повышенного уровня фрагментации ДНК. При олигозооспермии III степени тяжести – 5%, при олигозооспермии II степени тяжести – 17%, при олигозооспермии I степени тяжести – 56%, при тератозооспермии – 37%. Эти супружеские пары имеют большую вероятность достижения беременности в циклах ЭКО и ICSI [2].

Основные параметры эякулята, такие как концентрация сперматозоидов, подвижность и количество морфологически нормальных форм сперматозоидов, несомненно, имеют важное прогностическое и диагностическое значение. Однако по результатам стандартного спермиологического исследования нередко нельзя судить о состоянии генома сперматозоида, поскольку обнаружено значительное увеличение частоты фрагментированной ДНК в мужских гаметах при рассмотрении отдельных показателей спермограммы (концентрации, морфологии и подвижности сперматозоидов), находящихся в пределах нормы. Увеличение частоты фрагментированной ДНК в мужских гаметах при нормальных показателях спермограммы и идиопатическом бесплодии не может объясняться механизмом апоптоза, связанным с элиминацией поврежденных сперматозоидов. Очевидно, важная роль в этом процессе отведена окислительному стрессу и нарушениям в процессе ремоделинга хроматина. Его целостность является внутренним параметром повреждения сперматозоидов, который нельзя выявить с помощью обычного спермиологического исследования и который имеет прогностическое значение в отношении успешности лечения и (или) решения проблемы репродукции с помощью методов ЭКО. Анализ данных литературы свидетельствует о том, что увеличение количества сперматозоидов с фрагментированной ДНК коррелирует с частотой прерывания беременности вне зависимости от метода искусственного оплодотворения. Так, при увеличении количества сперматозоидов с фрагментированной ДНК в эякуляте частота спонтанного прерывания беременности составляет около 37%, при этом, если количество сперматозоидов с поврежденной ДНК в эякуляте соответствует норме, частота спонтанных абортос составляет лишь 10% [9]. Кроме того, нарушение целостности ДНК сперматозоидов может служить причиной появления врожденных пороков развития и генетических заболеваний эмбриона. При оплодотворении ооцита сперматозоидом с фрагментированной ДНК системы репарации ооцита могут исправить около 8% повреждений ДНК сперматозоида [4]. Однако репарация ДНК с ошибками может привести к появлению делеций и нарушению правильной последовательности оснований в ДНК мужских гамет. Действительно, показано, что до 80% структурных перестроек хромосом, возникших *de novo*, имеет отцовское происхождение [10, 11]. Кроме того, у детей, в эякуляте отцов которых число сперматозоидов с фрагментированной ДНК было повышено, частота раковых заболеваний в раннем возрасте была в 4–5 раз выше популяционной [9].

Одним из представляющих научное и практическое значение результатов данного исследования является то, что у мужчин с частотой фрагментацией ДНК более 30% отмечено выраженное снижение концентрации сперматозоидов с возрастом. Изме-

нения параметров эякулята в динамике у мужчин с повышенной частотой фрагментации ДНК сперматозоидов ранее практически не исследовали. Ухудшение показателей количества и качества сперматозоидов у мужчин с повышенной частотой фрагментации ДНК в мужских гаметах требует дальнейшего исследования, а также поднимает вопрос о целесообразности криоконсервации сперматозоидов у данной группы пациентов для дальнейшего их использования при искусственном оплодотворении.

В последнее время широко развиваются методы преодоления повышенной частоты фрагментации ДНК в сперматозоидах. В некоторых исследованиях показано, что введение антиоксидантов может значительно понизить уровень фрагментации ДНК сперматозоидов. Это подтверждает гипотезу о том, что механизм возникновения разрывов часто связан с окислительным стрессом. Кроме того, для преодоления высоких показателей частоты фрагментации ДНК в эякулированных сперматозоидах предложен способ лечения с применением тестикулярных сперматозоидов [12]. Обзор исследований, посвященных показателям фрагментации ДНК сперматозоидов, и данные наших исследований позволяют заключить, что этот параметр имеет самостоятельное диагностическое и прогностическое значение для пациентов с бесплодием. Особенно это исследование актуально для мужчин, у которых параметры спермограммы приближены к нормальным значениям и при наличии неоднократных случаев спонтанных выкидышей у их жен. Несмотря на то что механизмы образования разрывов еще не до конца ясны, исследование фрагментации ДНК сперматозоидов может служить эффективным прогностическим инструментом, выявляющим мужской фактор нарушения фертильности. Снижение высокого уровня фрагментации ДНК сперматозоидов с помощью эмбриологических и андрологических методов в ряде случаев помогает преодолеть обусловленный им мужской фактор инфертильности.

Литература

1. Маркова Е.В., Замай А.С. Фрагментация ДНК в сперматозоидах человека // Проблемы репродукции. 2006. № 4. С. 42–50.
2. Virro M.R., Larson-Cook K.L., Evenson D.P. Sperm chromatin structure assay (scca) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles // Fertil. Steril. 2004. V. 81, № 5. P. 1289–1295.
3. Seli E., Gargner D.K., Schoolcraft W.B. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after *in vitro* fertilization // Fertil. Steril. 2004. V. 82. P. 378–383.
4. Ahmadi A., Ng S.C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa // J. Exp. Zool. 1999. V. 284. P. 696–704.
5. Benchaib M., Braun V., Lomage J. et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique // Hum. Reprod. 2003. V. 18, № 5. P. 1023–1028.
6. Agarwal A., Said T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility // Hum. Reprod. 2003. V. 19, № 4. P. 331–345.
7. Wang X., Sharma R.K., Sikka S.C. et al. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility // Fertil. Steril. 2003. V. 80, № 3. P. 531–535.
8. Lopes S., Sun J.G., Jurisicova A. et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intra-

- cytoplasmic sperm injection // *Fertil Steril*. 1998. V. 69. P. 528–532.
9. Zini A., Agarwal A. (Eds.) *Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. Springer. 2011. 512 p.
10. Thomas N.S., Durkie M., Van Zyl B. et al. Parental and chromosomal origin of unbalanced *de novo* structural chromosome abnormalities in man // *Hum. Genet*. 2006. V. 119, № 4. P. 444–450.
11. Tomar D., Magenis E., Chamberlin J. et al. Preferential Paternal origin Of *de novo* Structural chromosome rearrangements // *Am. J. Hum. Genet*. 1984. V. 34. P. 115.
12. Boissonneault G. Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair // *FEBS Letters*. 2002. V. 514, № 2–3. P. 11–114.

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ В КАЗАХСТАНЕ

Д.Н. Салимбаева

Республиканская медико-генетическая консультация, Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии, г. Алматы, Казахстан

Фенилкетонурия (ФКУ) – наследственная аминокислотопатия, связанная с нарушением метаболизма фенилаланина, в результате мутационной блокады ферментов приводящая к стойкой хронической интоксикации и поражению центральной нервной системы с выраженным снижением интеллекта и неврологическим дефицитом [1, 2].

Вследствие накопления и токсического действия фенилаланина и его производных на ткани, и прежде всего клетки головного мозга, заболевание характеризуется высокой степенью слабоумия и тяжелыми психическими расстройствами, развивающимися у больных при отсутствии своевременного лечения.

Этиологическим фактором развития заболевания является наличие мутаций в гене фенилаланин-гидроксилазы *PAH*, локализуемому на длинном плече хромосомы 12 в области q22-q24 [3]. В настоящее время в гене *PAH* выявлено более 500 различных мутаций [4], частота и встречаемость которых характеризуется высокой гетерогенностью и существенными межпопуляционными различиями [1, 5, 6]. Установление частоты и спектра мутаций гена *PAH* в каждой конкретной популяции необходимо для наиболее эффективной организации медико-генетической службы и ранней диагностики и профилактики этого тяжелого наследственного заболевания [7, 8].

В табл. 1 приведены данные о распространенности ФКУ в различных популяциях мира, которая варьирует от 1 : 2 600 до 1 : 200 000 [9]. Более высокие частоты ФКУ описаны у европейцев, более низкие – у африканцев и азиатов [10]. В большинстве европейских стран частота ФКУ колеблется от 1 : 5 000 до 1 : 15 000 [11]. В азиатских странах также отмечаются различные частоты ФКУ: 1 : 2 600 в Турции, 1 : 143 000 в Японии [12], от 1 : 11 144 [13] до 1 : 16 000 [14] в различных провинциях Китая.

В Казахстане частота ФКУ, по данным неонатального скрининга, варьирует от 1 : 3 031 в регионах с преимущественно европейским населением до 1 : 65 685 в регионах с мажорной коренной казахской национальностью и в среднем составляет 1 : 23 504, что сопоставимо с частотами в других азиатских популяциях. Однако по мере увеличения охвата новорожденных неонатальным скринингом в Казахстане и повышения качества проводимого обследования частота ФКУ может быть пересмотрена.

История изучения молекулярных основ ФКУ насчитывает не одно десятилетие. В 1983 г. был впервые

клонирован ген *PAH* [34]. В 1986 г. впервые удалось локализовать точечную мутацию в гене *PAH* человека, обуславливающую классическую форму ФКУ [19].

Таблица 1

Распространенность ФКУ в различных популяциях мира

| Популяция | Частота ФКУ | Литературный источник |
|----------------------------------|--------------------------|--|
| Англия | 1 : 14 254 | Tyfield et al. [15] |
| Германия | 1 : 8 000 | Zschocke J. [16] |
| Израиль (ашкенази) | 1 : 180 000 | Thalhammer O. [17] |
| Израиль (не ашкенази) | 1 : 8 649 | Thalhammer O. [17] |
| Индия | 1 : 18 300 | Rama devi A.R. [18] |
| Ирландия | 1 : 4 500 | DiLella et al., [19], O'Neill et al., [20] |
| Италия | 1 : 17 000 | Romeo et al., 1983 [21] |
| Китай | 1 : 11 144 | Gu X.F. [13] |
| Китай | 1 : 16 000 | Liu S.R. [14] |
| Мексика | 1 : 70 000 | Nicollini et al. [22] |
| Норвегия | 1 : 13 700 | Eiken et al. [23] |
| Польша | 1 : 5 000 | Jaruselska et al. [24] |
| Португалия | 1 : 15 000 | Jaruselska et al. [24] |
| Северная Европа и Восточная Азия | 1 : 10 000 | Scriver & Kaufman [25] |
| США (европеоиды) | 1 : 8 000 | DiLella et al. [19]; |
| США (негроиды) | 1 : 50 000 | Hofman et al. [26] |
| Турция | 1 : 2 600 | Ozalp et al. [27] |
| Турция | 1 : 4 172 | Ozalp et al. [28] |
| Тунис | 1 : 7 631 | Khemir S. [29] |
| Финляндия | 1 : 100 000 | Guldberg et al. [30] |
| Финляндия Евреи ашкенази | 1 : 200 000 | Scriver & Kaufman [25] |
| Швеция | 1 : 22 000 1 : 30 000 | Svensson et al. [31] |
| Швейцария | 1 : 16 000 | DiLella et al. [19] |
| Шотландия | 1 : 4 500 | DiLella et al. [19] |
| Югославия | 1 : 7 306 | Mardesic [32] |
| Япония | 1 : 143 000 | Aoki & Wada [33] |

Согласно зарегистрированным мутациям гена *PAH* в различных популяциях мира наблюдаются отличия в распределении генетических повреждений в гене *PAH*, которые связаны с этническими и региональными особенностями [35]. Поэтому в представленном исследовании был проанализирован спектр мутаций гена *PAH* с учетом многонационального состава популяции Казахстана.

Материал и методы

Объект исследования: ДНК 79 больных ФКУ из неродственных семей.

Для выделения ДНК венозная кровь в количестве 5–10 мл собиралась в специальные вакутейнеры с ЭДТА. Выделение ДНК из периферической крови обследуемых проводилось солевым методом с последующей хлороформ-фенольной очисткой и титрованием на 3%-м агарозном геле.

На первом этапе было проведено молекулярно-генетическое исследование наиболее частых мутаций в гене *PAH* (IVS10-11G>A, R261Q, R252W, R408W, IVS12+1G>A, R158Q, P281L, IVS14+5G>T) с использованием диагностических наборов праймеров производства ООО «Центр молекулярной генетики» (Россия) (код набора PKU-8L).

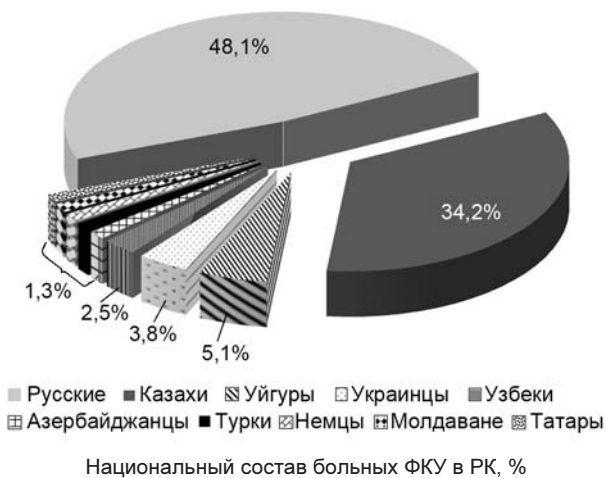
ПЦР-анализ проводили с использованием ПЦР-бокса UVC/T Biosan и амплификатора Bio-Rad. Электрофорез осуществляли с использованием вертикальной камеры V 20-CDC. Для чтения результатов молекулярно-генетических исследований использовалась система фотодокументации Gel Doc BioRad.

Вторым этапом молекулярно-генетического исследования было расширение панели мутаций гена *PAH* и использование метода прямого автоматического секвенирования гена *PAH*, который был проведен в лаборатории ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра РАМН (г. Москва).

Результаты и обсуждение

На рисунке представлен национальный состав больных ФКУ (79 человек), из которых 48,1% составили русские, 34,2% – казахи, 5,1% – уйгуры, 3,8% – украинцы, 2,5% – узбеки, азербайджанцы, турки, немцы, молдаване и татары по 1,3% соответственно. Большинство больных ФКУ в Казахстане русские и казахи, что необходимо учитывать при выборе панели мутаций для проведения молекулярно-генетического исследования гена *PAH*.

При молекулярно-генетическом исследовании гена *PAH* у больных ФКУ в Казахстане на первом этапе проводился анализ наиболее распространенных восьми мутаций гена *PAH* (IVS10-11G>A, R261Q, R252W, R408W, IVS12+1G>A, R158Q, P281L, IVS14+5G>T).



Анализ спектра наиболее распространенных восьми мутаций гена *PAH* у 79 пациентов с ФКУ по-

казал, что мутация R408W имеет место в 36,7% случаев. Мутации R261Q – в 6,3%, P281L – в 4,4%, IVS12+1G>A и IVS4+5G – составляют 1,9% каждая, IVS10-11G>A – в 1,3%, R252W и R158Q – по 0,6% каждая. В 46,2% не обнаружено мутаций, которые входили бы в панель наиболее распространенных восьми мутаций гена *PAH* (табл. 2).

Таблица 2
Спектр наиболее распространенных восьми мутаций гена *PAH* у больных ФКУ всех национальностей в Казахстане

| Мутация | Количество аллелей | Частота, % |
|------------------------|--------------------|------------|
| R408W | 58 | 36,7 |
| R261Q | 10 | 6,3 |
| P281L | 7 | 4,4 |
| IVS12+1G>A | 3 | 1,9 |
| IVS4+5G | 3 | 1,9 |
| IVS10-11G>A | 2 | 1,3 |
| R252W | 1 | 0,6 |
| R158Q | 1 | 0,6 |
| Мутации не установлены | 73 | 46,2 |

В табл. 3 представлен спектр наиболее распространенных восьми мутаций гена *PAH* у больных ФКУ, представленные данные выявили этнические особенности распределения мутаций гена *PAH* у больных в Казахстане. Так, мутация R408W была наиболее распространенной у больных русской национальности (51,3%) и украинцев (50,0%), а у казахов (16,6%) и уйгуров (25,0%) эта мутация встречалась со статистически значимо более низкой частотой ($\chi^2 = 16,273; p < 0,005$).

Мутация R261Q выявлена с большей частотой у уйгуров (25,0%), чем у русских (9,2%), у казахов в представленной выборке мутация не наблюдалась. Мутации IVS4+5G, IVS10-11G>A и R158Q диагностированы только у больных казахов (5,5; 1,9 и 1,9% соответственно). Мутация R252W обнаружена у больного ФКУ молдаванина (50%), у представителей других национальностей данная мутация не встречалась.

При использовании панели наиболее распространенных восьми мутаций гена *PAH* у представителей всех национальностей не выявлены мутации: у казахов в 63,0%, у русских в 35,5%, у азербайджанцев – в 100%, у уйгуров, узбеков, турков, немцев, татар – в 50% в каждом случае, в 33,3% у украинцев. Поэтому следующим этапом исследования является расширения панели и поиск новых мутаций с учетом этнических особенностей больных ФКУ в Казахстане.

Стандартные современные методики позволяют обнаружить последовательность не более чем из 300–400 нуклеотидов, поэтому прямое определение нуклеотидной последовательности информативно только в тех случаях, когда большинство мутаций находятся на одном небольшом участке. Метод прямого автоматического секвенирования позволяет выявить новые мутации и редко дает ложноотрицательные результаты.

Была расширена панель мутаций гена *PAH* и дополнительно обследованы 19 пациентов с ФКУ казахской национальности и 2 пациента с ФКУ русской национальности; использовался метод прямого автоматического секвенирования (табл. 4). Обследование представителей других национальностей планируется продолжить в ходе дальнейших исследований.

Таблица 3

Спектр наиболее распространенных мутаций гена *PAH* у больных ФКУ разных национальностей в Казахстане

| Мутация | Национальность | | | | | | | | | | |
|------------------------|---------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|
| | Все пациенты (79 человек) | Казахи (27 человек) | Русские (38 человек) | Уйгуры (4 человека) | Украинцы (3 человека) | Узбеки (2 человека) | Азербайджанцы (1 человек) | Турки (1 человек) | Немцы (1 человек) | Молдаване (1 человек) | Татары (1 человек) |
| R408W | 36,7% | 16,6% | 51,3% | 25% | 50% | 50% | – | – | 50% | 50% | 50% |
| R261Q | 6,3% | – | 9,2% | 25% | 16,7% | – | – | – | – | – | – |
| P281L | 4,4% | 9,2% | 1,3% | – | – | – | – | 50% | – | – | – |
| IVS12+1G>A | 1,9% | 1,9% | 2,6% | – | – | – | – | – | – | – | – |
| IVS4+5G | 1,9% | 5,5% | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| IVS10-11G>A | 1,3% | 1,9% | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| R252W | 0,6% | – | – | – | – | – | – | – | – | 50% | – |
| R158Q | 0,6% | 1,9% | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Мутации не установлены | 46,2% | 63,0% | 35,5% | 50% | 33,3% | 50% | 100% | 50% | 50% | – | 50% |

Таблица 4

Спектр мутаций гена *PAH* у больных ФКУ, выявленных методом ПЦР и методом прямого автоматического секвенирования

| Мутация | Национальность | | |
|------------------------|---------------------------|---------------------|----------------------|
| | Все пациенты (79 человек) | Казахи (27 человек) | Русские (38 человек) |
| R408W | 36,7% | 16,6% | 51,3% |
| R261Q | 6,3% | – | 9,2% |
| P281L | 4,4% | 9,2% | 1,3% |
| IVS12+1G>A | 1,9% | 1,9% | 2,6% |
| IVS4+5G | 1,9% | 5,5% | – |
| IVS10-11G>A | 1,3% | 1,9% | – |
| R252W | 0,6% | – | – |
| R158Q | 0,6% | 1,9% | – |
| R243Q | 9,5% | 27,8% | – |
| W187X | 0,6% | 1,9% | – |
| Y387N | 0,6% | 1,9% | – |
| IVS10nt546 | 1,9% | – | 3,9% |
| IVS12nt1 | 0,6% | 1,9% | – |
| IVS2+5G>C | 0,6% | – | 1,3% |
| IVS10-14C>G | 0,6% | 1,9% | – |
| Мутации не установлены | 31,6% | 27,8% | 30,3% |

Анализ полученных данных показал, что у больных ФКУ расширение панели мутаций гена *PAH* и метод автоматического прямого секвенирования позволили обнаружить дополнительные мутации: R243Q, W187X, Y387N, IVS10nt546, IVS12nt1, IVS2+5G>C и IVS10-14C>G.

У казахов, больных ФКУ, были выявлены следующие дополнительные мутации: R243Q (27,8%), W187X, Y387N, IVS12nt1 и IVS10-14G>A (по 1,9%). Частота неустановленных мутаций гена *PAH* после расширения панели мутаций и прямого автоматического секвенирования гена *PAH* снизилась с 63,0 до 27,8%. У русских, больных ФКУ, были выявлены следующие дополнительные мутации: IVS10nt546 (3,9%) и IVS2+5G>C (1,3%).

Анализ спектра мутаций гена *PAH* у больных ФКУ показал, что у казахов наиболее распространенной мутацией является R243Q (27,8%), а также только у казахов встречались мутации IVS4+5G>T (5,5%) и IVS10-11G>A (1,9%). У представителей русской национальности основной мутацией, определяющей ФКУ, явилась R408W (51,3%), также с высокой частотой (9,2%) встречалась мутация R261Q. Только у русских были диагностированы мутации IVS10nt546 с частотой 3,9% и IVS2+5G с частотой 1,3%, которые не выявлены у казахов. Для представителей других национальностей (уйгуры,

узбеки, украинцы, азербайджанцы, турки, немцы, татары) (14 человек) для установления спектра неизвестных мутаций также необходимо проведение прямого автоматического секвенирования гена *PAH*.

Таким образом, обнаружены этнические особенности в спектре мутаций гена *PAH* у больных ФКУ, проживающих в Казахстане. Выявленные особенности необходимо учитывать при проведении молекулярно-генетической диагностики больных ФКУ и членов их семей, включая прямую пренатальную молекулярно-генетическую диагностику ФКУ.

Литература

- Blau N., van Spronsen F.J., Levy H.L. Phenylketonuria // *Lancet*. 2010. № 376. P. 1417–1427.
- Лечебное питание при наследственных нарушениях обмена (E70.0–E74.2) // Клиническая диетология детского возраста / под ред. Т.Э. Боровик, К.С. Ладодо. М.: МИА, 2008. С. 330–383.
- Lidsky A.S. et al. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1985. V. 82. P. 6221–6225.
- Johannes Zschocke et al. Clinical utility gene card for: Phenylketonuria // *European Journal of Human Genetics*. 2012. 20. doi:10.1038/ejhg.2011.172.
- Takarada Y. et al. Rapid single-base mismatch detection in genotyping for phenylketonuria // *Molecular Biotechnology*. 2003. V. 24. P. 233–242.
- Аничкина А.А. и др. Анализ наиболее часто встречающихся мутаций в гене фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией // *Мед. генетика*. 2003. Т. 2, № 4. С. 175–181.
- Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. СПб., 1997.
- ДНК-диагностика и профилактика наследственной патологии в Республике Башкортостан / под ред. Э.К. Хуснутдиновой. Уфа: Китап, 2005. 204 с.
- Bookshelf ID: NBK1504PMID: 20301677 Phenylalanine Hydroxylase Deficiency Synonym: PAH Deficiency. Includes: Hyperphenylalaninemia (HPA), Phenylketonuria (PKU), Variant PKU John J Mitchell, MD.
- Gu X.P. Newborn Disease Screening. Scientific and Technological Literature Publishing House. 2003. 1215 p.
- Mathias D., Bickel H. Follow-up study of 16 years neonatal screening errors of metabolism in West Germany // *Eur. J. Pediatr.* 1986. V. 45. P. 310–312.
- Johannes Zschocke et al. Clinical utility gene card for: Phenylketonuria // *European Journal of Human Genetics*. 2012. 20. doi:10.1038/ejhg.2011.172.
- Gu X.F., Wang Z.G. Screening for phenylketonuria and congenital hypothyroidism in 5.8 million neonates in China // *Chin. Prev. Med.* V. 38. P. 99–102.

14. Liu S.R. et al. Newborn screening for phenylketonuria in eleven districts // *Chi. Med. J.* 1986. V. 99 (2). P. 113–118.
15. Tyfield L.A. et al. Sequence variation at the phenylalanine hydroxylase gene in the British Isles // *Am J. Hum. Genet.* 1997. V. 60. P. 388–396.
16. Zschocke J., Hoffmann G. Phenylketonuria mutations in Europe // *Hum. Mutation.* 2003. V. 21. P. 345–356.
17. Thalhammer O., Pollak A. Neugeborenen. Screening auf angeborene Stoffwechsellanomalien // *MTA.* 1986. V. № 8. P. 593–596.
18. Rama Devi A.R., Naushad S. Newborn screening in India // *Indian J. Pediatr.* 2004. V. 71 (2). P. 157–160.
19. DiLella A. et al. Tight linkage between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in phenylketonuria. // *Nature.* 1986. V. 322 (6082). P. 799–803.
20. O'Neill C. et al. Molecular analysis PKU in Ireland, 1994.
21. Romeo G. et al. Incidence of classic PKU in Italy estimated from consanguineous marriages and from neonatal screening // *Clin. Genet.* 1983. V. 24. P. 339–345.
22. Nicollini H. et al. Molecular analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in Mexican phenylketonuric patients // *Arch. Med. Res.* 1995. Vol. 26, № 1. P. 53–60.
23. Eiken E. G. et al. Relative frequency, heterogeneity and geographic clustering of PKU mutations in Norway // *Europ. J. Hum. Genet.* 1996. V. 4. P. 205–213.
24. Jaruselska J. et al. The codon 408 mutation associated with haplotype 2 is predominant in Polish families with phenylketonuria // *Hum. Genet.* 1991. V. 86, № 3. P. 247–250.
25. Scriver C. et al. The hyperphenylalaninemias. In the metabolic and Molecular Bases of Inherited disease, 7 th ed. New York: McGraw-Hill. 1995. P. 1015–1075.
26. Hofman K.J. et al. Phenylketonuria in U.S. blacks: molecular analysis of the phenylalanine hydroxylase gene // *Am. J. Hum. Genet.* 1991. V. 48 (4). P. 791–798.
27. Ozalp I. et al. Incidence of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in a sample of the Turkish newborn population // *J. Inherit. Metab. Disease.* 1986. V. 9, № 2. P. 237–239.
28. Ozalp I. et al. Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future // *Turk. J. Pediatr.* 2001. V. 43 (2). P. 237–239.
29. Khemir S. et al. Phenylketonuria is still a major cause of mental retardation in Tunisia despite the possibility of treatment // *Clin. Neurol. Neurosurg.* 113. P. 727–730.
30. Guldberg P. et al. Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterization of mutations in Finland // *J. Med. Genet.* 1995. V. 32. P. 976–978.
31. Svensson E. et al. Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase locus and their relation to phenotype in Swedish phenylketonuria families // *Hum. Genet.* 1991. V. 87, № 1. P. 11–17.
32. Mardesic D. et al. Screening for phenylketonuria in Yugoslavia (SR Croatia) 1979–1984 // *J. Inherit. Metab. Disease.* 1986. V. 9. P. 234–236.
33. Aoki K., Wada Y. Outcome of the patients detected by newborn screening in Japan // *Acta Pediatr.* 1988. V. 30. P. 429–434.
34. Woo S.L. et al. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria // *Nature.* V. 306. P. 151–155.
35. Zhang M. et al. Mutations and their frequencies in exon 7 of phenylalanine hydroxylase gene of phenylketonuria in southern Chinese // *Chin. J. Med. Genet.* V. 12. P. 324–326.

НЕОНАТАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ НА НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ НА ТЕРРИТОРИИ АЛТАЙСКОГО КРАЯ

О.В. Цыпченко¹, А.М. Никонов¹, Н.И. Таскина¹, М.Р. Сапкина¹, Т.А. Афонина¹, А.Н. Давыдова¹, Т.М. Колесникова¹, В.Н. Сероклинов², А.А. Шипилов¹

¹ *Диагностический центр Алтайского края, медико-генетическая консультация, г. Барнаул*

² *Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул*

Наследственные болезни обмена веществ (НБОВ) имеют особенность не проявляться сразу же при рождении. Клинические признаки появляются спустя некоторое время: остановка в физическом и нервно-психическом развитии, судороги и др. Как правило, при НБОВ наблюдается необратимое поражение головного мозга. На сегодняшний день для некоторых НБОВ разработано лечение, однако его эффективность зависит от того, насколько рано оно начато. Многолетняя мировая практика показала, что наиболее правильным решением в этом направлении является ранняя диагностика НБОВ – обследование новорожденных сразу после рождения [1–3].

В Алтайском крае массовое обследование новорожденных на наследственные болезни началось со второй половины 1992 г. с фенилкетонурии, а в 1994 г. был подключен врожденный гипотиреоз. С 2006 г. в рамках национального проекта «Здоровье» внедрены скрининговые программы на адреногенитальный синдром, муковисцидоз и галактоземию [4].

Внедрению неонатального скрининга предшествовала организационно-методическая работа с лечебно-профилактическими учреждениями края: определение нормативной базы, закрепление ответственных на всех уровнях, налаживание курьерской службы доставки. Отработаны алгоритмы

обследования и диспансерного наблюдения для всех пяти скринируемых заболеваний.

В табл. 1 представлены данные по массовому обследованию новорожденных за период 1993–2013 гг. и частота выявленных наследственных болезней на территории Алтайского края. Частота фенилкетонурии, врожденного гипотиреоза и адреногенитального синдрома не отличается от средней частоты этих заболеваний в Российской Федерации. В то же время частота муковисцидоза и галактоземии в Алтайском крае почти в 2 раза выше, что требует специального анализа.

Фенилкетонурия (ФКУ) – группа аутосомно-рецессивных заболеваний, характеризующихся нарушением обмена незаменимой аминокислоты фенилаланина, поступающего в организм человека с белковой пищей. Развернутая клиническая картина заболевания включает умственную отсталость, нарушение поведения, дефект пигментации, судорожный синдром и дерматиты. За все годы исследования выявлено 83 больных фенилкетонурией, 68 пациентов получают специальное лечение, включающее аминокислотные смеси и малобелковые продукты питания.

Проведено молекулярно-генетическое обследование 54 больных фенилкетонурией на шесть наиболее частых мутаций гена *PAH*: R408W, R261Q, IVS12+1G>A, R158Q, P281L и IVS4+5G>T (табл. 2).

Таблица 1

Результаты неонатального скрининга и частота наследственных болезней в Алтайском крае за период 1993–2013 гг.

| Наследственное заболевание обмена веществ | Обследовано новорожденных | Выявлено больных | Частота заболевания в Алтайском крае | Частота заболевания в РФ [5] |
|---|---------------------------|------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| Фенилкетонурия | 509 133 | 83 | 1 : 6 134 | 1 : 7 697 |
| Врожденный гипотиреоз | 393 886 | 101 | 1 : 3 900 | 1 : 4 132 |
| Адреногенитальный синдром | 215 055 | 28 | 1 : 7 681 | 1 : 8 662 |
| Муковисцидоз | 214 389 | 37 | 1 : 5 794 | 1 : 11 585 |
| Галактоземия | 191 830 | 10 | 1 : 19 183 | 1 : 32 692 |

Таблица 2

Относительные частоты мутаций R408W, R261Q, IVS12+1G>A, R158Q, P281L, IVS4+5G>T в гене PAH, выявленные в Алтайском крае (54 человека)

| Мутация | Число мутаций/число хромосом | Относительная частота, % |
|----------------------|------------------------------|--------------------------|
| R408W | 70/108 | 64,8 |
| R261Q | 6/108 | 5,6 |
| IVS12+1G>A | 6/108 | 5,6 |
| IVS4+5G>T | 4/108 | 3,7 |
| R158Q | 4/108 | 3,7 |
| P281L | 4/108 | 3,7 |
| Неидентифицированные | | 13,0 |

Мажорная мутация R408W была идентифицирована в 64,8%. Вторыми по частоте встречаемости в исследуемой выборке (5,6%) были мутации R261Q и IVS12+1G>A. Частоты мутаций P281L, IVS4+5G>T и R158Q составили по 3,7%. Полученные данные частот мутаций гена PAH совпадают с данными других исследований [1].

Врожденный гипотиреоз (ВГ) – заболевание щитовидной железы, при котором наблюдается снижение ее функции вплоть до полного выпадения. Неонатальный скрининг теоретически дает возможность ранней диагностики ВГ у 100% больных, в том числе в доклинической стадии у 90% больных.

Адреногенитальный синдром (АГС, врожденная гиперплазия коры надпочечников) – группа заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования, развитие которых связано с нарушением секреции кортикостероидов вследствие врожденного дефекта ферментов, ответственных за биосинтез этих гормонов. Массовое обследование новорожденных на АГС позволило снизить смертность мальчиков при этом заболевании [6].

Все дети с врожденным гипотиреозом и адреногенитальным синдромом передаются под наблюдение и лечение эндокринологу.

Муковисцидоз (МВ) (кистозный фиброз) – частое моногенное аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся поражением экзокринных желез и жизненно важных органов и систем и имеющее обычно тяжелое течение и прогноз. Подтверждающая диагностика муковисцидоза включала обязательно трехкратный потовый тест и определение наиболее частых мутаций.

Результаты молекулярно-генетического обследования 31 больного муковисцидозом на наиболее частые мутации гена CFTR: delF508, del21kb, W1282X, R334W, del2143T, 2184insA и 394delTT представлены в табл. 3. Преобладающая по частоте мутация delF508 была идентифицирована в 64,5%. Второй по частоте встречаемости в исследуемой выборке (6,5%) была мутация del21kb. Мутация W1282X имела частоту 4,8%, а частоты мутаций

R334W, del2143T, 2184insA и 394delTT составили по 3,7%. Данные частот мутаций гена CFTR совпадают с данными других исследований [1, 7].

Таблица 3

Относительные частоты мутаций в гене CFTR у больных муковисцидозом в Алтайском крае (31 человек)

| Мутация | Число мутаций/число хромосом | Относительная частота, % |
|----------------------|------------------------------|--------------------------|
| delF508 | 40/62 | 64,5 |
| del21kb | 4/62 | 6,5 |
| W1282X | 3/62 | 4,8 |
| R334W | 1/62 | 1,6 |
| del2143T | 1/62 | 1,6 |
| 2184insA | 1/62 | 1,6 |
| 394delTT | 1/62 | 1,6 |
| Неидентифицированные | | 17,7 |

Галактоземия – группа наследственных заболеваний нарушения метаболизма, характеризующихся неспособностью метаболизировать галактозу. По собственным данным, на территории Алтайского края это заболевание встречается чаще, чем в целом в Российской Федерации. Для подтверждения этого факта будет проведено молекулярно-генетическое обследование пациентов с диагнозом «галактоземия».

Таким образом, как видно из представленных данных, неонатальный скрининг в Алтайском крае выполняется соответственно методологическим требованиям. Пациенты с диагностированными наследственными болезнями обмена веществ получают соответствующее наблюдение и лечение.

Литература

1. Матулевич С.А. Массовый скрининг новорожденных на наследственные болезни обмена как часть системы медико-генетической помощи населению: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2009. 44 с.
2. Мурзабаева С.Ш. Оптимизация медико-генетической службы Республики Башкортостан: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2010. 44 с.
3. Levy H.L., Albers S. Genetic Screening of Newborns // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2000. V. 1. P. 139–177.
4. О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания. Приказ МЗ и СР РФ от 22 марта 2006 г. № 185.
5. Новиков П.В. Наследственная патология в структуре болезней детского возраста и организация медико-генетической помощи детям в Российской Федерации // Мед. генетика. 2008. Т. 7, № 12 (78). С. 3–7.
6. Ипатова О.Е. Неонатальный скрининг на адреногенитальный синдром в Архангельской области: клинико-лабораторная интерпретация результатов: автореф. дис. ... канд. мед. наук, 2010. 23 с.
7. Муковисцидоз: методические рекомендации / под ред. Н.И. Капранова. М., 2011. 92 с.

ТЕЗИСЫ

КЛИНИКО-МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ЭМЕРИ–ДРЕЙФУСА

Т.А. Адян¹, Г.Е. Руденская¹, Е.Л. Дадали¹, О.П. Рыжкова¹, О.С. Грознова², Д.В. Володавец², А.В. Поляков¹¹ Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва² МНИИ педиатрии и детской хирургии Минздравсоцразвития РФ, г. Москва

Введение

Мышечные дистрофии Эмери–Дрейфуса (МД ЭД) – генетически гетерогенная группа МД с началом в детском или подростковом возрасте, характеризующихся сочетанием скелетной миопатии, ранних суставных контрактур и кардиомиопатии (КМП) с нарушениями ритма и внутрисердечной проводимости, вызывающими тяжелые, часто фатальные осложнения. Своевременное выявление МД ЭД с ДНК-верификацией важно не только для медико-генетического консультирования отягощенных семей, но особенно для профилактики фатальных кардиологических осложнений у больных. Однако известно, что более чем у 50% пациентов с типичной клинической картиной МД ЭД не удается определить мутации в известных генах, что существенно затрудняет процесс медико-генетического консультирования.

Цель работы – провести поиск мутаций генов *EMD*, *LMNA* и *FHL1*, обуславливающих основные формы МД ЭД: X-сцепленный (X-сц.) МД ЭД 1, аутосомно-доминантный (АД) МД ЭД 2 и X-сц. МД ЭД 6; также провести поиск наиболее частых мутаций генов *CAPN3*, *FKRP*, *SGCA*, *ANO5*, *DYSF*, обуславливающих наиболее частые формы аутосомно-рецессивных (АР) пояснично-конечностных мышечных дистрофий (ПКМД) 2А, 2I, 2D, 2L и 2В соответственно, и поиск частых делеций гена *DMD*, ответственного за МД Дюшенна–Беккера. Провести сравнительный анализ основных фенотипических признаков различных генетических вариантов МД ЭД.

Материал и методы

Образцы ДНК 104 неродственных пробандов (76 мужчин, 28 женщин) с клиническим диагнозом МД ЭД.

Генеалогический анализ, неврологическое и кардиологическое обследование; определение креатинфосфокиназы (КФК); ЭМГ; молекулярно-генетические методы: выделение ДНК, ПЦР, мультиплексное проб-специфичное лигирование, прямое автоматическое секвенирование.

Результаты

При проведении анализа вышеуказанных генов мутации выявлены у 45 пробандов, что составило 43,3%: 16 различных мутаций *EMD* у 17 больных (16,3%); 17 мутаций *LMNA* у 22 пробандов (21,2%)

(мутации с.745С>Т и с.1357С>Т встретились по 3 раза, мутация с.781_783delAAG – 2 раза); 1 мутация *FHL1* (0,96%); 3 мутации *CAPN3* у 4 больных (3,8%) (мутация с.550delA у двоих в гомозиготном состоянии и у двоих в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутациями с.717delT и с.2305С>Т); мутация с.2272С>Т гена *ANO5* в гетерозиготном состоянии у 1 пациента (0,96%). В генах *FKRP*, *SGCA*, *DYSF* и *DMD* мутаций не выявлено. Таким образом, показано, что к развитию клинической картины, характерной для МД ЭД, могут приводить мутации не только в генах, описанных для МД ЭД, но и мутации в генах других форм мышечных дистрофий, что свидетельствует о наличии фенкопий для МД ЭД и частично объясняет высокий процент не верифицированных ДНК-анализом случаев МД ЭД (более 50%, по литературным данным).

Клиническая картина трех типов МД ЭД (1, 2, 6) сходна. Возраст пробандов в группе 40 семей составил 5–45 лет, но преобладали лица детского и молодого возраста. Выявлено клиническое межсемейное, а в семейных случаях и внутрисемейное разнообразие, особенно при МД ЭД 2. В части случаев вначале стала заметна миопатия, в других первым симптомом были контрактуры. У многих при начале ходьбы в срок отмечалась ходьба на носочках (из-за контрактуры голеностопных суставов), но, исключив спастичность, этому нередко не придавали значения. Некоторые больные наблюдались по поводу КМП, а контрактуры и (или) миопатия были более поздней, иногда случайной находкой. Активность КФК колебалась от нормы до 2 000 Ед/л, чаще не превышая 1 000 Ед/л. Тяжесть и соотношение миопатии и КМП варьировали, но чаще скелетная миопатия бывала умеренной и даже мягкой, а клинический прогноз определялся поражением сердца. В некоторых семьях имелись случаи внезапной смерти в молодом возрасте, причина которой ранее не была выяснена. У части больных, особенно у детей, КМП была субклинической, но выявлялась при обследовании, которое обязательно должно включать суточный холтеровский мониторинг сердечного ритма.

При анализе клинической картины у пациентов с мутациями в генах ПКМД (5 пробандов) было отмечено, что лишь один имел классическую триаду признаков МД ЭД, но и у него активность КФК была атипично высокой; у остальных наряду с симптомами МД ЭД имелись важные отличия, особенно отсутст-

вие КМП или ее неаритмогенный характер. Ни в одном случае не было ригидности позвоночника. Трое больных имели тяжелую миопатию. Активность КФК была типичной для МД ЭД у 2 больных, у 3 – более высокой.

Таким образом, результаты клинико-молекулярно-генетического анализа показывают необходимость подробного сбора анамнеза у пробандов с клиническими признаками МД ЭД и проведения ДНК-диагностики, не ограниченной лишь генами МД ЭД.

ПОПУЛЯЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПРОТЯЖЕННЫХ ДЕЛЕЦИЙ ПРИ НЕСИНДРОМАЛЬНОЙ ТУГОУХОСТИ

Е.А. Близнец¹, О.Н. Макиенко¹, Е.Г. Окунева¹, Т.Г. Маркова², Х.Д. Дибирова¹,
О.П. Балановский¹, А.В. Поляков¹

¹ Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва

² Российский научно-практический центр аудиологии и слухопротезирования ФМБА, г. Москва

Наследственная тугоухость с аутосомно-рецессивным типом наследования генетического типа DFNB1, обусловленная мутациями в гене *GJB2*, является главной причиной врожденного несиндромального нарушения слуха в большинстве развитых стран мира, в том числе в России.

Среди дефектов гена *GJB2* преобладают внутригенные точечные мутации. Из более 300 мутаций выделяются несколько наиболее часто встречающихся мутаций. Наряду с внутригенными мутациями в отдельных популяциях (например, Испании, Великобритании, Франции, США, Бразилии) со значительной частотой встречаются и протяженные делеции в локусе DFNB1, повреждающие *cis*-регуляторную область гена *GJB2*.

Среди четырех известных протяженных делеций только одна затрагивает непосредственно последовательность гена *GJB2* и описана в един-

ственной семье. В данном сообщении описана новая протяженная делеция последовательности генов *GJB2* и *GJB6* размером ~101 тыс. п.н. (NC_000013.10: g.20,757,021_20,858,394del). Показано ингушское происхождение данной мутации, выявлена значительная частота гетерозиготного носительства новой делеции среди ингушей и чеченцев.

У российских пациентов с тугоухостью делеция ~101 тыс. п.н. встречается чаще других известных протяженных делеций в локусе DFNB1, и данный дефект не детектируется применяемыми сегодня методами поиска мутаций при наследственной тугоухости. Поэтому прицельное тестирование пациентов на наличие новой делеции является очень важным этапом молекулярного исследования для медико-генетического консультирования семей с наследственным нарушением слуха.

ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ ОДНОГО АЛЛЕЛЯ КАК МЕХАНИЗМ СНИЖЕНИЯ ТОЧНОСТИ ДНК-ДИАГНОСТИКИ СЕРДЕЧНЫХ КАНАЛОПАТИЙ

А.А. Букаева¹, О.В. Глазова¹, С. Сабер², Е.В. Заклязьминская¹

¹ Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского, г. Москва

² Первый Московский государственный медицинский университет им. Сеченова, г. Москва

Введение

В настоящее время золотым стандартом ДНК-диагностики наследственных заболеваний является метод секвенирования по Сенгеру. Однако данная методика имеет ряд ограничений, которые могут снижать эффективность диагностики. Известным механизмом искажения данных секвенирования является избирательная амплификация одного аллеля (потеря аллеля, allelic dropout), опосредованная наличием однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms, SNP) в 3'-областях олигопраймеров для ПЦР. Учет и контроль риска возникновения потери аллеля представляются важными аспектами контроля качества в любой диагностической лаборатории.

Материал и методы

Нуклеотидные последовательности 63 пар олигопраймеров, применяемых для поиска мутаций в генах *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNH2*, *KCNJ2*, *SCN5A*, ответственных за развитие заболеваний из группы сердечных каналопатий, были проанализи-

рованы на наличие полиморфных сайтов на расстоянии до 7 пар оснований от 3'-конца. Для контроля качества были взяты образцы ДНК 15 членов иранской семьи с синдромом Бругада. Контрольную группу составили образцы ДНК 100 клинически здоровых доноров той же этнической принадлежности.

Результаты и обсуждение

По итогам анализа 19 из 63 пар олигопраймеров, покрывающих 30,2% области, кодируемой указанными генами, были расценены как потенциально опосредующие некорректные результаты диагностики. Для секвенирования 19 фрагментов, фланкируемых данными праймерами, были подобраны новые олигопраймеры, не несущие полиморфных сайтов как минимум в семи положениях от 3'-конца, и проведена повторная оптимизация протоколов ДНК-диагностики.

В ходе работы по контролю качества ДНК-диагностики сердечных каналопатий был выявлен случай ложной гомозиготности по мутантному локусу в гене *SCN5A* в одной семье. В образце ДНК пробанда с синдромом Бругада был проведен поиск

мутаций путем секвенирования по Сенгеру кодирующей последовательности гена *SCN5A*. В результате в экзоне 26 была выявлена ранее не описанная мутация p.P1506S в гетерозиготном состоянии. Анализ сегрегации данной замены среди родственников пробанда показал ее наличие в гомозиготном состоянии у его сына. При этом у супруги пробанда данной мутации не выявлено. Для проверки результатов пробанду и его сыну было выполнено высокопроизводительное полупроводниковое секвенирование интересующего локуса на платформе Ion Torrent, показавшее гетерозиготный характер мутации у сына. В ходе анализа последовательностей праймеров, применявшихся для секвенирования по Сенгеру кодирующей последовательности экзона 26, был выявлен однонуклеотидный полиморфизм rs41315501, лежащий в зоне отжига одного из праймеров. Методом ПЦР-ПДРФ было установлено наличие замены rs41315501 в гетерозиготном состоя-

нии у супруги и сына пробанда. Затем было выполнено секвенирование последовательности экзона 26 *SCN5A* методом Сенгера с применением альтернативной пары олигопраймеров. Его результаты подтвердили гетерозиготный характер мутации p.P1506S у сына пробанда.

Частота полиморфизма rs41315501 в контрольной выборке иранских образцов ДНК была оценена методом ПЦР-ПДРФ и составила 23%. Большим с установленным носительством мутантного аллеля проведено ресеквенирование с альтернативной пары праймеров.

Представленные результаты демонстрируют существенность избирательной амплификации одного аллеля как фактора снижения точности ДНК-диагностики, а также показывают целесообразность применения технологий высокопроизводительного секвенирования как метода валидации результатов, получаемых при секвенировании по Сенгеру.

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ХРОМОСОМНЫХ И МОНОГЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ

С.В. Воронин, В.Г. Воронина

Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток
Краевой клинический центр специализированных видов медицинской помощи,
краевая медико-генетическая консультация, г. Владивосток

Пренатальная диагностика является эффективным методом профилактики наследственной патологии. При правильной организации скрининга беременных она позволяет выявлять хромосомные и моногенные болезни в ранние сроки беременности.

Отделение пренатальной диагностики открыто в краевой медико-генетической консультации (КМГК) в 1998 г., когда начала выполняться инвазивная пренатальная диагностика (ИПД) (биопсия ворсин хориона, плацентоцентез, кордоцентез). В это время были подготовлены кадры, приобретено оборудование. У плодов стали определять резус-фактор, биохимические показатели, микробный статус, клинический анализ крови. С 2000 г. проводятся лечебные манипуляции у плода: лечебный амниоцентез при мало- и многоводии, пункции лоханки почки при гидронефрозе и мегацистике, кисте яичника плода, лечение при гидротораксе и гидроперикарде. С 1998 г. показаниями для ИПД были возраст и изменения сывороточных маркеров. Важнейшую роль в выявлении синдрома Дауна играли ультразвуковые маркеры хромосомной аномалии (УЗМ ХА), толщина воротникового пространства и носовая кость, а также УЗМ ХА второго триместра и ВПР. Для формирования группы риска при проведении ИПД также использовали регистр КМГК (семьи, имеющие детей с хромосомной патологией, носители сбалансированных транслокаций). Из-за отсутствия бюджетного финансирования в КМГК исследования сывороточных маркеров проводили диагностические лаборатории многих ЛПУ, включая коммерческие, что привело к большому числу как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов и снижало эффективность инвазивной пренатальной диагностики. Так, за период 2010–2013 гг. было выполнено 1 797 процедур. Хромосомная патология выявлена в 77 случаях (4,28%).

В структуре хромосомной патологии, выявленной после ИПД (таблица), трисомия хромосомы 21 составила 38,96%; трисомия по хромосоме 18–15,58% (высокий уровень). Суммарно трисомии по хромосомам 21, 18 и 13 составляют 58,44%. Высокой остается частота структурных перестроек – 23,37%. При этом в большинстве случаев структурные перестройки были *de novo*.

Структура хромосомной патологии, выявленной при ИПД в КМГК (2010–2013 гг.)

| Нозология | 2010 г. | 2011 г. | 2012 г. | 2013 г. | Суммарно, абс. (%) |
|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------------------------|
| 47+13 | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 (3,90) |
| 47+18 | | 3 | 6 | 3 | 12 (5,58) |
| 47+21 | 3 | 7 | 13 | 7 | 30 (8,96) |
| 45,X | 4 | 1 | 1 | 1 | 7 (9,09) |
| 47,XXX | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 (1,30) |
| 47,XXY | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (2,60) |
| 47,XYU | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 (1,30) |
| 48,XXXU | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 (1,30) |
| :69,XXU/69,XXX | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 (2,60) |
| Структурные перестройки | 5 | 2 | 5 | 6 | 18 (23,37) |
| Суммарно | 15 | 14 | 29 | 19 | 77 (100) |
| Число ИПД | 447 | 471 | 435 | 444 | 1 797 (4,28) 1 : 23,33 |

ИПД проводилась для семей, имеющих детей с НБО, для которых возможна молекулярная диагностика (по договору с Центром молекулярной генетики, г. Москва), в их числе на фенилкетонурию, муковисцидоз, спинальную амиотрофию, поликистоз почек рецессивный и др. Если плод оказывался носителем двух мутантных аллелей, семьи могли прервать беременность по медицинским показаниям.

В других случаях (гетерозиготное носительство или гомозиготы по двум аллелям нормального типа) беременность пролонгировали. Одна семья выполняла диагностику 3 раза, пока не забеременела плодом без мутантных генов.

При выявлении хромосомной или моногенной патологии беременные направлялись на перинатальный консилиум для решения вопроса о дальнейшем пролонгировании беременности.

В 2012 г. вышли новые нормативные документы: приказ МЗ РФ от 01.11.2012 г. № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)» и приказ МЗ РФ от 15.11.2012 г. № 917н «Об утверждении Порядка оказания помощи больным с врожденными и (или) наследственными заболеваниями». На основании этих приказов в Приморском крае с декабря 2013 г. стал выполняться пилотный проект по пренатальной диагностике нарушений развития ребенка. Для организации скрининга в новых условиях была проведена большая подготовительная работа: проведены семинары с врачами акушерами-гинекологами, изданы информационные материалы. Согласно проекту введен новый алгоритм обследования беременных в

первом триместре: все УЗИ в первом триместре проводятся в девяти окружных пренатальных центрах и КМГК. В день УЗ-исследования производится забор крови на PAPP-A и ХГЧ, заполняется анкета. Все исследования направляются в КМГК, где выполняется биохимический скрининг и производится компьютерный расчет риска хромосомных аномалий. Все беременные с высоким риском ХА (1 : 100 и выше) направляются на инвазивную пренатальную диагностику. Все это позволит уменьшить число инвазивных вмешательств и увеличить процент выявляемой хромосомной патологии (28% плодов с ХА было выявлено при ИПД, проведенной у беременных в рамках пилотного проекта).

Таким образом, в Приморском крае в краевой медико-генетической консультации краевого клинического центра специализированных видов медицинской помощи создано и стабильно работает отделение пренатальной диагностики, которое позволяет осуществлять как высокоэффективное выявление плодов с хромосомной патологией на ранних этапах беременности, так и оказывать необходимую медицинскую помощь при некоторых патологических состояниях у плода без направления беременных в федеральные лечебные учреждения.

ИЕРАРХИЧЕСКАЯ СИСТЕМА СЕМЕЙНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕВЕНЦИИ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

Е.В. Гуткевич

НИИ психического здоровья СО РАМН, г. Томск

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

В психиатрии нозоцентрическая парадигма психического здоровья сменяется на биопсихосоциальную с пересмотром роли пациента. Происходит переход отношений к больному вместе с его семейным окружением [1, 2]. Семейный уровень позволяет работать в реальных группах риска с разной вероятностью психических расстройств в определенном возрасте в соответствии с индивидуальными генетическими и семейными особенностями.

Цель работы – создание иерархической системы генетической превенции психических расстройств в семьях для определения возрастозависимых мишеней и управления комплексом разноуровневых рисков возникновения психических заболеваний.

Определяли качество жизни родственников больных; провели клинико-генеалогический анализ; системный анализ семейно-генетических механизмов возникновения психических расстройств на основе авторских моделей – многоуровневой модели функционирования семьи и онтогенетического цикла семьи из нескольких поколений. Исследованы 502 семейные системы больных (пробанд и его родственники) различными психическими расстройствами в возрасте от 3 до 73 лет.

В результате проведенных исследований показано, что качество жизни родственников страдает. В группе родственников первой степени родства больных шизофреническими расстройствами психопатологию имеют 16,8% лиц. В группу риска входят в среднем 1,2 сибса, 0,3 ребенка и 0,07 внука. В семьях лиц с непсихотическими психическими

расстройствами общая психопатология родственников составляет 18,8%, в группу риска входят 1,4 сибса, 1 ребенок и 0,2 внука. В 49,4% семей детей с различными психическими расстройствами других детей нет. Среди них планируют деторождение 24 семьи (53,3%), что в 2 раза больше группы семей, где есть дети. Функционирование семейной системы при психических расстройствах у членов семьи характеризуется особенностями семьи, приводящими к фрустрации привычных способов функционирования, среднесбалансированными формами семейной адаптации, средним функциональным ресурсом семей с ситуационно обусловленными дисфункциональными стратегиями. При оценке социальной интеграции, доверительных связей и удовлетворенности социальной поддержкой выявлено, что чаще всего у пациентов практически нет эмоциональных контактов и доверительных отношений, резко ограниченные контакты в макросреде. При этом есть достаточные знания о своей психической болезни, недостаточные – об обострении и поведении при этом, о формах помощи.

Определены эмпирические риски возникновения эндогенных (шизофренических), непсихотических (истерических) и детских психических расстройств (табличные данные), возрастозависимые мишени, адаптационно-превентивный потенциал семей (ресурсы, ограничения и механизмы воздействия). Семейно-генетическая превенция является совокупностью различных видов деятельности и представляет собой коммуникативный процесс в цепи взаимодей-

ствий между всеми участниками и действующими при этом факторами. Многоуровневая система взаимодействия предполагает этапность, мультидисциплинарность и непрерывность; состоит из пяти уровней и включает медицинские, психологические и социально-экономические аспекты. Участниками являются: больной (индивидуальный уровень); семья (микросоциум или семейный уровень); организации, учреждения, институты (макросоциум или институциональный уровень); общество в целом. Повышение качества жизни больного, семьи и общества достигается понижением вероятности возникновения либо предотвращением заболевания; изменением адаптации нуклеарной семьи больного; появлением новых разноуровневых компетенций больных и родственников; повышением уровня генетических знаний больных, их родственников и населения. Первоначально проводятся дифференциальная диагностика психических расстройств, в том числе молекулярно-генетическое тестирование, и установление семейного

диагноза; семейно-генетические и генетико-психологические воздействия на больного, семью и общество; долгосрочные программы семейно-генетической диспансеризации групп риска; социальная интеграция больного и его семьи в общество; этико-гуманитарная, социальная, правовая и финансовая поддержка семей. Служба семейно-генетической профилактики психических расстройств позволяет повысить эффективность оказания помощи пользователям – психически больным и их семьям.

Литература

1. Гуткевич Е.В., Семке А.В., Семке В.Я. Семья психически больного в системе социальных координат (российские исследования). Семейно-генетический кризис // Сиб. вестник психиатрии и наркологии. 2011. № 1. С. 71–76.
2. Гуткевич Е.В. Современная семья в аспекте психологии здоровья личности: проблемы развития и возможности профилактики // Сиб. психол. журн. 2014. № 51. С. 120–131.

ТОЧКОВЫЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ *SMN1* В РОССИЙСКИХ СЕМЬЯХ С ПРОКСИМАЛЬНОЙ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИЕЙ I–IV ТИПА

В.В. Забненкова¹, С.Б. Артемьева², Г.Е. Руденская¹, Е.Л. Дадали¹,
А.В. Поляков¹

¹ Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва

² Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава России, г. Москва

Введение

Проксимальная спинальная мышечная атрофия I–IV типа (CMA I–IV) – одно из наиболее тяжелых нейромышечных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования. К возникновению проксимальной CMA I–IV типа приводят мутации в теломерной копии гена *SMN* (*SMN1*), расположенного в локусе 5q13 и кодирующего белок выживаемости мотонейронов. Основным типом мутаций в этом гене являются делеции экзонов 7 и (или) 8, которые выявлены у 95% больных. Оставшиеся 5% являются компаунд-гетерозиготами, сочетая точковую внутригенную мутацию в гене *SMN1* на одной хромосоме 5 с делецией экзонов 7 и (или) 8 гена *SMN1* на другой.

Цель работы – выявить точковые мутации и подтвердить диагноз у пациентов с фенотипом проксимальной CMA I–IV типа, имеющих делецию экзонов 7, 8 гена *SMN1* в гетерозиготном состоянии.

Материал и методы

Материалом для исследования служили образцы ДНК 13 больных CMA – пациентов НКО ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН и ФГБУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии» Минздрава России и их родителей. Анализ числа копий генов *SMN* осуществлен методом мультиплексной пробазависимой лигазной реакции с последующей амплификацией (MLPA). Поиск точковых мутаций проводили методом прямого автоматического секвенирования.

Результаты и обсуждение

При проведении прямого автоматического секвенирования у девяти больных выявлено семь точ-

ковых мутаций: в экзоне 1 – с.43C>T (p.Gln15X), в экзоне 5 – с.684dupA, в экзоне 6 – с.815A>G (p.Tyr272Cys), с.821C>T (p.Thr274Ile), с.824G>C (p.Gly275Ala), в экзоне 7 – с.835-2A>T, с.836G>T (p.Gly279Val). Мутации с.815A>G (p.Tyr272Cys) и с.824G>C (p.Gly275Ala) встретились дважды. Мутации с.824G>C (p.Gly275Ala) и с.835-2A>T описаны нами впервые. Учитывая тот факт, что три из семи зарегистрированных мутаций локализованы в экзоне 6, можно предположить, что данный экзон является «горячим» участком гена *SMN1*.

При семейном анализе выявлен один случай возникновения мутации *de novo*: однонуклеотидная замена с.43C>T (p.Gln15X), приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона.

Заболевание в исследуемой выборке представлено I–III типом. Мутации с.43C>T (p.Gln15X), с.835-2A>T, с.836G>T (p.Gly279Val) выявлены у больных CMA I типа, с.684dupA, с.815A>G (p.Tyr272Cys), с.824G>C (p.Gly275Ala) – у больных CMA II типа, с.821C>T (p.Thr274Ile) – у больного CMA III типа, что соответствует имеющимся опубликованным данным по этим точковым мутациям в гене *SMN1*. Можно сделать предположение, что тяжесть мутации хорошо соотносится с типом CMA у больного.

У трех больных с одной копией гена *SMN1* при проведении прямого автоматического секвенирования мутаций выявлено не было. Возможно, у этих пациентов мутации располагаются вне исследуемых последовательностей, например, в промоторной области или глубоко в интроне. А также, учитывая высокую частоту CMA 1/37, возможно, выявленное гетерозиготное носительство является популяционным при наличии другого клинически схожего заболевания.

МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ РЕБЕНКА ПОСЛЕ ПЕРЕСАДКИ КОСТНОГО МОЗГА

А.С. Иванова, Л.В. Гусева, И.А. Лапутин, Т.С. Юрченко, И.О. Ледовских, Е.Б. Костенко

Областная клиническая больница, медико-генетическая консультация, г. Омск

В практике врача-генетика редко встречаются пациенты с сочетанной патологией, при которой наличие одного заболевания может оказать влияние на выяснение причин другого. В нашей работе встретилась такая семья. У ребенка с заболеванием крови была проведена пересадка костного мозга, после которой оказалось невозможно определить кариотип по лимфоцитам периферической крови, поскольку при культивировании отмечается рост клеток донора.

В омскую медико-генетическую консультацию обратились за консультацией женщина с ребенком. Девочку 11 лет направил эндокринолог по поводу задержки физического развития.

Пробанд от второй доношенной беременности, двое родов. Беременность осложнилась угрозой выкидыша. Роды срочные, масса тела ребенка при рождении 3 700 г, рост 53 см. В период новорожденности патологии не выявлено. Психомоторное развитие соответствовало возрасту. Задержка физического развития отмечается с первого года жизни.

Фенотип: масса тела 27 кг, рост 127 см, телосложение пропорциональное, питание понижено, физическое развитие ниже среднего, долихоцефалия, из лицевых микроаномалий отмечается гипертелоризм глаз и эпикант, гипертелоризм сосков, сколиоз, половые органы сформированы по женскому типу, начинается увеличение одной молочной железы, умственное развитие соответствует возрасту. УЗИ гинекологическое в 11 лет: размеры яичников

соответствуют 8–9-летнему возрасту, рудиментарная матка. Половые гормоны ФСГ, ЛГ, тестостерон в пределах возрастной нормы. УЗИ щитовидной железы без изменений, УЗИ абдоминальное без структурных изменений, ЭхоКГ: аномальная хорда левого желудочка, рентгенография кистей в возрасте 9 лет: костный возраст соответствует 7–8 годам.

Девочка состоит на учете у гематолога с 2002 г. с диагнозом «острый миелобластный лейкоз». В 2004 г. ей была проведена пересадка костного мозга. Донором был мужчина. В настоящее время клиничко-гематологическая ремиссия. При исследовании кариотипа по лимфоцитам крови определен мужской набор хромосом (кариотип донора клеток костного мозга). Кариотип «пробанда» 46,XY [40]. Метафаз с женским набором хромосом не обнаружено. Проведено исследование полового X-хроматина: результат положительный. Кариотип матери 46,XX,6rh+pat, кариотип отца 46,XY, кариотип сибса пробанда 46,XX,6rh+mat. Семейное носительство варианта полиморфизма хромосомы 6 (увеличение центрального гетерохроматина в коротком плече) подтверждено С-окраской.

Для дальнейшего обследования необходимо провести кариотипирование пробанда по фибробластам клеток кожи. Данная методика используется редко в цитогенетических лабораториях РФ. Нами была найдена такая лаборатория в Санкт-Петербурге в Петровском банке стволовых клеток, но семья на данный момент времени за обследованием в нее не обращалась по материальным причинам.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ПЕРВОГО ТРИМЕСТРА БЕРЕМЕННОСТИ В Г. НОВОКУЗНЕЦКЕ И НА ЮГЕ КУЗБАССА

Л.И. Линдина, И.А. Ботвиньева, О.Н. Герасименко, И.В. Сорокина, Ю.Ю. Елесина, М.Г. Алексеева, А.Н. Полукаров

Зональный перинатальный центр, г. Новокузнецк

Высокая частота врожденных пороков развития (ВПР) и спорадический характер их возникновения определили развитие современных профилактических методов и поиск новых эффективных организационных алгоритмов пренатальной диагностики хромосомной патологии плода, в частности синдрома Дауна (СД) как одного из самых частых хромосомных нарушений. В декабре 2000 г. Минздравом РФ был издан приказ № 457 «О совершенствовании пренатальной диагностики в профилактике наследственных и врожденных заболеваний у детей» [1, 2].

С марта 2013 г. в Кемеровской области реализуется проект мероприятий по эффективному проведению пренатальной диагностики нарушений развития плода согласно приказу Департамента охраны здоровья населения Кемеровской области № 1605 от 08.11.2013 г. «О проведении на территории Кемеровской области пренатальной диагностики нарушений развития ребенка».

Основная цель проекта – проведение массового мониторинга беременных женщин в сроке гестации 11–14 нед с выявлением женщин группы риска по рождению ребенка с врожденными пороками развития или хромосомной патологией.

В один день проводится УЗИ с обязательным измерением толщины воротникового пространства и копчико-теменного размера, забирается венозная кровь для исследования белков свободной субъединицы хорионического гонадотропина (β -ХГЧ) и ассоциированного с беременностью белка РАРР-А, проводятся биохимические исследования на автоматическом анализаторе BRAHMS KRYPTOR compact plus (Германия). Расчет индивидуального риска рождения ребенка с хромосомной патологией проводится при помощи акушерско-гинекологической программы Astraia (Германия), рассчитывается пороговое значение риска 1 : 100 по трисомии 21, трисомии 18, трисомии 13 с учетом возраста женщины,

уровня сывороточных маркеров и толщины воротничкового пространства у плода.

Ультразвуковое исследование (пренатальный скрининг в сроке гестации 11–14 нед при КТР 45–85 мм) проводится в межтерриториальных кабинетах, в том числе в г. Новокузнецке, специалистами УЗ-диагностики, имеющими действующий сертификат FMF.

При получении результатов, свидетельствующих о высоком риске рождения ребенка с хромосомной патологией, женщине проводится экспертное УЗИ, медико-генетическое консультирование и, при согласии, инвазивная пренатальная диагностика при подозрении на хромосомную патологию у плода (исследование материала биопсии ворсин хориона).

Биохимические и цитогенетические исследования для беременных г. Новокузнецка и юга Кузбасса проводятся централизованно в клинико-диагностической лаборатории МБЛУ «Зональный перинатальный центр».

За январь – май 2014 г. обследовано всего 4 704 беременные женщины. Группа риска (1 : 100 и выше) составила 1,4% (68 случаев).

В этой группе 22 беременным женщинам проведена инвазивная пренатальная диагностика (иссле-

дованы ворсины хориона). Выявлено 7 случаев хромосомной патологии плода, что составило 10,3%.

Выявлено 4 плода с синдромом Дауна (один – транслокационный вариант, три – с трисомией 21), 1 случай с трисомией X и 9, 1 случай с синдромом Патау (транслокационный вариант в мозаичной форме), 1 случай – плацентарный мозаицизм.

Совершенствование пренатальной диагностики ВПР, включающей медико-генетическое консультирование, ультразвуковой и биохимический скрининг с применением инвазивных методов, позволяет снизить уровень перинатальной смертности и проводить профилактику наследственных и врожденных заболеваний у детей, предупреждать появление инвалидности в детском возрасте.

Литература

1. Пузырёв В.П., Назаренко Л.П. Генетико-эпидемиологическое исследование наследственной патологии в Западной Сибири. Томск. 2000. 187 с.
2. Юдина Е.В., Сыпченко Е.В., Варламова О.Л. и др. Инвазивные методы исследования в акушерской практике: итоги первого российского мультицентрового исследования // Пренатальная диагностика. М.: Реальное время. 2002. Т. 1, № 1. С. 11–16.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА И ЧАСТОТА ВРОЖДЕННОЙ МЕРОЗИН-НЕГАТИВНОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ В РОССИИ

Т.Б. Миловидова, Е.Л. Дадали, Г.Е. Руденская, А.В. Поляков

Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва

Введение

Врожденные мышечные дистрофии (ВМД) представляют собой группу нервно-мышечных заболеваний, характеризующихся тяжелой гипотонией, мышечной слабостью и контрактурами. Заболеваемость ВМД оценивается как 7 : 1 000 000, причем вклад врожденной мышечной дистрофии мерозинзависимой (ВМДД1А) составляет в 30–50% случаев ВМД в европейских странах. Однако точная частота ВМД1А и частота носительства данного заболевания на данный момент не определены. К фенотипу ВМД1А приводят мутации гена *LAMA2*, кодирующего $\alpha 2$ -цепь мерозина, который принимает участие в межклеточном взаимодействии, развитии нервов и миграции шванновских клеток. Классический фенотип ВМД1А проявляется дефицитом мерозина при иммуногистохимическом исследовании, патологическими симптомами мышечной дегенерации, фиброзом и характерными изменениями белого вещества головного мозга. Ген *LAMA2* расположен на длинном плече хромосомы 6, покрывает 633.43 kb и состоит из 64 экзонов, что делает молекулярно-генетическую диагностику ВМД1А трудоемкой, длительной и дорогостоящей.

В связи с вышеизложенным возникает необходимость определения частоты ВМД1А и частоты носительства данного заболевания и разработки дешевых и быстрых способов молекулярно-генетической диагностики ВМД1А в отягощенных семьях.

Материал и методы

В исследование вошли 26 семей с диагнозом ВМД1А. Поиск мутаций осуществлялся методом

прямого автоматического секвенирования по Сенгеру как с прямого, так и с обратного праймеров на приборе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) с использованием протокола фирмы производителя. В качестве матрицы для секвенирования использовали фрагменты ДНК, полученные после проведения ПЦР с использованием оригинальных олигонуклеотидных праймеров. Анализ результатов секвенирования осуществлялся с помощью программ Chromas и BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Разработка системы детекции частых мутаций гена *LAMA2* осуществлялась методом мультиплексной ПЦР с последующей рестрикцией.

Для определения частоты ВМД1А использовалась ДНК 1 тыс. здоровых неродственных человек, проживающих на территории РФ. Определение доли ВМД1А среди 436 пациентов с диагнозом «спинальная мышечная атрофия I–III типа», у которых была исключена делеция экзонов 7–8 гена *SMN1* в гомозиготном состоянии, также было осуществлено с помощью разработанной в ходе данной работы системы детекции частых мутаций гена *LAMA2*.

Результаты и обсуждение

В результате исследования 26 пробандов с ВМД1А мутации в гомо- или гетерозиготном состоянии были выявлены в 21 случае, что составляет 81%. Определен спектр мутаций гена *LAMA2* у российских больных. Примечательно, что были выявлены частые мутации гена *LAMA2*: с.2049_2050delAG (ex 14), составляющая 9,5%, с.7536delC (ex 54), составляющая 19%, и с.7732C>T (ex 55), составляющая 7,1%. На основании этих данных и мировых данных были

выбраны шесть мутаций, описание которых многократно встречается в литературе, была разработана система детекции частых мутаций гена *LAMA2*, информативность которой составила не менее 50%.

С помощью данной системы был проведен поиск частых мутаций гена *LAMA2* у 1 тыс. здоровых неродственных человек. В результате исследования было выявлено две мутации в гетерозиготном состоянии. Также была оценена доля больных ВМД1А среди пациентов с диагнозом «спинальная мышечная атрофия I–III типа», которая составила не менее 6%.

Заключение

У настоящей работы есть прямое практическое применение. У 21 из 26 пробандов с ВМД1А подтвержден клинический диагноз. Определен спектр мутаций гена *LAMA2* у российских больных. Выявлены частые мутации гена *LAMA2*, что позволило создать эффективную систему молекулярно-генетической диагностики ВМД1А в отягощенных семьях. Также в рамках данной работы впервые установлены заболеваемость ВМД1А и частота гетерозиготно-носительства в РФ.

РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ ПРЯМОЙ ДНК-ДИАГНОСТИКИ БУЛЛЕЗНОГО ЭПИДЕРМОЛИЗА

В.С. Михайлов¹, О.В. Глазова¹, Ю.Ю. Коталевская², Е.В. Заклязьминская¹

¹ Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского РАМН, г. Москва

² Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского

Введение

Буллезный эпидермолиз (БЭ) – наследственное заболевание соединительной ткани, встречается в популяции с частотой 1 случай на 50 тыс. новорожденных. Мутации не менее чем в 15 генах могут быть причиной заболевания. Большой размер генов и отсутствие частых мутаций затрудняют разработку и выполнение ДНК-диагностики.

ДНК-диагностика БЭ важна для определения генетической формы, оценки риска наследования БЭ, проведения медико-диагностического консультирования и пренатальной диагностики заболевания.

В настоящее время в практическое здравоохранение активно внедряются новые технологии, такие как секвенирование нового поколения (NGS), обладающие большей производительностью, экономичностью, меньшими трудо- и времязатратами в сравнении с «классическими» методами. Согласно существующим протоколам, результаты, полученные с помощью NGS, нуждаются в верификации методом капиллярного секвенирования по Сэнгеру.

Прямая ДНК-диагностика БЭ включает в себя поиск мутаций в кодирующих последовательностях генов, вовлеченных в патогенез БЭ, методом прямого секвенирования по Сэнгеру или с использованием NGS.

Материал и методы

Впервые в России была разработана прямая ДНК-диагностика наиболее частых и клинически тяжелых форм буллезного эпидермолиза, включающая поиск мутаций в семи генах (*COL7A1*, *IGTB4*, *KRT5*, *KRT14*, *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*). Была проведена ДНК-диагностика больным из четырех неродственных се-

мей. Двум пробандам осуществили поиск мутаций только в гене *COL7A1* методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Двум пробандам провели поиск мутаций в генах *COL7A1*, *IGTB4*, *KRT5*, *KRT14*, *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2* на платформе секвенатора PGM IonTorrent с использованием полупроводниковых 314* чипов с минимальной 25-кратной глубиной покрытия.

Результаты и обсуждение

У двух пробандов выявлены известные мутации, достоверно ассоциированные с заболеванием. В одной семье обнаружен новый генетический вариант с неизвестным клиническим значением (Pro2167=N, находится в непосредственной близости от rs200473808) в гене *COL7A1*. Этот вариант не был найден в группе здоровых доноров (100 человек, 200 хромосом). В одном случае клинически значимых или новых генетических вариантов выявлено не было.

Выполнение последовательного секвенирования семи генов по Сэнгеру требует не менее 6 мес исследования на одного пациента. Затраты времени на то же исследование при использовании NGS для одновременного поиска мутаций у четырех пробандов не превышают 6 нед. Кроме того, стоимость исследования с применением NGS составляет около 20% от стоимости сходного по объему исследования, выполняемого с использованием секвенирования по Сэнгеру.

Заключение

Методы NGS имеют преимущества в решении задач, требующих анализа большого числа протяженных генов, в частности в диагностике заболеваний с большим числом заинтересованных генов, таких как буллезный эпидермолиз.

ПОРОКИ РАЗВИТИЯ ОРГАНОВ МОЧЕВОЙ СИСТЕМЫ В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

А.Н. Ноговицына^{1,2}, И.Р. Егорова¹, А.Л. Сухомясова^{1,2}, Н.Р. Максимова^{1,3}

¹ Якутский научный центр комплексных медицинских проблем СО РАМН, г. Якутск

² Республиканская больница № 1 – Национальный центр медицины, г. Якутск

³ Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск

В настоящем исследовании проведен анализ данных республиканского мониторинга врожденных пороков развития за 2000–2009 гг. и впервые опре-

делена частота, структура пороков развития мочеполовой системы новорожденных и прерванных плодов в Якутии.

Анализ данных республиканского мониторинга пороков развития показал, что за 10 лет зарегистрировано 289 случаев пороков развития мочеполовой системы (МПС) у новорожденных и плодов, в том числе 192 изолированных порока развития и 97 – в составе множественных пороков развития (исключая синдромальные). Кроме того, было выявлено 236 пиелозктазий: односторонних – 185 (г. Якутск – 115, в районах – 70), двусторонних – 51 (г. Якутск – 26, в районах – 25). Среднегодовая частота пороков мочеполовой системы у новорожденных и прерванных плодов составила 0,14%. Наиболее высокая частота пороков МПС отмечалась в 2006–2007 гг., при этом частота изолированных пороков составила 0,25%, а в составе МВГПР – 0,1%.

За изучаемый период времени выявлено 164 новорожденных с изолированными пороками развития МПС, а 28 плодов элиминированы по медицинским показаниям. Элиминация плодов с ВГПР МПС с согласия семьи в основном проводилась в связи с двусторонним процессом (двусторонняя агенезия почек, двусторонняя гипоплазия почек). Эффективность профилактики составила 14,5%. В структуре изолированных пороков мочевыводящей системы у новорожденных и прерванных плодов доминируют гидронефротическая трансформация почек (Q 62.0) – 0,07% и поликистоз почек детского типа (Q 61.1) – 0,02%. На третьем месте у новорожденных – агенезия почки односторонняя (Q 60.0) – 0,01%, а у плодов – другие уточненные anomalies мочевыводящей системы. Общая частота изолированных пороков мочеполовой системы у новорожденных составила 0,12%, а у прерванных плодов – 0,02%.

Пороки развития МПС в составе множественных пороков развития были верифицированы в 97 случаях: 72 новорожденных (74,2%), 25 элиминированных плодов (25,7%). В общей структуре пороков развития МПС в составе множественных пороков развития, как и у новорожденных (0,01%), лидирующие позиции занимают гидронефроз (0,02%) и односторонняя агенезия почки (0,02%), на втором месте – поликистоз почек детского типа (0,01%). Своевременно выявлены и элиминированы плоды с поликистозом почек детского типа – 7, с односторонней агенезией почки – 5, с двусторонней гипоплазией почки – 4. Новорожденные с тяжелыми, неподдающимися коррекции пороками развития мочеполовой системы в составе МВГПР (двусторонняя агенезия почек – 3, поликистоз почек детского типа – 4, экстрофия мочевого пузыря – 2), кроме того, с гидронефрозом и односторонней агенезией почки, достоверно чаще ($p < 0,05$), по сравнению с г. Якутском, родились в районах. Частота пороков развития мочеполовой системы в составе множественных пороков развития у новорожденных составила 0,05%, а у прерванных плодов – 0,02%. Общая частота ВГПР МПС в составе МВГПР составила 0,07%, а после профилактических мероприятий у новорожденных снизилась до 0,05%.

Таким образом, наиболее частым пороком развития почек у новорожденных являются односторонняя агенезия почки и гидронефроз, при котором возможна хирургическая коррекция в зависимости от степени поражения. Достоверно высокая частота рождаемости новорожденных с ВГПР МПС, в том числе и с тяжелыми пороками развития, в районах обусловлена недостаточным уровнем профилактических мероприятий.

ДВА СЛУЧАЯ БОЛЕЗНИ ФАБРИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

М.Е. Поляк¹, Е.В. Заклязьминская^{1,2}, Л.Т. Голивец³, О.В. Благова², Д.Г. Подоляк¹,
С.Л. Дземешкевич¹

¹ Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского, г. Москва

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, г. Москва

³ Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва

Введение

Болезнь Фабри – заболевание из группы лизосомных болезней накопления, наследуемое по X-сцепленному рецессивному типу и обусловленное мутациями в гене *GLA*. В настоящее время частота болезни Фабри оценивается в 1:4 000–1:1 000 000 мальчиков. Ген *GLA* кодирует лизосомальный фермент α -галактозидазу А. Описано около 200 мутаций в гене *GLA*, приводящих к болезни Фабри. Дефицит фермента α -галактозидазы А приводит к накоплению гликофинголипидов в лизосомах и к развитию полиорганной патологии, в которую вовлечены сердце, почки, центральная и периферическая нервная система. Предполагается, что около 6% больных с гипертрофической кардиомиопатией, манифестирующей после 40 лет, имеют болезнь Фабри. В настоящее время для болезни Фабри разработана ферментная терапия, замещающая врожденный дефицит фермента и замедляющая прогрессирование заболевания.

Материал и методы

Наблюдали двух неродственных пациентов – П., 32 года, и Н., 54 года, поступивших для обследования и лечения в отделение хирургического лечения дисфункции миокарда с направляющим диагнозом «гипертрофическая кардиомиопатия». В обоих случаях экстракардиальные симптомы включали наличие ангиокератом, парестезии, непереносимость высоких температур. В обеих семьях у родственниц пациентов частичные проявления заболевания: ангиокератомы, парестезии в руках. Матери пациента П. был ранее установлен диагноз ГКМП и имплантирован кардиостимулятор.

Биохимический анализ, проведенный пациенту П., показал существенное снижение активности α -галактозидазы А: 5,1 нмоль/(мг·ч) (норма 48,6–150,3 нмоль/(мг·ч)). Поиск мутаций в гене *GLA* был проведен для обоих пациентов методом прямого секвенирования по Сенгеру. У пациента П. обнаружена миссенс-мутация p.Q283E; у пациента Н.

выявлена делеция с.946delG. Также ДНК-диагностика была проведена для дочери пациента Н., имеющей признаки заболевания; обнаружена делеция с.946delG в гетерозиготном состоянии.

Заключение

После тщательного клинического обследования и проведения ДНК-диагностики у двух пациентов с направляющим диагнозом «гипертрофическая кардиомиопатия» диагностирована болезнь Фабри. У одного пациента обнаружена миссенс-мутация р.Q283E, у второго – делеция с.946delG, приводя-

щая к образованию преждевременного стоп-кодона. Обе мутации описаны в литературе как патогенные. Пациент Н. с мутацией с.946delG был старше на момент постановки диагноза, и клинические признаки заболевания у него были менее выражены, чем у пациента с мутацией р.Q283E. Вероятно, укороченный белок более функционален, чем белок с миссенс-мутацией. Ферментная терапия была рекомендована обоим пациентам. Авторы считают, что частота болезни Фабри в группе пациентов с гипертрофической кардиомиопатией может недооцениваться.

СПЕКТР МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *KCNQ1* У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ УДЛИНЕННОГО ИНТЕРВАЛА QT

М.Е. Поляк¹, Л.М. Макаров², М.В. Яковлева¹, А.В. Поляков³,
Е.В. Заклязьминская¹

¹ *Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского, г. Москва*

² *Центр синкопальных состояний и сердечных аритмий у детей и подростков ФМБА России, г. Москва*

³ *Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва*

Введение

Синдром удлиненного интервала QT (LQTS) характеризуется удлинением корригированного интервала QT и высоким риском внезапной сердечной смерти (ВСС) вследствие развития полиморфной желудочковой тахикардии. В настоящее время известно 13 генов, мутации в которых приводят к развитию LQTS. Однако даже при скрининге всех известных генов мутацию удается обнаружить только в 65–75% случаев заболевания. Наиболее часто в российской популяции мутации обнаруживаются в гене *KCNQ1*, ответственном за развитие LQT1 (синдром удлиненного интервала QT, тип 1). Ген *KCNQ1* кодирует α -субъединицу калиевого канала, определяющего медленный компонент калиевого тока задержанного выпрямления I_{Ks} . ДНК-диагностика проводилась больным с направляющим диагнозом «синдром удлиненного интервала QT» за период с 1997 по 2014 г. В настоящей работе представлены результаты анализа спектра мутаций в гене *KCNQ1*.

Материал и методы

За период 1997–2014 гг. было обследовано 130 семей с диагнозом «синдром удлиненного интервала QT». От всех пациентов в соответствии с Хельсинкской декларацией было получено информированное согласие на забор и хранение биологического материала (образца венозной крови) и на проведение генетических исследований. Выделение ДНК проводилось стандартными методами (фенол-хлороформная экстракция, набор реагентов Promega). Секвенирование полной кодирующей последовательности и прилегающих интронных областей выполнялось на автоматических секвенаторах по протоколам фирм. Анализ результатов проводился с использованием программ Chromas, SeqMap. Для родственников пробанда в случае обнаружения мутации анализ фрагмента гена проводился методом ПЦР-ПДРФ. Контрольная группа была сформирована из образцов ДНК 110 клинически здоровых доноров.

Результаты и обсуждение

Всего за период 1997–2014 гг. было обследовано 130 семей с диагнозом «синдром удлиненного интервала QT». В гене *KCNQ1* было выявлено 36 мутаций в 44 семьях, что составило 33,8% случаев. Полученные данные сопоставимы с частотой мутаций в гене *KCNQ1* среди больных с синдромом удлиненного интервала QT в других этнических группах. Наиболее часто в выборке обнаруживались миссенс-мутации, их доля составила 86%. В 14% случаев определены мутации сплайсинга. За время наблюдения обнаружена только одна делеция со сдвигом рамки считывания, приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона; нонсенс-мутаций не было. Выявлено два генетических варианта с неустановленным клиническим значением; остальные обнаруженные мутации были ранее описаны в литературе как патогенные. Наибольшее число мутаций находилось в экзонах 1, 6, 7, 8, 9, 16. Несмотря на то что в экзонах 10, 11, 12, 17 в выборке мутаций обнаружено не было, авторы считают целесообразным проводить поиск мутаций во всей кодирующей последовательности гена *KCNQ1*. У 3 пробандов обнаружено по две мутации в гене *KCNQ1*, что составило около 2% случаев. У всех носителей двух мутаций наблюдались раннее начало заболевания и гораздо более тяжелое течение.

Заключение

Доля мутаций в гене *KCNQ1* в выборке больных составила 33,8%, что сопоставимо с частотой мутаций в других этнических группах. ДНК-диагностика гена *KCNQ1* методом Сенгера представляется целесообразной при подозрении на LQT1. Однако, учитывая генетическую гетерогенность заболевания и возможность носительства двух мутаций в одном или двух генах-кандидатах, наиболее перспективным методом исследования представляется скрининг максимально доступного числа генов методами секвенирования нового поколения, особенно в случае необычно тяжелого течения заболевания.

АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНЫЕ ФОРМЫ В ВЫБОРКЕ ДЕВОЧЕК С НАПРАВЛЯЮЩИМ ДИАГНОЗОМ «МЫШЕЧНАЯ ДИСТРОФИЯ ДЮШЕННА–БЕККЕРА»

Д.А. Полякова, О.П. Рыжкова, В.В. Забненкова, Н.В. Комарова, А.В. Поляков

Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва

Мышечные дистрофии – группа генетических заболеваний, включающая около 50 различных заболеваний, объединенных общим для всех клиническим симптомом: генерализованной прогрессирующей атрофией скелетных мышц

Поясно-конечностные мышечные дистрофии (ПКМД) – обширная группа отличных от других мышечных дистрофий заболеваний. Клинически они характеризуются поражением проксимальных частей верхних и нижних конечностей. Частота заболеваемости поясно-конечностными мышечными дистрофиями с аутосомным типом наследования составляет 1 : 10 000 человек. При этом на долю рецессивных форм ПКМД приходится 85%, тогда как доминантные формы составляют около 15% от всех ПКМД.

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) – самое частое заболевание среди всех мышечных дистрофий. Встречается с частотой 1 на 3–3,5 тыс. новорожденных мальчиков.

Клинические проявления МДД: слабость проксимальной мускулатуры, нарушения походки, приемы Говерса, гиперлордоз в поясничном отделе позвоночника, крыловидные лопатки, повышение уровня активности креатинфосфокиназы, иногда нарушения сознания и мозговой деятельности, сгибательные контрактуры суставов, псевдогипертрофии икроножных мышц. Клинические проявления МДД и АР форм ПКМД очень схожи. Поэтому логично предположить наличие мутаций в генах АР форм ПКМД у таких пациенток.

Мышечная дистрофия Дюшенна (Дюшенна–Беккера) – рецессивное заболевание, сцепленное с половой X-хромосомой. Обычно заболевание проявляется у мужчин. Но возможны три генетических варианта, когда девочка будет не носительницей данного заболевания, а больной:

1) наличие полной или мозаичной формы синдрома Шерешевского–Тернера (X0); в этом случае

возможна клиника МДД, если на единственной существующей X-хромосоме имеется мутация в гене дистрофина;

2) несбалансированная лайонизация здоровой X-хромосомы, при условии, что на другой X-хромосоме имеется мутация в гене дистрофина;

3) мутация *de novo* в гене дистрофина на одной из X-хромосом в сочетании с унаследованной от матери мутации в гене дистрофина на другой X-хромосоме.

Материал и методы

Выборка: 38 девочек с направляющим диагнозом «Миодистрофия Дюшенна–Беккера».

I. Проверка диагноза МДД:

1) синдром X0 (исследование высокополиморфных STR X-хромосомы);

2) лайонизация (интенсивность сигнала при фрагментарном анализе метилирования);

3) мутации в гене *DMD* (делеции + дупликации – *MLPA*-анализ).

II. Поиск мутаций в других генах: *CAPN*, *FKRP*, *SGC*, *ANO5*, *DYSF*, *SMA* (поиск частых мутаций, затем секвенирование всей кодирующей последовательности)

Результаты

Ни у одной девочки с МДД/МДБ диагноз на молекулярно-генетическом уровне не подтвердился (мутации в гене *DMD* не обнаружены).

Примерно в половине случаев (44,8%) обнаружены мутации в генах АР ПКМД. Доли заболеваний распределились следующим образом: ПКМД2D (*SGCA*) – 13,2%; ПКМД2I (*FKRP*) – 13,2%; ПКМД2A (*CAPN3*) – 13,2%; ПКМД2E (*SGCB*) – 2,6%; *SMA* (*SMNc*) – 2,6%

В 33,3% случаев с неравной лайонизацией X-хромосомы подтверждены АР формы ПКМД. Таким образом, данный метод не является подтверждающим для диагностики МДД/МДБ у девочек.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СИНДРОМА МАРФАНА

Ю.А. Рогожина, В.А. Румянцева, Е.В. Заклязьминская

Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского, г. Москва

Введение

Синдром Марфана (СМ) – одно из самых частых заболеваний из группы дисплазии соединительной ткани. Согласно данным европейских и американских исследований, у большинства пациентов обнаруживается мутация в гене *FBN1*, состоящим из 65 кодирующих экзонов. В связи с большим размером гена и отсутствием «горячих» участков кластеризации мутаций подтверждающая ДНК-диагностика СМ выполняется в единичных лабораториях. Поэтому данные о спектре мутаций и частотах находок в разных участках гена *FBN1* у российских больных практически отсутствуют.

Цель работы – проанализировать спектр мутаций в гене *FBN1*.

Материал и методы

Поиск мутаций во всех 66 экзонах *FBN1* проведен 10 больным, у 19 пациентов исследован только кластер из девяти экзонов (24–32). У всех пациентов полностью выполнялись диагностические критерии синдрома Марфана. Молекулярно-генетический анализ полной последовательности гена проводился с помощью NGS на платформе PGM IonTorrent с проверкой найденных замен путем прямого секвенирования по Сенгеру. Исследовались кодирующие участки и прилегающие интронные области гена

FBN1. Все генетические варианты проанализированы с помощью ресурсов NetGene2, PolyPhen2 и Sift.

Результаты и обсуждение

При исследовании кластера из девяти экзонов *FBN1* миссенс-мутации обнаружены у 3 пациентов из 19 (р.С921R, р.С950S, р.11048T). Диагностическая эффективность анализа только «горячих» экзонов составила 16%.

При исследовании полной кодирующей последовательности клинически значимые генетические изменения найдены у 7 пациентов из 10. При этом у 3 определены стоп-кодоны (р.У181*, р.Р516*, р.Г1811*); у 1 пациента сдвиг рамки считывания с преждевременным появлением стоп-кодона в экзоне

9 (с.661delT). Также обнаружены три новые несинонимичные замены (р.С2468R, р.С739W, р.С1095S), оцениваемые биоинформатическими ресурсами как повреждающие структуру белка. Диагностическая эффективность такого подхода составила 70% выявляемости мутаций.

Диагностическая система, основанная на исследовании только девяти экзонов, не обладает достаточной эффективностью, и авторы считают целесообразным проводить анализ всего гена. Наиболее многообещающим и оптимальным в соотношении стоимость исследования – диагностическая эффективность представляется использование высокоэффективного секвенирования нового поколения.

СОЗДАНИЕ СИСТЕМЫ ДЕТЕКЦИИ ТОЧКОВЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ ДИСТРОФИНА НА ОСНОВЕ NGS

О.П. Рыжкова, Н.В. Комарова, А.Н. Логинова, А.В. Поляков

Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) – одно из самых частых наследственных заболеваний. Встречается с частотой 1 на 3–3,5 тыс. новорожденных мальчиков. Первое фенотипическое описание заболевания было сделано G. Duchenne в 1868 г. Спустя почти век, в 1955 г., Беккер и Кинер описали его аллельную форму с более мягким течением – миодистрофию Беккера. Ее называют также доброкачественной псевдогипертрофической миодистрофией. Частота миодистрофии Беккера (МДБ) – около 3 на 100 тыс. новорожденных мальчиков, то есть в 10 раз реже, чем частота миодистрофии Дюшенна.

В 1987 г. Kunkel открыл ген дистрофина – белка, нарушение функций которого приводит к характерной клинической картине МДД и МДБ. Ген *DMD* локализован на длинном плече X-хромосомы (Xp21), состоит из 79 экзонов и его протяженность составляет 3 Мб, что является примерно 1/1 000 частью всего человеческого генома. Размер мРНК составляет 14 кб. Белок дистрофин состоит из 3 685 аминокислот и имеет молекулярную массу 427 кДа. Таким образом, на сегодняшний день ген дистрофина – самый крупный из известных человечеству.

В связи с этим возникают существенные трудности при его молекулярно-генетическом исследовании. На данный момент в РФ проводится анализ только протяженных делеций и дупликаций в гене *DMD*, причем исследование последних стало возможным сравнительно недавно, с 2012 г. Это происходит из-за дороговизны исследования, его трудоемкости и времязатратности. Однако известно, что протяженные делеции и дупликации в гене *DMD* составляют около 60 и 10% всех мутаций соответственно. То есть еще треть составляют точковые замены, а также небольшие делеции и дупликации, для которых не разработаны подходы к диагностике. Из этого следует, что данным больным невозможно поставить точный диагноз, подтвержденный молекулярно-генетическими методами, а значит, невозможно дальнейшее медико-генетическое консультирование семьи и пренатальная диагностика.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы стало создание системы детекции точковых мутаций в гене дистрофина на основе NGS.

NGS (англ. Next Generation Sequencing) – секвенс следующего поколения, техника определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для получения формального описания ее первичной структуры. Технология методов NGS позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования. Таким образом, в ходе NGS могут генерироваться до сотен мегабайт нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл, что не только увеличивает производительность и скорость прочтения до миллиардов пар оснований, но и позволяет существенно снизить стоимость процесса.

В основе всех NGS-технологий лежат несколько этапов: 1) создание библиотек – выделение ДНК или РНК; 2) фрагментация молекул ультразвуком или ферментативным методом; 3) предварительная амплификация – получение колоний фрагментов библиотеки на различных твердых носителях (слайды или микро-сферы); 4) подготовка к секвенированию; 5) секвенирование; 6) компьютерная обработка результатов.

Были переработаны и улучшены протоколы исследования, представленные фирмами-производителями. Так как в клинической практике необходимо максимально снизить возможную ошибку, ввели возможность визуального и технического контроля на всех этапах создания библиотек. Также улучшили «выравнивание» концентраций конечных продуктов амплификации и унифицировали праймеры для получения колоний фрагментов библиотеки на твердых носителях, что даст возможность более равномерного секвенирования фрагментов и меньшего разброса в их «покрытии». Проведена разработка собственных праймеров, что значительно снизило себестоимость исследования на образец и дало возможность дальнейшей адаптации используемой методики для других исследований. Так как в настоящее время фирмами-производителями не предоставляются наборы для диагностики схожих по клинике заболеваний, а имеющиеся решения не пригодны для клинических исследований, авторы предусмотрели возможность расширения и улучшения предлагаемой системы.

ГОНОСОМНЫЙ МОЗАИЦИЗМ И НАРУШЕНИЕ РЕПРОДУКЦИИ У ЧЕЛОВЕКА

В.Б. Черных

Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва

Аномалии половых хромосом (гоносом) – обширная группа нарушений различных уровней (хромосомного, микроструктурного, генного и эпигенетического) генома, часто встречающихся у пациентов с нарушением развития и (или) функции органов репродуктивной системы. Они занимают одно из ведущих мест среди причин нарушений дифференцировки и формирования пола, развития половой системы, тяжелых форм бесплодия, умственного развития. При этом гоносомные хромосомные аберрации (ХА) могут быть как в виде синдромальных, так и несиндромальных форм. Среди впервые описанных хромосомных мутаций (первые типы анеуплоидий, описанные у человека) на заре развития цитогенетики были такие синдромы, как моносомии Х, трисомии Х, дисомии Y, Клайнфельтера, '46,XX-мужчина'. Несмотря на то что эти состояния описаны и охарактеризованы, остаются недостаточно изученными множество вопросов, связанных с механизмами патогенеза, с генетическими факторами фенотипической вариабельности, определяющими данные генетические нарушения. Помимо количественных хромосомных мутаций в системе гоносом описано множество структурных цитогенетически детектируемых и микроструктурных перестроек с вовлечением половых хромосом или их материала (терминальных и интерстициальных делеций, транслокаций, инсерций, кольцевых, изо- и изодисцентрических хромосом, сложных хромосомных перестроек). Как в случаях нормального кариотипа, так и при многих аномалиях кариотипа, связанных с мутацией половых хромосом, может встречаться цитогенетически идентифицируемый гоносомный мозаицизм (ГМ), в частности при стандартном цитогенетическом исследовании (анализе кариотипа), в том числе низкопроцентный или минорный мозаицизм (менее 10% клеток). Среди пациентов с мутациями половых хромосом и реже с нормальным кариотипом может встречаться скрытый ГМ, выявляемый молекулярными методами исследования. Мозаицизм часто сопровождает структурные перестройки хромосом Х и Y, такие как кольцевые, изохромосомы, изодисцентрические хромосомы, протяженные терминальные делеции, при этом тип и выраженность мозаицизма в разных органах и тканях может играть значимую и даже принципиальную роль в тяжести гоносомной аномалии и выраженности фенотипического проявления. Так, при некоторых типах ГМ отмечают выраженный клинический полиморфизм, значительную вариабельность в фенотипических проявлениях и наличие различных форм нарушения формирования пола (НФП) или только наличие нарушения репродуктивной функции, например при таких типах мозаицизма, как

X/XY и XX/XY. За счет наличия ГМ возможно перекрытие некоторых гоносомно обусловленных форм НФП. Скрытый мозаицизм по хромосоме Y у пациенток с ее отсутствием в кариотипе требует обязательного удаления гонад из-за возможности их озлокачивания. Однако следует также учитывать, что низкопроцентный мозаицизм по половым хромосомам может быть псевдомозаицизмом (артефактом, связанным с культивированием клеток), связан с цитогенетическими особенностями кариотипа в различные этапы онтогенеза человека (появление и увеличение клона 45,X с возрастом), XX/XY химеризмом (ошибки оплодотворения) или микрохимеризмом (при переливании крови, пересадке костного мозга, у близнецов, у матерей). При многих перестройках гоносом, особенно структурных, наиболее эффективным подходом в диагностике является комбинирование методов генетического исследования (стандартная цитогенетика, молекулярно-цитогенетические и молекулярно-генетические методы). При этом нужно исследовать не только лимфоциты, но и буккальный эпителий, при возможности и другие ткани, биоптаты гонад, фибробласты кожи. Непростую задачу представляет собой определение мозаичных микроструктурных перестроек половых хромосом, однако с помощью используемых для этого высококоразрешающих молекулярно-цитогенетических (CGH-array, CNV) и молекулярно-генетических (QF-PCR, MLPA) методов могут быть обнаружены случаи простого мозаицизма с минорным клоном более 15–20%. Следует отметить, что хромосомы Х и Y имеют участки гомологии высокой степени, наиболее крупные из которых псевдоаутосомные регионы PAR1, PAR2, Xp22.3/Yq11.21, Xq21/Yp11.2 локусы, поэтому их различие затруднено и возможны ошибки диагностики и (или) интерпретации полученных результатов. Особое место занимает проблема детекции гоносомного мозаицизма в преимплантационной и пренатальной диагностике. Мозаицизм по гоносомам редко обнаруживают при проведении пренатальной генетической диагностики, у эмбрионов, переносимых в программах ЭКО/ICSI, повышен риск возникновения ГМ и химеризма XX/XY.

Подводя итог, можно заключить, что выявление и оценка выраженности гоносомного мозаицизма имеет важное значение в генетической диагностике аномалий половых хромосом, нарушений развития и функции органов репродуктивной системы, зачастую является значимым фактором, влияющим не только на диагностику, но и на клиническое ведение пациента, тактику его лечения, прогноз, оценку генетического риска.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ГОНОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ QF-PCR

А.Л. Чухрова, Т.С. Бескоровайна, В.Б. Черных, А.В. Поляков

Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва

Введение

Нарушение числа половых хромосом – большая группа синдромов. К ней относятся моносоμία по X-хромосоме у женщин (синдром Шерешевского–Тернера), полисомии по X-хромосоме у женщин и мужчин (в том числе синдром Клайнфельтера), дисоμία по Y-хромосоме у мужчин. Для всех этих состояний описаны как полные, так и мозаичные формы. Частота их сильно варьирует: так, например, для синдрома Клайнфельтера она составляет 1:500–700, а для синдрома Шерешевского–Тернера – 1:2 000–5 000.

Цель данной работы – анализ образцов ДНК пациентов с различными гоносомными аномалиями методом количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции (QF-PCR).

Материал и методы

Исследовались образцы ДНК больных с нарушениями числа половых хромосом, ранее обследованных стандартными цитогенетическими и молекулярно-генетическими методами, с использованием QF-PCR.

Результаты и обсуждение

В большинстве случаев для диагностики указанных синдромов применим метод количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции (ПЦР), который представляет собой мультиплексную ПЦР с использованием флуоресцентно меченных праймеров, фланкирующих полиморфные короткие tandemные повторы (STR-локусы).

Созданная авторами система диагностики наиболее частых анеуплоидий включает 25 маркеров (по пять маркеров на хромосомы 13, 18, 21, X; маркеры AMEL, 4SH, ZFX, SRY – для определения пола, маркер TAFL – для определения относительного количества хромосом X в геноме (таблица)), которые одновременно амплифицируются в одной пробирке, а затем полученные ПЦР-продукты анализируются на автоматическом секвенаторе с использованием программного обеспечения GeneMapper 3.7.

Сочетание цитогенетических, молекулярно-цитогенетических и молекулярных методов исследования позволило показать, что метод QF-PCR можно применять для диагностики нарушения числа половых хромосом как для полных, так и для мозаичных форм (при этом уровень выявляемого мозаицизма колеблется от 5 до 15–20% для разных случаев), анализа некоторых структурных гоносомных аномалий (делеций, дупликаций, кольцевых хромосом, изохромосом, дицентрических и маркерных хромосом, XX-транслокаций, XY-транслокаций, несбалансированных X-аутосомных и Y-аутосомных транслокаций), детекции химеризма (например, при кариотипе 46,XX/46,XY), диагностики XX- и XY-инверсии пола, а также для анализа происхождения X-хромосом (например, при синдроме Клайнфельтера, трисомии X).

Характеристика маркеров, используемых в системе АнПол-25

| Маркер | Локализация | Гетерозиготность |
|----------|----------------|------------------|
| D13S252 | 13q12.2 | 0,74 |
| D13S305 | 13q13.3 | 0,79 |
| D13S634 | 13q21.33 | 0,84 |
| D13S800 | 13q22.1 | 0,72 |
| D13S628 | 13q31.1 | 0,75 |
| D18S819 | 18q11.2 | 0,73 |
| D18S535 | 18q12.3 | 0,77 |
| D18S978 | 18q12.3 | 0,71 |
| D18S386 | 18q22.1 | 0,92 |
| D18S390 | 18q22.3 | 0,69 |
| AMEL | Xp22.22/Yp11.2 | – |
| 4SH | Xp22.3/Yq11.2 | – |
| ZFX | Xq21/Yp11.2 | – |
| D21S11 | 21q21.1 | 0,82 |
| D21S1409 | 21q21.2 | 0,74 |
| D21S1442 | 21q21.3 | 0,85 |
| D21S1435 | 21q21.3 | 0,74 |
| D21S1446 | 21q22.3 | 0,76 |
| DXS6803 | X21.31 | 0,86 |
| XHPRT | Xq26.2 | 0,72 |
| DXS1187 | Xq26.2 | 0,73 |
| DXS9896 | Xp21.1 | 0,75 |
| DXS8378 | Xp22.31 | 0,70 |
| SRY | Yp11.31 | – |
| TAFL | Xq21.1/3p24.2 | – |

СПЕКТР МУТАЦИЙ В ГЕНАХ PKP2 И DSG2 У БОЛЬНЫХ С АРИТМОГЕННОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ ПРАВОГО ЖЕЛУДОЧКА

А.Г. Шестак¹, О.В. Благова², М.В. Носкова¹, Ю.В. Фролова¹, С.Л. Дземешкевич¹,
Е.В. Заклязьминская¹

¹ Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского РАМН, г. Москва

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, г. Москва

Введение

Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка (АКПЖ) – наследственное заболевание, характеризующееся фиброзно-жировым замещением миокарда правого желудочка, специфическим пат-

терном ЭКГ, жизнеугрожающими желудочковыми нарушениями ритма. Описаны случаи бивентрикулярного поражения миокарда, а также формы заболевания с преобладанием поражения левого желудочка. Заболевание может длительное время протекать малосимптомно, что делает его раннюю

диагностику достаточно сложной. Часто первым и единственным проявлением заболевания является внезапная сердечная смерть. В большинстве случаев АКПЖ наследуется по аутосомно-доминантному типу. В 80% случаев она выявляется в возрасте до 40 лет, чаще у мужчин. Диагноз АКПЖ устанавливается на основе диагностических критериев, предложенных Marcus и соавт. в 2010 г. Определение мутаций в генах, ответственных за развитие АКПЖ, – значимый критерий для постановки достоверного диагноза заболевания. На сегодняшний день известны не менее 12 генов, мутации в которых могут стать причиной АКПЖ. В 25–40% случаев АКПЖ обусловлена мутациями в гене плакофилина *PKP2*, в 12–40% случаев – мутациями в гене десмоглеина *DSG2*. Скрининг мутаций в генах *PKP2* и *DSG2*, ответственных за развитие до 80% случаев АКПЖ, рекомендован экспертной группой HRS/EHRA.

Материал и методы

Клиническое и генетическое обследование было проведено 32 пациентам из 30 неродственных семей. Средний возраст манифестации у пробандов составил 41 год. Клиническое обследование включало ЭКГ, 24-часовое ХМ, эхоКГ, МРТ сердца, биопсию миокарда. Генетическое обследование включало прямое секвенирование кодирующей последовательности и прилегающих областей генов *PKP2* и *DSG2*. По запросу семьи была выполнена ДНК-диагностика родственникам пробанда с выявленной мутацией. Прогностическое значение выявленных генетических вариантов оценивалось с помощью программы PolyPhen2.

Результаты и обсуждение

Поиск мутаций в генах *PKP2* и *DSG2* был выполнен 32 пациентам с диагнозом АКПЖ, поставленным на основе диагностических критериев 2010 г.

В лаборатории медицинской генетики Российского научного центра хирургии (г. Москва) впервые в России разработана ДНК-диагностика

всех известных генетических вариантов заболевания.

В гене *PKP2* у четырех пациентов из трех неродственных семей были определены мутации: p.W538*, c.1523_1538del, p.S140F. Манифестация заболевания пришлась на четвертую-пятую декаду жизни. У пациентов отмечались синкопальные состояния, правожелудочковая экстрасистолия, устойчивая желудочковая тахикардия. ИКД имплантирован или рекомендован.

В гене *DSG2* у четырех пробандов из четырех неродственных семей были установлены миссенс-мутации: p.S194L, p.V533I, p.N245H, p.R49H и p.V158G. Манифестация заболевания пришлась на 3-ю декаду жизни. У данных пациентов отмечались устойчивая желудочковая тахикардия, гипертрофия ПЖ, выраженный фиброз и липоматоз. ИКД имплантирован или рекомендован.

У пациента 19 лет с достоверным диагнозом АКПЖ выявлен случай компаунд-гетерозигот (p.R49H и p.V158G) в гене *DSG2*. У пациента 26 лет обнаружена мутация p.S194L в гомозиготном состоянии в гене *DSG2*, что может служить результатом общего происхождения аллелей или делецией второго аллеля.

Диагноз АКПЖ для носителей мутаций методом ДНК-диагностики подтвержден. Частота выявления мутаций в выборке российских больных составила 23,3%.

Заключение

Были обнаружены восемь мутаций в двух генах, мутации в которых ответственны за две самые частые формы АКПЖ. Частота мутаций в выборке российских больных составила 23,3%, что ниже суммарной частоты мутаций в европейских выборках больных с АКПЖ. Мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания, составили 25% от всех выявленных мутаций. Результаты генетического обследования пациентов с АКПЖ и их родственников имели веское значение для верификации диагноза и определения тактики лечения.

ЛОМКость ХРОМОСОМ И НАРУШЕНИЯ РЕПЛИКАЦИИ ЛОКУСА *FMR1* У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ЛОМКой X-ХРОМОСОМЫ

Д.В. Юдкин^{1, 2}

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск

Ломкие сайты (ЛС) хромосом являются обычными элементами генома млекопитающих и человека. Они видны как разрывы или перетяжки на метафазных хромосомах. ЛС делятся на две группы: обычные ломкие сайты (ОЛС) и редкие ломкие сайты (РЛС). ОЛС встречаются на метафазных хромосомах всех индивидуумов, в то время как РЛС являются результатом мутации – экспансии повторов и у человека встречаются в 5% популяции. Ломкость хромосом проявляется при воздействии на клетки некоторых веществ, таких как 5-фтордезоксисуридин, бромдезоксисуридин, дистамицин А или афидиколин [1]. Большинство ОЛС индуцируются афидиколином – ингибитором ДНК-полимеразы α . Ранее было показано, что камптотетин – ингибитор топоизомеразы I, сни-

жает ломкость хромосом, индуцированную афидиколином. Было сделано предположение, что камптотетин, ингибируя плавление ДНК при репликации, не дает образовываться протяженным одноцепочечным участкам, которые являются потенциальной причиной ломкости хромосом [2]. Кроме того, указывалось, что, вероятно, ОЛС появляются в районах с низкой концентрацией оксидантов в условиях репликативного стресса [3].

Проведено исследование влияния камптотетина на ломкость хромосом в РЛС. Наиболее известным РЛС является FRAXA, локализованный в районе Xq27.3. Этот сайт сопряжен с синдромом ломкой X-хромосомы (СЛХ), который является наиболее распространенной причиной наследственной умственной

отсталости у человека. СЛХ и сайт FRAXA являются результатом экспансии повтора ЦГГ в промоторной области гена *FMR1*. У здорового человека размер этого повтора не превышает 55 единиц. Если размер повтора достигает 200 единиц, формируется мутантный аллель, появляется ломкий сайт и развивается СЛХ.

В ходе работы анализировали активацию репликации в 5'-промоторной области гена *FMR1* в культурах клеток пациентов с СЛХ и контрольных линиях клеток, в присутствии и в отсутствие 5-фтордезоксифторуидина. Было показано, что даже в отсутствие 5-фтордезоксифторуидина, в клеточных линиях пациентов наблюдаются проблемы репликации в районе ломкого сайта FRAXA. Была предложена модель, описывающая механизм возникновения

ломкого сайта FRAXA у пациентов с СЛХ. 5-фтордезоксифторуидин является ингибитором тимидилатсинтазы. При попадании в клетки он нарушает баланс нуклеотидов и тем самым ингибирует репликацию. В условиях репликативного стресса увеличенный ЦГГ повтор остается недореплицированным, и, таким образом, возникает ломкий сайт.

Литература

1. Durkin S., Glover T. Chromosome fragile sites // *Annu. Rev. Genet.* 2007. V. 41. P. 169–192.
2. Arit M., Glover T. Inhibition of topoisomerase I prevents chromosome breakage at common fragile sites // *DNA Repair.* 2010. V. 9, № 6. P. 678–689.
3. Ozeri-Galai E. et. al. Failure of origin activation in response to fork stalling leads to chromosomal instability at fragile sites // *Mol. Cell.* 2011. V. 43, № 1. P. 122–131.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| Предисловие | 3 |
| Степанов В.А., Назаренко Л.П., Рудко А.А., Пузырёв В.П. Достижения и перспективы Научно-исследовательского института медицинской генетики СО РАМН..... | 4 |
| Раздел 1. ОБЩИЕ ПРОБЛЕМЫ ЭВОЛЮЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ | 7 |
| Степанов В.А. Генетическое разнообразие популяций человека и проблемы эволюционной медицины | 7 |
| Кучер А.Н. Генетика многофакторных болезней (эволюционный аспект)..... | 17 |
| Кашеварова А.А., Скрябин Н.А., Лебедев И.Н. Эволюционные аспекты архитектуры генома человека и хромосомные болезни..... | 26 |
| Голубенко М.В. Митохондриальная генетика в контексте эволюционной медицины | 31 |
| Раздел 2. ЭВОЛЮЦИОННАЯ И ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА | 32 |
| Атраментова Л.А., Филиппова О.В., Кобец М.Н., Сивальнёва Д.О., Кобец Ю.Н. Этническая консолидация на Украине и ее роль в популяционных, медико-генетических и фармакогенетических исследованиях..... | 32 |
| Багашёв А.Н. Антропологическая дифференциация древних и современных популяций Северной Евразии | 35 |
| Вагайцева К.В., Харьков В.Н., Черпинская К.В., Хитринская И.Ю., Степанов В.А. Вариабельность X-сцепленных STR-маркеров в популяциях Евразии..... | 40 |
| Евсюков А.Н. Отбор по аллелям ARG48HIS гена алкогольдегидрогеназы ADH1B в популяциях Азии | 43 |
| Ельчинова Г.И., Иванов А.В., Зинченко Р.А. Территориальная эндогамия карачаевцев | 47 |
| Лавряшина М.Б., Ульянова М.В., Балаганская О.А., Толочко Т.А., Дружинин В.Г., Балановская Е.В. Отражение ассимиляционных процессов в структуре популяций коренного населения Республики Хакасия..... | 48 |
| Лузина Ф.А., Лотош О.Е., Харьков В.Н., Степанов В.А. Дифференциация и инбридинг телеутов по родовому составу и маркерам Y-хромосомы | 53 |
| Мустафаева Л.А., Козак Н.А. Витальные характеристики репродукции крымско-татарских женщин.. .. | 57 |
| Падюкова А.Д., Лавряшина М.Б., Кузнецова М.А., Жабугин М.К., Агджоян А.Т., Схляхо Р.А., Тычинских З.А., Балановская Е.В. Генетический портрет тоболо-иртышских сибирских татар по гаплогруппам Y-хромосомы..... | 59 |
| Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Эволюционные аспекты геномного импринтинга в репродукции человека и развитии центральной нервной системы | 61 |
| Сорокина И.Н. О возможности использования списков телефонных абонентов для оценки генетических соотношений среди населения Белгородской области..... | 67 |
| Степанова С.К., Сваровская М.Г., Марусин А.В., Сухомясова А.Л., Максимова Н.Р., Степанов В.А. Структура гаплотипов и возраст мутации в гене DMPK у якутов | 69 |
| Харьков В.Н., Степанов В.А. Эволюция и филогеография линий Y-хромосомы в популяциях Сибири... .. | 73 |
| Чередниченко А.А., Трифонова Е.А., Вагайцева К.В., Бочарова А.В., Степанов В.А. Корреляция полиморфных вариантов генов иммунного ответа в популяциях человека с климатическими и географическими факторами | 80 |
| Литвинов С.С., Трофимова Н.В., Юнусбаев Б.Б., Хусаинова Р.И., Ахметова В.Л., Хидиятова И.М., Виллемс Р., Хуснутдинова Э.К. Полногеномный анализ в изучении генетической структуры популяций Евразии..... | 84 |
| Раздел 3. ГЕНЕТИКА МНОГОФАКТОРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ И СЛОЖНОНАСЛЕДУЕМЫХ СОСТОЯНИЙ | 85 |
| Бабушкина Н.П., Кучер А.Н. Анализ неслучайности сочетания генотипов по полиморфным вариантам генов подверженности многофакторным заболеваниям | 85 |
| Бочарова А.В., Степанов В.А., Марусин А.В., Рудиков Е.В., Иванова С.А., Семке А.В., Бохан Н.А. Репликативное исследование подверженности к шизофрении в русской популяции | 92 |
| Брагина Е.Ю., Тийс Е.С., Фрейдин М.Б., Конева Л.А., Иванисенко В.А., Деменков П.С., Колчанов Н.А., Пузырёв В.П. К проблеме дистропии: туберкулез и бронхиальная астма | 96 |

| | |
|---|-----|
| Гараева А.Ф., Рудко А.А., Брагина Е.Ю., Фрейдлин М.Б., Бабушкина Н.П., Колоколова О.В., Липаенкова О.Н., Пузырёв В.П. Влияние полиморфных вариантов генов атипичных семейных микобактериозов на подверженность туберкулезу в сибирских популяциях | 101 |
| Гончарова И.А., Белобородова Е.В. Особенности экспрессии генов различных функциональных классов в зависимости от их структурного полиморфизма при хроническом вирусном гепатите С | 106 |
| Гончарова И.А., Тарасенко Н.В., Марков А.В. Масс-спектрометрический анализ полиморфизма генов, участвующих в процессах фиброгенеза при различных патологических состояниях человека | 109 |
| Кипень В.Н. Роль межгенных взаимодействий в формировании предрасположенности к раку молочной железы (на примере ключевых генов репарационных систем) | 115 |
| Кипень В.Н., Мельнов С.Б. Молекулярно-гистологическая характеристика опухолей молочной железы – вклад генов <i>XRCC1</i> , <i>XRCC3</i> и <i>PALB2</i> | 120 |
| Кривошей И.В., Жернакова Н.И. Полиморфизм генетических вариантов цитокинов и уровень артериального давления у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом | 127 |
| Лебедев И.Н. Современная евгеника и эпигенетические риски репродуктивной медицины | 129 |
| Марков А.В., Назаренко М.С. Метилирование ДНК и атеросклероз | 133 |
| Никитина Т.В., Саженова Е.А., Толмачева Е.Н., Кашеварова А.А., Суханова Н.Н., Лебедев И.Н. Привычное невынашивание беременности в свете эволюционных особенностей репродукции человека | 136 |
| Овчарова В.С. Изучение вовлеченности полиморфизма гена матричной металлопротеиназы-3 в развитии артериальной гипертензии и протеинурии у женщин с преэклампсией | 143 |
| Рыжкова А.В., Минина В.И., Баканова М.Л., Титов Р.А., Кулемин Ю.Е. Полиморфизм генов ферментов репарации двуниевых разрывов ДНК и гена <i>P53</i> у больных раком легкого и здоровых жителей кемеровской области | 145 |
| Скрябин Н.А., Денисов Е.В., Васильев С.А., Перельмутер В.М., Лебедев И.Н. Соматическая эволюция внутриопухолевой генетической гетерогенности при раке молочной железы | 148 |
| Слепцов А.А., Назаренко М.С. Соматическая изменчивость генома при атеросклерозе | 152 |
| Титов Р.А., Кулемин Ю.Е., Баканова М.Л., Минина В.И. Полиморфизм генов антиоксидантной системы и хромосомные аберрации у жителей Кузбасса, больных раком легкого | 155 |
| Толочко Т.А., Мейер А.В., Минина В.И., Мякишева С.Н. Характеристика полиморфизма генов репарации ДНК у детей и подростков с задержкой внутриутробного развития | 158 |
| Трифоновна Е.А., Сереброва В.Н., Габидулина Т.В., Бухарина И.Ю., Бутко Ю.К., Ворожищева А.Ю., Павлова К.К., Максимова Н.Р., Еремина Е.Р., Степанов В.А. Генетические факторы развития преэклампсии в популяциях различного этнического происхождения | 161 |
| Филипцова О.В., Тимошина И.А. Семейные и популяционные исследования пищевых предпочтений у населения Украины | 168 |
| Тезисы | 172 |
| Алтухова О.Б. Генетические факторы риска развития изолированного эндометриоза | 172 |
| Баранов В.С. Эпигенетический ландшафт и системная генетика эндометриоза и миомы матки | 173 |
| Бутов Д.А., Кужко М.М., Степаненко А.Л. Изменение уровня интерлейкина-2 под влиянием полиморфизма гена <i>IL-2</i> у больных с рецидивом туберкулеза легких | 173 |
| Бушуева О.Ю., Иванов В.П., Полоников А.В. Ассоциация полиморфизма 640A>G гена <i>СУВА</i> с риском развития ишемической болезни сердца в популяции русских жителей центральной России | 174 |
| Журавлева Л.В., Бутова Т.С. Полиморфизм гена рецептора андрогена <i>AR</i> у женщин с артериальной гипертензией и сахарным диабетом типа 2 в постменопаузе | 175 |
| Каганович Е.Н. Биоинформатический анализ генетических факторов риска развития преэклампсии | 175 |
| Киняшева К.О., Гареева А.Э., Хуснутдинова Э.К. Анализ ассоциации полиморфных локусов гена <i>GRM3</i> с развитием шизофрении у различных этнических групп из Республики Башкортостан | 176 |
| Кириленко М.Ю., Воронина Д.Г., Тикунова Е.В., Чурносоев М.И. Анализ ассоциаций полиморфных маркеров факторов роста с первичной открытоугольной глаукомой | 177 |
| Корогодина Т.В., Кудрявцева О.К., Сорокина М.В., Бушуева О.Ю. Исследование ассоциации полиморфных вариантов генов <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> и <i>GSTP1</i> с риском развития миомы матки в популяции центральной России | 178 |
| Кудрявцева А.В., Снежкина А.В., Садриддинова А.Ф., Дмитриев А.А., Мельникова Н.В., Славнова Е.Н. Изменение экспрессии генов, кодирующих ферменты гликолиза при раке молочной железы | 179 |
| Миланова С.Н. Изучение распределения частот генетических вариантов полиморфного маркера фактора некроза опухоли α у больных с инсультом | 179 |
| Москаленко М.И., Ефремова О.А. Генетический полиморфизм локусов $-1586C>T$ <i>MMP-2</i> и $-16125A/6A$ <i>MMP-3</i> у больных с инсультом | 180 |

| | |
|---|------------|
| Насибуллин Т.Р., Тимашева Я.Р., Эрдман В.В., Туктарова И.А., Мустафина О.Е. Анализ сочетаний полиморфных маркеров генов молекул адгезии и цитокинов как потенциальных предикторов инфаркта миокарда | 181 |
| Некпелова Е.В., Чурносоев М.И. Анализ генов-кандидатов, участвующих в формировании хронической болезни почек | 182 |
| Осиновская Н.С., Иващенко Т.Э., Султанов И.Ю., Беженарь В.Ф., Баранов В.С. Соматическая природа мутаций гена <i>MED-12</i> у женщин с миомой матки | 183 |
| Снежкина А.В., Садритдинова А.Ф., Дмитриев А.А., Мельникова Н.В., Кудрявцева А.В. Повышение экспрессии гена <i>NETO2</i> как молекулярный маркер светлоклеточного рака почки | 183 |
| Тарасенко Н.В., Гончарова И.А., Кучер А.Н., Марков А.В., Пузырёв В.П. Особенности структуры генетической подверженности к сахарному диабету типа 1 и сахарному диабету типа 2 | 184 |
| Фаттахов Н.С., Василенко М.А., Куликов Д.И., Скуратовская Д.А., Подунов А.Ю., Лаунерт Р.Д., Кучинская Н.Ю., Мурзаканова Д.А., Кириенкова Е.В., Затолокин П.А., Литвинова Л.С. Исследование ассоциации полиморфизма G894T гена эндотелиальной NO-синтазы с риском развития метаболического синдрома | 185 |
| Халюзова М.В., Литвяков Н.В., Исубакова Д.С., Альбах Е.Н., Сазонов А.Э., Карпов А.Б., Тахауов Р.М. Валидация результатов широкогоеномного исследования ассоциации полиморфных локусов с повышенной частотой маркеров радиационного воздействия | 185 |
| Черкашина О.В. О патогенетическом значении комбинации генетических вариантов -889C/T <i>IL-1A</i> , -511C/T <i>IL-1B</i> и -113 T/M <i>IL-9</i> при хроническом калькулезном холецистите | 186 |
| Шаймарданова Э.Х., Нургалиева А.Х., Валова Я.В., Гизатуллина А.А., Надыршина Д.Д., Габбасова Л.В., Курамшина О.А., Крюкова А.Я., Хидиятова И.М., Хуснутдинова Э.К. Роль полиморфных вариантов rs1799750 и rs484915 гена <i>MMP1</i> в развитии язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки в Республике Башкортостан | 187 |
| Шахтшнейдер Е.В., Рагино Ю.И., Максимов В.Н., Никитин Ю.П., Малютин С.К., Воевода М.И. Полиморфизм генов биогенеза липопротеинов высокой плотности в европеоидной популяции Сибири | 188 |
| Раздел 4. МЕДИЦИНСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА. МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ | 189 |
| Барбова Н.И. Особенности медико-генетического консультирования при муковисцидозе | 189 |
| Виноглядова С.В., Сорокина И.Н., Белозерова И.С., Порохина К.О. Анализ распространенности фенилкетонурии среди новорожденных Белгородской области | 193 |
| Еремينا Е.Р. Анализ работы медико-генетической службы в Республике Бурятия | 194 |
| Кузнецов А.А., Максимова Н.Р., Александров Г.Н., Смагулова С.А. Перспективы разработки новых биосенсорных тест-систем на основе оксида графена для ДНК-диагностики наследственных заболеваний | 197 |
| Никонов А.М., Чекрий О.В., Корзникова Е.А., Никонова В.А., Шипилов А.А., Плотникова О.В., Цыпченко О.В. Пренатальная диагностика на территории Алтайского края | 200 |
| Одинокоева О.Н., Назаренко Л.П. Анализ частоты и спектра мутаций гена <i>CFTR</i> при муковисцидозе по результатам неонатального скрининга в Томской области | 201 |
| Руднева С.А., Брагина Е.Е., Черных В.Б., Сорокина Т.М., Шилейко Л.В., Ермолаева С.А., Курило Л.Ф. Фрагментация ДНК сперматозоидов и мужское бесплодие | 205 |
| Салимбаева Д.Н. Популяционно-генетические особенности фенилкетонурии в Казахстане | 210 |
| Цыпченко О.В., Никонов А.М., Таскина Н.И., Сапкина М.Р., Афонина Т.А., Давыдова А.Н., Колесникова Т.М., Сероклинов В.Н., Шипилов А.А. Неонатальный скрининг на наследственные болезни обмена веществ на территории Алтайского края | 213 |
| Тезисы | 215 |
| Адян Т.А., Руденская Г.Е., Дадали Е.Л., Рыжкова О.П., Грознова О.С., Влодавец Д.В., Поляков А.В. Клинико-молекулярно-генетический анализ мышечной дистрофии Эмери-Дрейфуса | 215 |
| Близнец Е.А., Макиенко О.Н., Окунева Е.Г., Маркова Т.Г., Дибирова Х.Д., Балановский О.П., Поляков А.В. Популяционные особенности встречаемости протяженных делеций при несиндромальной тугоухости | 216 |
| Букаева А.А., Глазова О.В., Сабер С., Заклязьминская Е.В. Избирательная амплификация одного аллеля как механизм снижения точности ДНК-диагностики сердечных каналопатий | 216 |
| Воронин С.В., Воронина В.Г. Пренатальная диагностика хромосомных и моногенных болезней в Приморском крае | 217 |
| Гуткевич Е.В. Иерархическая система семейно-генетической превенции психических расстройств .. | 218 |
| Забненкова В.В., Артемьева С.Б., Руденская Г.Е., Дадали Е.Л., Поляков А.В. Точковые мутации в гене <i>SMN1</i> в российских семьях с проксимальной спинальной мышечной атрофией I-IV типа | 219 |

| | |
|--|-----|
| Иванова А.С., Гусева Л.В., Лапутин И.А., Юрченко Т.С., Ледовских И.О., Костенко Е.Б. Медико-генетическое консультирование ребенка после пересадки костного мозга..... | 220 |
| Линдина Л.И., Ботвиньева И.А., Герасименко О.Н., Сорокина И.В., Елесина Ю.Ю., Алексеева М.Г., Полукаров А.Н. Цитогенетические исследования в пренатальной диагностике первого триместра беременности в г. Новокузнецке и на юге Кузбасса..... | 220 |
| Миловидова Т.Б., Дадали Е.Л., Руденская Г.Е., Поляков А.В. Молекулярно-генетическая диагностика и частота врожденной мерозин-негативной мышечной дистрофии в России..... | 221 |
| Михайлов В.С., Глазова О.В., Коталевская Ю.Ю., Заклязьминская Е.В. Разработка и внедрение прямой ДНК-диагностики буллезного эпидермолиза | 222 |
| Новожицына А.Н., Егорова И.Р., Сухомясова А.Л., Максимова Н.Р. Пороки развития органов мочевой системы в Республике Саха (Якутия)..... | 222 |
| Поляк М.Е., Заклязьминская Е.В., Голивец Л.Т., Благова О.В., Подоляк Д.Г., Дземешкевич С.Л. Два случая болезни Фабри, выявленные среди пациентов с гипертрофической кардиомиопатией. | 223 |
| Поляк М.Е., Макаров Л.М., Яковлева М.В., Поляков А.В., Заклязьминская Е.В. Спектр мутаций в гене <i>KCNQ1</i> у российских пациентов с синдромом удлинённого интервала QT | 224 |
| Полякова Д.А., Рыжкова О.П., Забненкова В.В., Комарова Н.В., Поляков А.В. Аутосомно-рецессивные формы в выборке девочек с направляющим диагнозом «мышечная дистрофия Дюшенна–Беккера» | 225 |
| Рогожина Ю.А., Румянцева В.А., Заклязьминская Е.В. Молекулярно-генетические аспекты синдрома Марфана | 225 |
| Рыжкова О.П., Комарова Н.В., Логинова А.Н., Поляков А.В. Создание системы детекции точковых мутаций в гене дистрофина на основе NGS..... | 226 |
| Черных В.Б. Гоносомный мозаицизм и нарушение репродукции у человека..... | 227 |
| Чухрова А.Л., Бескорвайная Т.С., Черных В.Б., Поляков А.В. Молекулярный анализ гоносомных аномалий методом мультиплексной QF-PCR..... | 228 |
| Шестак А.Г., Благова О.В., Носкова М.В., Фролова Ю.В., Дземешкевич С.Л., Заклязьминская Е.В. Спектр мутаций в генах <i>PKP2</i> и <i>DSG2</i> у больных с аритмогенной кардиомиопатией правого желудочка..... | 228 |
| Юдкин Д.В. Ломкость хромосом и нарушения репликации локуса <i>FMR1</i> у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы..... | 229 |