

Раздел 4

ОНКОГЕНЕТИКА

РОЛЬ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА RS28362491 В ГЕНЕ *NFKB1* В ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ЯИЧНИКОВ У ЖЕНЩИН ИЗ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

А.Ф. Айбулатова, Д.С. Прокофьева

Башкирский государственный университет, г. Уфа

Несмотря на значительное улучшение показателей выживаемости за последние 20–30 лет, рак яичников (РЯ) до сих пор остается одной из ведущих причин смерти от онкологических заболеваний у женщин. Данная патология, как правило, диагностируется на самых последних стадиях и поэтому характеризуется очень высоким показателем летальности. При этом, по данным статистики, только от 5 до 15% от всех случаев РЯ имеют наследственную природу, то есть обусловлены генетическим дефектом [1].

Ген *NFKB1* кодирует ядерный транскрипционный фактор NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Транскрипционный фактор NF-κB может запускаться активными формами кислорода и УФ-излучением. В норме активность сигнального пути NF-κB в клетке находится под строгим контролем, однако мутации различных генов могут стать причиной его конститутивной активации [2]. В промоторной области гена *NFKB1* находится полиморфный вариант rs28362491 (-94 insertion/deletion (I/D) ATTG), оказывающий значительное влияние на его экспрессию.

Цель исследования – оценить роль полиморфного локуса rs28362491 (-94 insertion/deletion (I/D) ATTG) в гене *NFKB1* в развитии рака яичников у женщин из Республики Башкортостан.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК двух групп женщин: больных злокачественными новообразованиями яичников ($n = 286$) и контрольной ($n = 327$). Образцы ДНК выделяли методом фенольно-хлороформной экстракции. Изучение ID полиморфизма гена *NFKB1* проводили с помощью полимеразной цепной реакции с последую-

ющим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Результаты

Среди здоровых женщин генотип II встречается с частотой 28,1%, ID – 46%, DD – 25%. В группе больных РЯ генотип II был выявлен у 20,6% женщин, генотип ID – у 58,8% и DD – у 20,6%. При сравнительном анализе частот аллелей и генотипов между группами больных раком яичников и контролем было показано, что гомозиготный генотип II обладает протективным свойством в отношении риска развития изучаемого заболевания в общей и доминантной моделях наследования: $OR = 0,66$, 95% CI : 0,45–0,96, $p = 0,009$ и $p = 0,03$ соответственно. В недавнем исследовании W Fu. с соавт. [3] было показано, что делеция четырех нуклеотидов ATTG в промоторной области гена *NFKB1* ассоциирована с пониженным риском развития РЯ ($OR = 0,75$, 95% CI : 0,64–0,87) [3]. Наши результаты не согласуются с выводами, полученными в указанном исследовании, что может быть связано с различиями частот аллелей и генотипов между разными популяциями и регионами мира.

Полученные в ходе данной работы результаты свидетельствуют об ассоциации генотипа II полиморфного локуса rs28362491 гена *NFKB1* с пониженным риском развития РЯ у женщин из Республики Башкортостан.

Литература

1. Baldwin A.S. Jr. Series introduction: the transcription factor NF-κappaB and human disease // J ClinInvest. 2001. V. 107. P. 3–6.
2. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2016 // CA Cancer J. Clin. 2016. V. 66. P. 7–30.
3. Fu W., Zhuo Z.J., Chen Y.C. et al. *NFKB1* -94 insertion/deletion ATTG polymorphism and cancer risk: evidence from 50 case-control studies // Oncotarget. 2017. V. 8 (6). P. 9806–9822.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ АНТИНЕОПЛАСТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МЕТФОРМИНА В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

И.А. Ануфрак¹, Т.В. Саприна¹, А.Л. Чернышова²

¹ Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск

² НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

Фенотипические особенности, предрасположенность к заболеваниям, ответ на проводимое лечение

зависят от генетических особенностей организма. Целью данного исследования является изучение

механизмов влияния метформина как антинеопластического препарата с учетом генетических особенностей организма.

По данным Всемирной организации здравоохранения на 2013 г., рак тела матки занимает шестое место по распространенности рака у женщин в мире (почти 5% всех случаев рака у женщин). В 2013 г. было зарегистрировано 320 тыс. новых случаев заболевания раком эндометрия, смертность от данной патологии составила 76 тыс. случаев. Примерно 2/3 случаев заболевания рака тела матки происходит в странах с высоким уровнем экономического развития. Показатели заболеваемости повышены в Северной и Восточной Европе, Северной Америке, значительно ниже – в Африке и Западной Азии [1].

Тотальное гипометилирование генома является характерной чертой старения организма. При канцерогенезе происходят разнонаправленные процессы: на фоне тотального гипометилирования ДНК регистрируется гиперметилирование отдельных участков промоторов генов, что в конечном итоге повышает риск возникновения рака [2].

S-аденозилметионин (SAM) является одним из ключевых компонентов процесса метилирования ДНК, он служит источником метильных групп для осуществления данного процесса. Цикл, в котором задействован SAM, представляет собой последовательное превращение S-аденозилгомоцистеина (SAH) в гомоцистеин, метионин, SAM. Уровень SAM в организме может изменяться и при недостатке фолиевой кислоты, что является фактором риска развития рака [3]. Фолиевая кислота участвует в образовании метионина из гомоцистеина с последующим образованием SAM. Ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты играет метилентетрагидрофолатредуктаза, кодируемая геном *MTHFR*; полиморфизм этого гена может определять функциональные особенности фермента, что, в свою очередь, может сказываться на характере метилирования ДНК.

Метформин является одним из наиболее часто используемых препаратов для лечения сахарного диабета 2-го типа. Антигипергликемическое действие метформина реализуется за счет уменьшения продукции глюкозы печенью, активации гликолиза, снижения инсулинорезистентности мышечной и жировой тканей. В последние годы появились данные о том, что этот препарат может быть эффективен и как препарат с антинеопластическим действием. Существуют исследования, показывающие влияние

метформина на метилирование ДНК. Таким образом, метформин может опосредованно влиять на выживаемость раковых клеток [4].

В исследовании T. Zhong, Y. Men [4] приводится модель метформин-индуцированного, H19-опосредованного изменения метилирования генома в раковых клетках: опытным путем показано, что действие метформина на раковые клетки эндометрия (*in vitro*) приводит к активации аденозинмонофосфаткиназы и одновременно увеличивает образование let7 в раковых клетках; вместе с ростом уровня let7 наблюдается снижение H19, результатом чего является активация S-аденозингомоцистеингидролазы (SAHN) вследствие освобождения ее от ингибирующего влияния H19. Авторы указанной работы сообщают, что метформин снижает подвижность, инвазивность и пролиферацию раковых клеток эндометрия и яичников, отчасти за счет снижения продукции H19 [4]. Активация SAHN имеет прямой и косвенный эффекты: облегчение метилирования ДНК при помощи DNMT3β (прямой эффект), а также метилирование белков, регулирующих структуру хроматина, которое может влиять на метилирование ДНК (косвенный эффект) [4, 5].

Гипотеза состоит в том, что результатом применения метформина будет облегчение метилирования ДНК, что снизит риск возникновения и прогрессирования раковых процессов. В связи с вышесказанным перспективным представляется дальнейшее исследование эффектов метформина на течение рака с учетом определенных полиморфизмов генов *SAHN*, *H19*, *MTHFR*.

Литература

1. Stewart B.W., Wild C.P. Cancers of the female reproductive organs // World Cancer Report. 2014. P. 465–481.
2. Шуматова Т.А., Приходченко Н.Г., Оденбах Л.А., Ефремова И.В. Роль метилирования ДНК и состояния фолатного обмена в развитии патологических процессов в организме человека // Тихоокеанский медицинский журнал. 2013. № 4. С. 39–43.
3. Liew S.C., Gupta E.D. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases // Eur. J. Med. Genet. 2015. V. 58. P. 1–10.
4. Zhong T., Men Y. Metformin alters DNA methylation genome-wide via the H19/SAHN axis // Oncogene. 2016. P. 1–10.
5. Zhou J., Yang L., Zhong T. et al. H19 lncRNA alters DNA methylation genome wide by regulating S-adenosylhomocysteine hydrolase // Nat. Commun. 2015. V. 6. P. 10221.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

М.Л. Баканова¹, В.И. Минина^{1,2}, А.А. Тимофеева¹, Т.А. Головина^{1,2}, Я.А. Савченко¹,
А.В. Рыжкова¹, Р.А. Титов¹, М.А. Асанов¹, В.А. Титов³, И.А. Вафин⁴

¹ Институт экологии человека Федерального исследовательского центра угля и углекислоты СО РАН, г. Кемерово

² Кемеровский государственный университет, г. Кемерово

³ Областной клинический онкологический диспансер, г. Кемерово

⁴ Кемеровский областной центр крови, г. Кемерово

Рак легкого (РЛ) – широко распространенная форма злокачественных новообразований и одна из важнейших медицинских и социально-экономи-

ческих проблем. Известно, что риск РЛ существенно возрастает при воздействии канцерогенных веществ, поступающих в организм человека из окру-

жающей среды. Частота спонтанных хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах периферической крови человека – одна из наиболее частых форм генетических аномалий, вызванных мутагенным воздействием факторов окружающей среды [1]. Ввиду высокой концентрации предприятий угледобывающего и перерабатывающего комплекса на территории Кемеровской области актуальным исследованием является анализ цитогенетических нарушений у больных РЛ Кемеровской области.

Материалы и методы

Обследован 891 житель Кемеровской области, из которых 441 человек (379 мужчин, 62 женщины, 354 курящих, 87 некурящих, средний возраст – 59,7 лет) – больные РЛ, поступившие на лечение в Кемеровский областной онкологический диспансер. До забора крови для цитогенетического исследования больные не получали химиотерапевтического или радиологического лечения и составили исследуемую группу. 450 человек (338 мужчин, 112 женщин, 209 курящих, 241 некурящих, средний возраст – 50,2 лет) – это доноры Кемеровского областного центра крови, которые к моменту сбора материала были здоровы, не имели хронических заболеваний, не принимали лекарственных препаратов, в течение трех месяцев до начала исследования не подвергались рентгенологическим обследованиям и составили группу сравнения. Все обследованные доноры подписывали форму информированного согласия на участие в исследовании.

Материалом для исследования послужила цельная периферическая кровь, забиравшаяся из локтевой вены в асептических условиях. Культивирование лимфоцитов крови для получения препаратов хромосом осуществляли по стандартному полумикрометоду [2]. Отбор метафаз, включаемых в анализ, и критерии для регистрации цитогенетических нарушений соответствовали общепринятым рекомендациям [3].

Статистическая обработка материала проводилась с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Для цитогенетических показателей рассчитывали средние значения (M), выборочное стандартное отклонение (STD). Распределение всех использованных показателей сравнивалось с нормальным методом Колмогорова–Смирнова. По результатам анализа установлено, что распределение значений частоты ХА отличалось от нормального. На основании этого в дальнейшем для сравнения групп использовали ранговый U -тест Манна–Уитни.

Результаты

В результате проведенного исследования установлено, что средняя частота ХА у больных РЛ была равна $3,02 \pm 1,95\%$, что значимо выше, чем в группе сравнения – $2,05 \pm 1,83\%$ ($p = 0,000001$); такая ситуация наблюдалась как по уровню aberrаций хроматидного типа ($2,11 \pm 1,55\%$ против $1,64 \pm 1,59\%$; $p = 0,000001$), так и по уровню aberrаций хромосомного типа ($0,98 \pm 1,38\%$ против $0,42 \pm 0,70\%$; $p = 0,000001$). Таким образом, ХА регистрируются у больных РЛ статистически значимо чаще, чем у здоровых.

Анализ уровня ХА обследованных в зависимости от пола и курения также выявил значимые отличия: у мужчин ($3,01 \pm 1,94\%$ против $2,02 \pm 1,88\%$; $p = 0,000001$), у женщин ($3,05 \pm 2,08\%$ против $2,15 \pm 1,66\%$; $p = 0,007832$), у курящих ($3,07 \pm 1,95\%$ против $2,13 \pm 1,82\%$; $p = 0,000001$), у некурящих ($2,80 \pm 1,96\%$ против $1,96 \pm 1,83\%$; $p = 0,000139$). Превышенный уровень ХА в лимфоцитах периферической крови онкобольных может отражать индивидуальную чувствительность к воздействию генотоксических веществ различного происхождения и, по мнению ряда авторов, служит предиктором злокачественного процесса [4, 5].

Кроме того, в нашей выборке был зарегистрирован феномен появления в культуре лимфоцитов больных раком легкого метафаз, «нагруженных» aberrациями хромосомного типа: парными фрагментами, транслокациями, дицентрическими, полицентрическими и кольцевыми хромосомами. В мировой литературе такие мультиаберрантные клетки известны под названием Rogue cells (RC) [6].

Типичный фенотип RC был диагностирован в 8 случаях больных РЛ с частотой $0,00383 \pm 0,04\%$. Максимальное количество aberrаций, зарегистрированное в одной клетке, было 35: трицентрических хромосом – 6, дицентрических хромосом – 7, атипичных моноцентриков – 2, парных фрагментов – 20. Все носителей RC – курящие мужчины в возрасте от 54 до 67 лет, больные немелкоклеточной формой РЛ.

Феномен RC изучен слабо. Одной из причин возникновения этого цитогенетического явления может являться плотноионизирующее излучение, создаваемое альфа-частицами, попадающими в организм человека в результате вдыхания радиоактивного газа радона [6]. Радиационное воздействие рассматривается также как фактор риска развития онкопатологии легких [7], а территория Кемеровской области относится к категории опасных по радону и продуктам его распада, согласно данным геофизического районирования [8]. Другую возможную причину индукции RC связывают с инфекционным фактором, таким как вирус полиомы (JCV, BKV) [9, 10]. Не стоит также исключать влияния на формирование RC процессов злокачественной трансформации в организме.

Таким образом, дальнейшие исследования в этом направлении позволят расширить представления о причинах возникновения RC у больных РЛ и установить возможную биомедицинскую роль этого явления.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-15-00034.

Литература

1. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н., Катосова Л.Д. и др. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Генетика. 2001. Т. 37, № 4. С. 549–557.
2. Hungerford P.A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // Stain Techn. 1965. V. 40. P. 333–338.

3. *Bucton K.E., Evans H.J.* Methods for the analysis of human chromosome aberrations // WHO. Geneva, 1993. 66 p.
4. *Vodicka P., Polivkova Z., Sytarova S. et al.* Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of newly diagnosed cancer patients and healthy controls // *Carcinogenesis*. 2010. V. 31. P. 1238–1241.
5. *Vodenkova S., Polivkova Z., Musak L. et al.* Structural chromosomal aberrations as potential risk markers in incident cancer patients // *Mutagenesis*. 2015. V. 30 (4). P. 557–563.
6. *Awa A.A., Neel J.V.* Cytogenetic 'rogue' cells: what is their frequency, origin, and evolutionary significance? // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1986. V. 83. P. 1021–1025.
7. *Darby S., Hill D., Doll R.* Radon: a likely carcinogen at all exposures // *Annals of Oncology*. 2001. V. 12 (10). P. 1341–1351.
8. *Smyslov A.A., Maksimovskiy V.A., Harlamov M.G.* Radon in earth crust and risk of dangerous from radon // *Razvedka i ohrana nedr*. 1995. V. 5. P. 45–53.
9. *Lazutka J.R., Neel J.V., Major E.O. et al.* High titers of antibodies to two human polyomaviruses, JCV and BKV, correlate with increased frequency of chromosomal damage in human lymphocytes // *Cancer Lett*. 1996. V. 109. P. 177–183.
10. *Neel J.V., Major E.O., Awa A.A. et al.* Hypothesis: Rogue cell-type chromosomal damage in lymphocytes is associated with infection with the JC human polyoma virus and has implications for oncogenesis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 2690–2695.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА -1607 1G/2G (RS1799750) ГЕНА *MMP1* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ МИОМЫ МАТКИ У РУССКИХ ЖЕНЩИН ЦЕНТРАЛЬНОЙ РОССИИ

Е.М. Барышева, А.С. Барышев, О.Б. Полшведкина, О.К. Кудрявцева, О.Ю. Бушуева

Курский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Курск

Миома матки (ММ) представляет собой моноклональную опухоль, происходящую из незрелых мышечных или соединительнотканых клеток. Несмотря на доброкачественный характер образования, оно сопровождается неблагоприятной клинической симптоматикой, включающей такие тяжелые осложнения, как некроз миоматозных узлов, аномальные маточные кровотечения, бесплодие и нарушение функции тазовых органов. Высокая распространенность ММ и ее негативное влияние на здоровье женщины объясняют актуальность изучения данного заболевания [1]. С точки зрения генетики ММ является мультифакториальным заболеванием, в основе развития которого лежат генетические и средовые факторы риска [2]. Известно, что структурная вариабельность ряда генов, регулирующих процессы клеточного роста, дифференциации и пролиферации клеток, играет ключевую роль в формировании предрасположенности к ММ. Среди возможных генов-кандидатов развития ММ могут выступать гены, кодирующие матриксные металлопротеиназы (MMPs). Данные эндопептидазы участвуют в remodelировании экстрацеллюлярного матрикса [3]. *MMP1* – одна из наиболее важных представителей семейства MMPs; она инициирует первичную деградацию коллагеновых фибрилл, что является необходимым условием формирования новых сосудов [4]. Также известно, что MMPs регулируют действия многих ростовых факторов вследствие высвобождения активных метаболитов в процессе разрушения соединительной ткани [5]. Наследование гиперактивного аллеля 2G гена *MMP1* способствует развитию некоторых онкологических заболеваний [6].

Целью нашего исследования явилось изучение ассоциации полиморфизма -1607 1G/2G (rs1799750) гена *MMP1* с риском развития ММ у русских женщин Центральной России.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК неродственных женщин русской национальности, проживающих в Курской области, общей численностью 548 человек.

Всего были обследованы 327 пациенток с диагнозом ММ, находившихся на стационарном лечении в отделении оперативной гинекологии Курского областного перинатального центра и отделении оперативной гинекологии Курского городского клинического родильного дома в период с 2010 по 2014 г. Контрольную группу составила 221 относительно здоровая женщина соответствующего возраста без доброкачественных и злокачественных новообразований в анамнезе, а также без клинических и УЗИ признаков ММ.

Для проведения молекулярно-генетического исследования у всех обследуемых производился забор венозной крови. Выделение геномной ДНК осуществляли из размороженной венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. В рамках исследования проводилось генотипирование полиморфизма -1607 1G/2G (rs1799750) гена *MMP1* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) с использованием праймеров и зондов, синтезированных компанией «Синтол» (г. Москва). Повторное генотипирование 10% случайно выбранных образцов показало 100%-ю воспроизводимость полученных результатов.

Для оценки ассоциаций аллелей и генотипов с риском развития ММ использовали критерий χ^2 и отношение шансов (OR) с 95%-м доверительным интервалом (95% CI). Значения $p < 0,05$ рассматривались как статистически значимые. Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере с использованием программных пакетов Statistica 8.0 (StatSoft, США) и MS Excel 2010.

Результаты

Как видно из данных таблицы, мы не обнаружили статистически значимых различий между группами больных и здоровых. Проведенный нами анализ ассоциации полиморфизма -1607 2G/1G (rs1799750) гена *MMP1* не позволил установить связь данного локуса с риском развития ММ в популяции русских женщин Центрального Черноземья. Однако иссле-

дования, проведенные в других популяциях, демонстрируют обратные результаты. Так, Е.Б. Морозова и соавт. при исследовании женщин г. Санкт-Петербур

бурга установили, что наследование гомозиготного генотипа 2G2G способствует быстрому росту узлов, а также развитию многоузловой ММ [7].

Распределение аллелей и генотипов -1607 1G/2G (rs1799750) гена *MMP1* у пациентов с ММ и здоровых лиц

Аллели, генотипы		Больные ММ, общая группа (n = 327) n (%) ¹	Контрольная группа (n = 221) n (%) ¹	χ^2 (p) ²	OR (95% CI) ³
Аллели	1G	0,503	0,464	1,63 (0,20)	0,85 (0,67–1,09)
	2G	0,497	0,536		
Генотипы	1G1G	85 (26,0)	48 (21,7)	1,31 (0,25)	0,79 (0,53–1,18) 0,97 (0,69–1,37)
	1G2G	159 (48,6)	109 (49,3)	0,03 (0,87)	
	2G2G	83 (25,4)	64 (29,0)	0,86 (0,35)	

¹ абсолютное число и доля лиц с исследуемым генотипом, %; ² хи-квадрат и *p* – уровень значимости (число степеней свободы *df* = 1); ³ отношение шансов с 95%-ми доверительными интервалами; * отмечены статистически значимые различия между группами.

Таким образом, можно сделать вывод о необходимости проведения дополнительных исследований в других популяциях для подтверждения вовлеченности данного полиморфизма в этиопатогенез ММ.

Литература

1. Flake G.P., Andersen J., Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review // *Environmental health perspectives*. 2003. V. 111, № 8. P. 1037.
2. Мериакри А.В. Эпидемиология и патогенез миомы матки // *Сибирский медицинский журнал*. 1997. Т. 13, № 2. С. 8–13.
3. Соловьева Н.И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции // *Биоорганическая химия*. 1998. Т. 24, № 4. С. 245–255.
4. Потеряева О.Н. Матриксные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний обзор литературы // *Медицина и образование в Сибири*. 2010. № 5.
5. Sternlicht M.D., Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior // *Annual review of cell and developmental biology*. 2001. V. 17, № 1. P. 463–516.
6. Olejniczak I., Fendler W., Borowiec M. et al. Polimorfizm genów metaloproteinaz MMP-1 i MMP-2 w ocenie predyspozycji do zachorowania na raka krtani // *Otolaryngologia Polska*. 2012. V. 66, № 4. P. 30–35.
7. Морозова Е.Б., Чухловин А.Б., Кулагина Н.В., Тоголян А.А. Значимость генного полиморфизма в прогнозе развития и тактике ведения пациенток с миомой матки и аденомиозом // *Журнал акушерства и женских болезней*. 2005. Т. 54, № 3. С. 54–59.

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ В ГЕНАХ МИРНК И РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.А. Бермишева, З.Р. Тахирова, Э.К. Хуснутдинова

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

В качестве эпигенетических регуляторов миРНК играют ключевую роль в прогрессии опухолей [1]. Однонуклеотидные полиморфные варианты как в генах самих миРНК, генах-мишенях, так и в генах-участниках процессинга малых РНК могут существенно влиять на регуляторную функцию миРНК [2].

Рак молочной железы (РМЖ) является одним из наиболее часто встречающихся онкологических заболеваний у женщин во всем мире. Важная роль миРНК в патогенезе РМЖ доказана многочисленными исследованиями [3, 4]. В клетках опухоли изменение экспрессии миРНК может происходить в результате нарушений, возникающих как на уровне транскрипции генов миРНК, по механизмам, общим с генами, кодирующими белки, так и на уровне миРНК специфичного процессинга [3].

В ряде исследований было показано, что полиморфный вариант rs11671784 (n.36C>T) влияет на изменение экспрессии миРНК-27a [5]. В работе В. Song с соавт. [6] выявлено, что rs11671784 ассоциирован с низким риском развития рака у китайцев: OR = 0,71, 95% CI: 0,55–0,91. Также установлено, что высокий уровень экспрессии микроРНК-27a свя-

зан с устойчивостью клеток к химиотерапии, метастазированием и, как следствие, с плохим прогнозом выживания больных.

Потеря экспрессии миРНК-140 ассоциирована с развитием дуктальной карциномы *in situ* (DCIS) молочных желез. Также показано, что миРНК-140 вовлечена в патогенез колоректального рака, рака яичников, рака легкого [7]. О роли полиморфного варианта rs7205289 в развитии онкологических заболеваний известно недостаточно, но установлено, что локус rs7205289 ассоциирован с риском развития синдрома заячьего нёба. У детей с генотипами СА и АА полиморфного варианта rs7205289, подвергшихся воздействию пассивного курения матери во время беременности, выявлены признаки синергичного действия на развитие патологии за счет снижения уровня экспрессии микроРНК-140 [8]. В то же время в семьях, где у ребенка подтвержден синдром заячьей губы, у родителей риск развития РМЖ повышен [9].

Снижение уровня экспрессии миРНК-125a наблюдается при раке молочной железы, желудка, яичников. Редкий полиморфный вариант rs1297533 (G>T) в гене миРНК-125a ассоциирован с РМЖ.

Показано, что аллель Т блокирует процессинг пре-микроРНК в предшественник миРНК [10].

Цель исследования – оценка ассоциации полиморфных вариантов rs11671784 в гене миРНК-27а, rs7205289 в гене миРНК-140, rs1297533 в гене миРНК-125а с риском развития РМЖ у женщин из Республики Башкортостан.

Материалы и методы

В работе использованы образцы ДНК, выделенные из венозной крови пациенток с РМЖ и контрольной выборки. Материал собран на базе РКОД ГБУЗ (г. Уфа) и ГБУЗ РБ КБ № 1 (г. Стерлитамак) за период 2007–2013 гг. Средний возраст пациенток с РМЖ со-

ставляет 52,2 года. Контрольная группа представлена женщинами без онкологической патологии на момент забора крови. Генотипирование проводилось методом дискриминации аллелей *Taqman* (BioRad CFX96).

Генотипирование трех полиморфных локусов (rs11671784, rs 7205289, rs12975333) в генах предшественников миРНК проведено на выборке 539 больных РМЖ и 557 женщин из контрольной группы.

Результаты

Частоты аллелей и генотипов изученных полиморфных локусов представлены в таблице.

Распределение частот аллелей и генотипов по изученным полиморфным локусам у больных РМЖ и в контрольной группе

SNP	Генотип, аллель	Больные РМЖ, n (частота, %)	Контроль, n (частота, %)	χ^2	<i>p</i>
rs11671784	GG	523 (97,94)	537 (97,11)	0	1
	AG	9 (1,69)	13 (2,35)		
	AA	2 (0,37)	3 (0,54)		
	G	1055 (98,78)	1087 (98,28)	0	1
	A	13 (1,22)	1,72 (19)		
rs 7205289	CC	537 (99,63)	555 (99,64)	0	1
	AC	2 (0,37)	2 (0,36)		
	AA	0	0		
	C	1076 (99,81)	1112 (99,82)	0	1
	A	2 (0,19)	2 (0,18)		
rs12975333	GG	531 (100)	555 (100)		
	GT	0	0		
	TT	0	0		
	G	1062	1110		
	T	0	0		

Примечание. *n* – наблюдаемая численность соответствующих генотипов (аллелей); χ^2 -критерий использован для сравнения распределения генотипов (аллелей) между выборкой больных РМЖ и контрольной группой; *p* – достигнутый уровень статистической значимости.

В нашем исследовании в результате сравнительного анализа частот аллелей и генотипов полиморфных локусов rs11671784 и rs7205289 в генах миРНК-27а и миРНК-140 между больными РМЖ и здоровыми индивидами статистически значимых различий не обнаружено (*p* > 0,05). Локус rs12975333 не показал вариативности в нашей популяции, выявлен только аллель G.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 17-44-020498.

Литература

- Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell*. 2004. V. 116. P. 281–297.
- Sun G., Yan J., Noltner K. et al. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function // *RNA*. 2009. V. 15. P. 1640–1651.
- Киселев Ф.Л. МикроРНК и рак // *Молекулярная биология*. 2014. Т. 48. С. 232–242.
- Lo P.-K., Wolfson B., Zhou X. et al. Noncoding RNAs in breast cancer // *Briefings in Functional Genomics*. 2016. V. 15. P. 200–221.
- Sun Q., Gu H., Zeng Y. et al. Has-mir-27a genetic variant contributes to gastric cancer susceptibility through affecting miR-27a and target gene expression // *Cancer science*. 2010. V. 101. P. 2241–2247.
- Song B., Yan G., Hao H. et al. rs11671784 G/A and rs895819 A/G polymorphisms inversely affect gastric cancer susceptibility and miR-27a expression in a Chinese population // *Medical science monitor*. 2014. V. 20. P. 2318.
- Zhang Y. MiR-140 in cancer and beyond: a brief update // *J. of Solid Tum*. 2013. V. 3. P. 38–47.
- Li L., Zhu G.Q., Meng T. et al. Biological and epidemiological evidence of interaction of infant genotypes at rs7205289 and maternal passive smoking in cleft palate // *Am. J. Med. Genet. Part A*. 2011. V. 155. P. 2940–2948.
- Ahmed M.K., Bui A.H., Taioli E. Epidemiology of Cleft Lip and Palate. 2017. DOI: 10.5772/67165.
- Peterlongo P., Caleca L., Cattaneo E. et al. The rs12975333 variant in the miR-125a and breast cancer risk in Germany, Italy, Australia and Spain // *J. Med. Genet*. 2011. V. 48. P. 703–704.

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ RS7517847 И RS10889677 В ГЕНЕ *IL23R* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РАКА ЯИЧНИКОВ

Е.И. Владимирова, Э.Т. Мингажева, Д.С. Прокофьева

Башкирский государственный университет, г. Уфа

Рак яичников (РЯ) является одним из самых распространенных гинекологических злокачественных заболеваний. Из-за недостатка специфических симптомов и отсутствия эффективного метода скрининга большинство опухолей яичников диагностируется на поздних стадиях развития, после того как опухоль распространилась за пределы яичника. Уровень 5-летней выживаемости не превышает 45% для случаев, выявленных на поздних стадиях, поэтому развитие ранней диагностики необходимо для снижения смертности от данной патологии.

Рак яичников является многофакторным заболеванием, в формировании которого важную роль играет генетическая предрасположенность. В частности, с высоким риском развития рака яичников ассоциированы гены *BRCA1/2*. Однако мутации в данных генах определяют лишь 15% всех случаев заболевания. В последнее время при изучении молекулярной основы рака яичников особое внимание уделяется роли иммунной системы. Одним из генов-кандидатов, ассоциированных с развитием РЯ, выступает ген *IL23R* (рецептор интерлейкина-23). Белок, кодируемый этим геном, является субъединицей рецептора *IL23A/IL23*. Существуют исследования, доказывающие роль *IL23R* и *IL23* в воспалительных процессах, опосредованных Т-хелперами 17-го типа, а также в патогенезе нескольких видов рака. В опухолевом микроокружении в регуляторных Т-клетках *IL23R* может способствовать их иммуносупрессивной функции, облегчению уклонения раковых клеток от воздействия иммунной системы [1].

Цель исследования – провести анализ ассоциации полиморфных локусов rs7517847 и rs10889677 в гене *IL23R* с риском развития рака яичников у женщин из Республики Башкортостан.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК двух групп женщин: контрольной ($n = 228$) и больных с диагнозом «рак яичников» ($n = 286$). Выделение ДНК из периферической крови проводили методом последовательной фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование по-

лиморфных локусов rs7517847 и rs10889677 в гене *IL23R* осуществляли методом ПЦР-ПДРФ-анализа.

Результаты

При сравнении выборки больных и контрольной группы была обнаружена ассоциация аллеля С полиморфного варианта rs10889677 в гене *IL23R* с повышенным риском развития РЯ: $OR = 1,51$, 95% CI : 1,17–1,95, $p = 0,001$. Также была выявлена ассоциация гомозиготного генотипа СС с повышенным риском развития заболевания: $OR = 1,83$, 95% CI : 1,26–2,64, $p = 0,003$. Данная однонуклеотидная замена приводит к увеличению сродства с микроРНК *let-7f*, способствуя высокой транскрипции гена *IL23R* как *in vitro*, так и *in vivo*. Согласно литературным данным, для лиц с генотипом СС характерна более высокая пролиферация Т-клеток и более низкая – регуляторных Т-клеток, чем для лиц с генотипом АА. Результаты, аналогичные нашим, были представлены в исследовании Z. Zhang с соавт. [2], где было показано, что аллель С значительно чаще встречается среди пациентов с диагнозом «рак яичников» по сравнению с женщинами из контрольной группы ($OR = 51,752$, 95% CI : 1,107–2,772).

В результате сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs7517847 в гене *IL23R* между больными РЯ и здоровыми донорами статистически значимых различий не обнаружено ($p > 0,05$).

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют об ассоциации полиморфного варианта rs10889677 в гене *IL23R* с риском развития рака яичников у женщин из Республики Башкортостан.

Литература

1. Parham C., Chirica M., Timans J. et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R β 1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R // J. Immunol. 2002. V. 168, № 11. P. 5699–5708.
2. Zhang Z., Zhou B., Zhang J. et al. Association of interleukin-23 receptor gene polymorphisms with risk of ovarian cancer // Cancer genetics and cytogenetics. 2010. V. 196, № 2. P. 146–152.

ДИАГНОСТИКА ХРОНИЧЕСКИХ ЛЕЙКОЗОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЦИТОГЕНЕТИКИ. ОСОБЕННОСТИ МЕТОДОЛОГИИ

А.В. Возилова

Уральский научно-практический центр радиационной медицины, г. Челябинск

Цитогенетические методы исследования клеток костного мозга и периферической крови у лиц с онкогематологическими диагнозами широко используются во всем мире для диагностики заболеваний и оценки степени их тяжести. В некоторых случаях

на основе результатов исследования врач определяется с тактикой лечения, а в будущем повторный цитогенетический анализ помогает оценить эффективность лечения. Кариотипирование клеток позволяет как выявлять клоны клеток с рекуррентными

структурными изменениями, так и обнаруживать новые aberrации хромосом, которые образовались в клетках в результате опухолевой прогрессии. Для выявления структурных хромосомных перестроек используются разные методы окрашивания: дифференциальное GTG-окрашивание («золотой стандарт цитогенетики»), 24-цветный FISH, FISH с локуспецифичными зондами на конкретные участки хромосом и т.д. При таком разнообразии исследователь должен определиться: один или несколько методов окраски будут использованы для оптимизации времени исследования и качества результата.

Цель настоящего исследования заключалась в оценке цитогенетической патологии в клетках костного мозга у лиц с хроническими формами лейкозов с применением трех способов окрашивания хромосом и формировании методологии цитогенетического исследования.

Материалы и методы

Исследование проводилось в 2015–2016 гг. Исследована 48-часовая культура костного мозга больных с хроническим миелолейкозом (ХМЛ), хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), множественной миеломой (ММ), первичным миелофиброзом (ПМФ). Для выявления хромосомных aberrаций в клетках костного мозга пациентов применялись GTG-окрашивание, 24-цветная FISH. Для лиц с ХЛЛ препараты дополнительно окрашивались с использованием коктейлей локуспецифичных зондов: коктейль зондов на гены *ATM*(11q22)/*TP53*(17p13) и коктейль зондов на гены *DLEU*(13q14)/*LAMP*(13q34) и хромосому *cen12*(12p11.1;12q11.1) («Метасистемс», Германия). Анализ хромосом проводили при световой и флуоресцентной микроскопии. Для формирования архива использовали автоматический поиск метафаз и оцифровку, которую выполняли на «Метафере» (Германия). Анализ дифференциально окрашенных препаратов проводили с использованием ПО *Ikaros*, а флуоресцентные изображения анализировали с помощью ПО *Isis* («Метасистемс», Германия). Анализировали максимальное количество метафазных пластинок хорошего качества, которые имелись на стекле (от 5 до 50 клеток). В ходе анализа с локуспецифичными зондами анализировали от 150 до 400 клеток.

Результаты

В группе лиц с ХМЛ был обследован костный мозг пяти человек. У всех пациентов подтвердилось наличие реципрокной транслокации *t*(9;22)(q34;q11) с образованием маркерной Рн-хромосомы. У одного пациента, который обследовался в нашей клинике впервые, помимо Рн-хромосомы была обнаружена *t*(8;10)(p11;p11) (метод – 24-цветная FISH). Пациент был резистентен к химиотерапии. По данным [1], транслокации, затрагивающие регион 8p11, были описаны для миелоидной опухолевой трансформации клеток. В перестройке могут участвовать два разных гена – *FGFR1* и *MOZ*. Разрыв гена *FGFR1* связан с заболеванием, известным как миелопролиферативный 8p11 синдром. Болезнь протекает агрессивно и быстро трансформируется в

острый миелоидный лейкоз, что наблюдалось у нашего пациента. По данным литературы, помочь могла только аллогенная трансплантация стволовых клеток в случае раннего выявления повреждения региона 8p11 в момент диагностики заболевания.

В ходе выполнения работы были обследованы 11 пациентов с диагнозом ХЛЛ. В клетках костного мозга у 27% обследованных выявили трисомию по хромосоме 12. У 5 пациентов (50%) были отмечены *del17p*(*TP53*) и *del13q14*(*DLEU*). В 7% случаев нами была отмечена *del11q22*. Во всех случаях применялся метод FISH с локус-специфичными зондами. В ходе хромосомного анализа методом FISH у одной пациентки выявили клон клеток с 4 транслокациями, которые по одной были отмечены в других клетках, 14% клеток имели нормальный кариотип. У двух пациентов была выявлена трисомия по хромосоме 21. У одной пациентки обнаружили транслокацию с вовлечением хромосомы 14 *t*(14;17), которая наиболее часто мутирует при лимфатических опухолях.

В группе лиц с ММ были обследованы 12 пациентов. Для этого диагноза характерно вовлечение в различные перестройки хромосомы 14. В двух случаях (14%) выявили транслокации с участием этой хромосомы. У мужчины 65 лет выявили *t*(14;18)(p11.2;q21.2). Также в других клетках была отмечена *del14p11.2*, т.е. делеция затрагивала тот же регион, что и участвовал в транслокации. У женщины 56 лет в одной клетке были обнаружены две транслокации – *t*(4;14) и *t*(12;18). Для оценки эффективности химиотерапии одна пациентка была обследована повторно через 2 мес. После лечения у женщины количество клеток с нормальным кариотипом увеличилось с 30 до 75%. Необходимо отметить, что в этой группе чаще отмечались анеуплоидии как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения количества хромосом. Чаще, чем у людей с другими диагнозами, выявлялись случаи кратного увеличения генома. Для лиц с диагнозом «множественная миелома» было характерно присутствие клеток с нормальным кариотипом в более чем 50% случаев.

У половины обследованных с диагнозом ПМФ (11 человек) в клетках костного мозга наблюдалась полиплоидия (от 50 до 132 хромосом). В ходе цитогенетического анализа была обнаружена одинаковая aberrация – *del2q23* – у двух пациентов (мужчина 56 лет и женщина 43 лет). У трех пациентов отмечены случаи клеток с трисомией по хромосоме 21, что считается благоприятным прогностическим признаком при данном заболевании.

Заключение

Для отбора максимального количества метафаз целесообразно использовать прибор для автоматического поиска клеток и оцифровывания изображений. При кариотипировании хромосом важно применять программное обеспечение для документирования изображений и корректного анализа. Метод окрашивания выбирают индивидуально в зависимости от препарата и диагноза пациента. Дифференциальное окрашивание выявляет максимально возможные структурные перестройки хромосом (делеции, инверсии, транслокации и т.д.) и числовые нарушения, однако требует идеального качества

хромосом, что в онкогематологии бывает нечасто. 24-цветный FISH позволяет выявить транслокации, даже если качество хромосом не очень хорошее. Метод отлично зарекомендовал себя в случае многочисленных комплексных транслокаций. Если на стекле мало метафаз не очень хорошего качества, то лучше применить FISH окрашивание хромосом. Используемый в нашем случае коктейль локуспецифичных зондов для случаев ХЛЛ показал высокую эффективность. Также этот подход позволяет ускорить время получения результата – можно не культивировать клетки.

Информация, полученная с применением разных методов окрашивания хромосом, непротиворечива. Каждый конкретный клинический случай уникален и требует индивидуальных подходов в ди-

агностике генетической патологии. Мы считаем, что в некоторых случаях необходимо проведение дальнейшей диагностики на геномном уровне с привлечением возможностей секвенирования генов, которые вовлечены в хромосомные перестройки. При таком комплексном подходе к молекулярно-цитогенетической диагностике лейкозов могут быть решены тактические задачи по выбору правильной и эффективной терапии, что увеличит процент положительных исходов в лечении заболеваний.

Литература

1. Macdonald D., Reiter A., Cross N.C. The 8p11 myeloproliferative syndrome: a distinct clinical entity caused by constitutive activation of FGFR1 // *Acta Haematol.* 2002. V. 107 (2). P. 101–107.

МОДЕЛЬ ПРЕРЫВИСТОГО РАЗВИТИЯ ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В БРОНХИАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Е.В. Денисов^{1,2}, О.В. Панкова¹, Т.С. Геращенко^{1,2}, Л.А. Таширева¹, П.А. Гервас¹,
А.А. Пономарёва¹, Н.А. Скрыбин³, А.А. Слепцов³, В.М. Перельмутер¹

¹ НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

³ НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

Канцерогенез в бронхиальном эпителии – сложный многоступенчатый процесс последовательного накопления молекулярно-генетических изменений, ведущий к морфологическим изменениям нормального эпителия (базальноклеточная гиперплазия (БКГ), плоскоклеточная метаплазия (ПМ) и дисплазия I–III степеней), его переходу в карциному *in situ* (CIS) и далее в плоскоклеточный рак легкого [1]. В настоящее время все перечисленные варианты состояния бронхиального эпителия принято относить к предопухолевым изменениям, а их развитие рассматривать в рамках последовательной модели: БКГ – ПМ – дисплазии I–III. Тем не менее хорошо известно, что БКГ, ПМ и дисплазия могут возникать независимо друг от друга в разных участках бронха [2]. Так, БКГ не всегда предшествует ПМ, а CIS может развиваться без предопухолевых изменений [3]. Кроме того, описано, что БКГ трансформируется в дисплазию только в 16,7% случаев, а ПМ – в дисплазию в 30%, в DCIS – в 1,3–4% и инвазивный рак – в 0,6–1% случаев [3–5]. В нашем исследовании было показано, что у больных раком легкого в смежной с опухолью нормальной ткани обнаруживаются фокусы предопухолевых изменений. Более того, у части пациентов наблюдаются изолированные формы предопухолевых изменений, а у других больных – сочетанные: БКГ + ПМ и ПМ + Д [6, 7].

Целью настоящего исследования было изучение закономерностей сочетания различных предопухолевых изменений в бронхиальном эпителии больных раком легкого, а также оценка их экспрессионных особенностей и ассоциации с клиническим течением заболевания.

Материалы и методы

В исследование были включены 104 пациента (возраст 41–73 года, T₁₋₄N₀₋₂M₀) с немелкоклеточным

раком легкого, проходивших лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ. Формалин-фиксированные заготовки в парафин образцы опухолевой и нормальной (4–5 см от опухоли) тканей легкого использовались для морфологического анализа наличия предопухолевых изменений в эпителии бронхов и иммуногистохимической оценки экспрессии целевых белков. Свежие образцы опухолевой и нормальной тканей легкого использовались для получения различных предопухолевых изменений из бронхиального эпителия с помощью лазерной микродиссекции и микроматричного экспрессионного профилирования. Функциональное аннотирование выполнялось с помощью инструмента GO Enrichment Analysis. Статистическая обработка данных, включая оценку ассоциации различных сочетаний предопухолевых изменений с риском прогрессирования рака легких, проводилась с помощью стандартных непараметрических методов (Statistica 8.0).

Результаты

В ходе исследования было показано, что дисплазии часто детектируются на фоне ПМ при отсутствии БКГ при плоскоклеточном раке легкого, тогда как ПМ без БКГ и дисплазия редко встречаются в бронхах мелкого калибра при аденокарциноме. Высокая частота рецидивов наблюдается у больных немелкоклеточным раком легкого, у которых в смежной с опухолью бронхиальном эпителии детектировалось сочетание БКГ и ПМ (пмБКГ и бкгПМ). Гематогенные метастазы чаще выявляются у пациентов с наличием изолированной БКГ (иБКГ). Различные варианты БКГ и ПМ, а также дисплазия в значительной степени отличались от нормального эпителия и друг от друга по экспрессионному профилю. Тем не менее варианты БКГ были более схожи друг

с другом, чем с другими морфологическими изменениями. Функциональное аннотирование гиперэкспрессирующихся генов не показало ассоциации иБКГ и пмБКГ с какими-либо биологическими процессами. Напротив, анализ гипозэкспрессирующихся генов продемонстрировал ассоциацию иБКГ с большим количеством разнообразных процессов и сигнальных путей, большая часть которых была связана с иммунным ответом, а пмБКГ – с регуляцией процессов, вовлеченных в организацию внеклеточного матрикса, продукцию молекул адгезии и клеточной пролиферации. Аннотирование генов, гиперэкспрессирующихся в бкгПМ, показало выраженность G-белок-опосредованного и ольфакторного сигналинга, а в ПМ, сочетанной с дисплазией (дПМ), – процессов клеточного цикла, ответа на ксенобиотики и развития эпителия. Гены, гипозэкспрессирующиеся в бкгПМ, были вовлечены в регуляцию транскрипции / экспрессии и дифференцировки эпителиальных клеток легкого, а в случае дПМ – в процесс сборки реснитчатого эпителия и аксонемы, организацию внеклеточного матрикса, миграцию и хемотаксис лейкоцитов, регуляцию клеточной пролиферации и дифференцировки пневмоцитов II типа. На основании аннотирования гиперэкспрессирующихся генов дисплазия, сочетанная с ПМ (пмД), была ассоциирована с процессами клеточного деления, развитием эпителия, метаболизмом ретиноевой кислоты и организацией внеклеточного матрикса. Анализ гипозэкспрессирующихся генов выявил связь пмД с регуляцией процессов клеточного хемотаксиса, в частности миграции лейкоцитов. Более того, показана ассоциация пмД с процессами, вовлеченными в воспаление и иммунный ответ, а также в регуляцию продукции цитокинов. Каждый из вышеперечисленных вариантов предопухолевых изменений демонстрировал экспрессию специфических генов, часть из которых была валидирована на белковом уровне с помощью иммуногистохимического анализа.

Таким образом, у больных раком легкого присутствуют различные сочетания вариантов предопухолевых изменений, которые ассоциированы с риском прогрессии данного заболевания. При этом экспрессионные профили клеток предопухолевых изменений зависят от того, в каких сочетаниях эти изменения регистрируются в бронхиальном эпителии. Полученные результаты могут трактоваться как подтверждение «прерывистости» предопухолевого процесса в бронхиальном эпителии, когда в одних случаях БКГ может прогрессировать в ПМ, а ПМ – в дисплазию, а в других случаях подобного не наблюдается.

Литература

1. Kadara H., Wistuba I.I. Molecular Biology of Lung Preneoplasia // Lung Cancer. 4th ed. / J.A. Roth, W.K. Hong, R.U. Komaki, eds. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc., 2014. P. 110–128.
2. Melamed M.R. Lung cancer screening results in the National Cancer Institute New York study // Cancer. 2000. V. 89, № 11. P. 2356–2362.
3. Kerr K.M., Fraire A.E. Preinvasive Disease. Dail and Hammar's Pulmonary Pathology / J.F. Tomashefski et al., eds. Springer: Science+Business Media, 2008. P. 158–206.
4. Bota S., Auliac J.B., Paris C. et al. Follow-up of bronchial precancerous lesions and carcinoma *in situ* using fluorescence endoscopy // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 2001. V. 164, № 9. P. 1688–1693.
5. Breuer R.H., Pasic A., Smit E.F. et al. The natural course of preneoplastic lesions in bronchial epithelium // Clin. Cancer Res. 2005. V. 11, № 2. P. 537–543.
6. Панкова О.В., Перельмутер В.М., Литвяков Н.В. и др. Взаимосвязь неопластических изменений с базальноклеточной гиперплазией бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого // Сибирский онкологический журнал. 2011. Т. 5. С. 57–60.
7. Панкова О.В., Перельмутер В.М., Тузиков С.А., Денисов Е.В. Пре- и неопластические изменения бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого // Бюллетень сибирской медицины. 2014. Т. 13, № 3. С. 100–110.

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛИСОМИИ ХРОМОСОМЫ 17 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕНСТРУАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С РАЗЛИЧНЫМ Her2/neu СТАТУСОМ

Е.В. Кайгородова^{1,2}, В.М. Перельмутер¹, Е.Л. Чойнзон^{1,2}

¹ НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

² Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск

Рак молочной железы (РМЖ) устойчиво занимает лидирующие позиции в структуре заболеваемости (25,1% от всех злокачественных опухолей) и смертности (14,7% смертей от злокачественных опухолей) среди женского населения во всем мире. По данным Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer, IARC), в мире ежегодно регистрируется более 1,38 млн случаев РМЖ и погибает около 458 тыс. женщин [1].

В настоящее время для оценки особенностей клинического течения, возможного исхода заболевания и выбора адекватной тактики лечения, помимо описания клинико-морфологических характеристик (возраст, размер первичного опухолевого узла, ги-

стологический тип, степень злокачественности и др.), оценивают молекулярно-биологические свойства опухоли, важное место среди которых занимает оценка Her2/neu статуса. Her2/neu (human epidermal growth factor receptor 2) – продукт онкогена *erbB2*, тирозинкиназный рецептор, представитель семейства рецепторов эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR). Наличие позитивной экспрессии рецептора Her2/neu на поверхности опухолевых клеток предопределяет специфичность к проведению таргетной терапии (трастузумаб, лапатиниб и др.) [2].

Согласно литературным данным установлено, что избыточная презентация рецептора мо-

жет быть не только следствием амплификации гена *erbB2* [3, 4]. К альтернативным генетически обусловленным механизмам увеличения экспрессии относится полисомия хромосомы 17. В связи с этим **целью настоящего исследования** явилась оценка частоты встречаемости полисомии хромосомы 17 в зависимости от менструальной функции больных РМЖ с различным Her2/neu-статусом.

Материалы и методы

В исследование были включены 109 больных в возрасте от 27 до 85 лет, проходивших лечение в клинике ФГБНУ НИИ онкологии Томского НИМЦ. В качестве материала исследования были использованы образцы опухолевой ткани РМЖ, полученные при выполнении пистолетной биопсии опухоли. Критериями включения пациенток в исследование являлись: согласие на участие в исследовании, морфологически верифицированный диагноз инвазивной карциномы неспецифического типа, стадия T1-3N0-3M0, первично одностороннее опухолевое поражение молочной железы, отсутствие неoadъювантной химиотерапии, уницентрическая форма роста опухоли.

Установление Her2/neu статуса проводили с помощью балльной шкалы согласно критериям оценки интенсивности и типа иммунного окрашивания мембраны опухолевых клеток РМЖ по рекомендациям ASCO/CAP (2013).

Амплификацию гена *erbB2* в опухолевых клетках РМЖ определяли методом FISH набором реагентов ДНК-зондов PathVysion HER-2 DNA Probe Kit CE marked (Abbott, США). Визуализацию готовых препаратов проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Axi Star plus (Carl ZEISS, Германия) при увеличении 1 000. Амплификацию устанавливали путем подсчета сигналов гена *erbB2* (оранжевый сигнал) и центромеры хромосомы 17 (зеленый сигнал) в ядрах 20 клеток. При соотношении суммы сигналов гена *erbB2* к сумме сигналов CEP17 < 2,0 результат амплификации гена *erbB2* считался отрицательным. При отношении сигналов ≥ 2 результат оценивали как положительный. Полисомия хромосомы 17 регистрировалась при количестве сигналов CEP17 ≥ 3 на клетку.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета прикладных статистических программ IBM SPSS Statistics 19 (SPSS: An IBM Company, США). Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования было показано, что полисомия хромосомы 17 наблюдалась в 13 случаях (11,9%). Данная генетическая aberrация регистрировалась преимущественно в группе пациенток с сохраненной менструальной функцией (таблица).

Частота встречаемости полисомии хромосомы 17 в зависимости от менструальной функции больных РМЖ

Состояние менструальной функции	Полисомия хромосомы 17	
	нет ($n = 96$)	есть ($n = 13$)
Менструальный цикл сохранен ($n = 38$)	30,2% (29/96)	76,9% (10/13)
Менопауза ($n = 71$)	69,8% (67/96)	23,1% (3/13)
	$F = 11,1, p = 0,002; \phi = 0,325, p = 0,002$	

Примечание. n – число индивидов.

В группе пациенток с положительной презентацией рецептора Her2/neu на мембране опухолевых клеток при отрицательной амплификации гена *erbB2* полисомия хромосомы 17 регистрировалась относительно чаще, чем в группах с Her2/neu-отрицательным и положительным статусом и составляла 25,0% (6/24) против 5,0% (1/20) и 6,6% (4/61, соответственно ($\chi^2 = 7,0, p = 0,030; V = 0,259, p = 0,03$). Также было выявлено, что в группе с положительной презентацией рецептора Her2/neu на мембране опухолевых клеток при отрицательной амплификации гена *erbB2* полисомия хромосомы 17 выявлялась относительно часто у пациенток с сохраненной менструальной функцией в сравнении с группой больных, находящихся в состоянии менопаузы (66,7% против 16,7%).

Заключение

Таким образом, проведенное исследование показало, что полисомия хромосомы 17 ассоциирована с экспрессией Her2/neu на мембране при отсутствии амплификации его гена. У пациенток с сохраненным менструальным циклом полисомия хромосомы 17 встречается чаще, нежели у пациенток в состоянии менопаузы. Полученные результаты интересны с точки зрения дальнейшего исследования полисомии хромосомы 17 как дополнительного фактора прогноза опухолевых заболеваний.

Литература

1. Федоров В.Э., Ласкано М., Чебуркаева М.Ю. Характеристика распространенности рака молочной железы за рубежом (обзор литературы) // Международный научно-исследовательский журнал. 2016. № 4 (46), ч. 5. С. 138–141.
2. Goud K.I., Dayakar S., Vijayalaxmi K. et al. Evaluation of HER-2/neu status in breast cancer specimens using immunohistochemistry (IHC) & fluorescence in-situ hybridization (FISH) assay // Indian J. Med. Res. 2012. V. 135. P. 312–317.
3. Hanna W.M., Rüschoff J., Bilous M. et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity // Mod. Pathol. 2014. V. 27 (1). P. 4–18.
4. Богатюк М.В., Кайгородова Е.В., Завьялова М.В. и др. Функциональные особенности белка теплового шока 27 кДа (Hsp27) при диссонансе амплификации гена *erbB2*/neue и экспрессии рецептора Her2/neu на мембране опухолевых клеток рака молочной железы // Вопросы онкологии. 2014. Т. 60 (6). С. 713–717.

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В ГЕНЕ-СУПРЕССОРЕ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА *PBRM1* У ПАЦИЕНТОВ СО СВЕТЛОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ПОЧКИ

Е.А. Климентова¹, И.Р. Гилязова¹, И.М. Султанов², В.Н. Павлов², Э.К. Хуснутдинова¹

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

² Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Уфа

Рак почки (РП) – гетерогенная группа злокачественных опухолей, подавляющее большинство которых представляют собой почечно-клеточные карциномы (ПКК) различных морфологических типов. Ежегодно в мире регистрируют более 300 тыс. новых случаев РП [1], в России эта цифра составляет 18 тыс., в Республике Башкортостан – 400–450 случаев в год. Особое внимание в канцерогенезе ПКК уделяется ряду генов-супрессоров опухолевого роста, участвующих в подавлении активности онкогенов. Одним из таких генов, инактивируемых при светлоклеточном раке почки, является ген *PBRM1*, кодирующий субъединицу PBAFSWI/SNF комплекса ремоделирования хроматина BAF180. Белок PBRM1 способен изменять структуру хроматина, а также обеспечивать регуляцию транскрипции посредством контроля доступности ДНК и влияния на транскрипционную активность p53 [2]. Ген *PBRM1* расположен на коротком плече третьей хромосомы в области 3p21 вблизи гена фон Хиппеля–Линдау (*VHL*), мутации в котором являются основным событием при возникновении СРП [3].

Целью данного исследования был поиск изменений нуклеотидной последовательности в гене *PBRM1* у пациентов со светлоклеточным раком почки башкирской, русской и татарской этнической принадлежности.

Нами было проанализировано 210 парных образцов ДНК, выделенных из опухолевой ткани почки и прилежащей нормальной почечной паренхимы. Поиск мутаций в гене *PBRM1* проводили с помощью метода прямого секвенирования.

В результате анализа обнаружена соматическая мутация с.1675-1676delTC в 15-м экзоне гена *PBRM1* у пациента с начальной стадией опухолевого процесса, приводящая к сдвигу рамки считывания, образованию стоп-кодона (L526lfs*6) и синтезу неполноценного белка. Мутация с.1675-1676delTC приводит к потере консервативных областей белка, среди которых ВАН1-домен (956–1074 аминокислоты) и ВАН2-домен (1156–1272 аминокислоты), опосредующих белок–белковые взаимодействия, а также к утрате области связывания белков с высокой подвижностью (HMG), обеспечивающих регуляцию транскрипционной активности. Кроме того, ранее у данного пациента нами была идентифицирована делеция 7 нуклеотидов в 3-м экзоне гена *VHL* (с.498_504del), также приводящая к сдвигу рамки считывания и образованию стоп кодона (p.V166Vfs*1) [4]. В 23-м экзоне гена *PBRM1* был обнаружен ранее описанный полиморфный вариант rs17264436, приводящий к синонимичной замене

(p.P1174P). Данный полиморфный вариант ранее был обнаружен при раке мочевого пузыря, а также показана его ассоциация с риском развития рака молочной железы [5]. Во 2-м экзоне гена *PBRM1* была обнаружена миссенс-мутация с.233G>A, которая приводит к замене аспарагиновой кислоты на аспарагин в 45-м положении белка (p.D45N). Замена отрицательно заряженной аспарагиновой кислоты на полярный аспарагин может влиять на свойства белка и приводить к изменению сайтов сплайсинга. В результате оценки функциональной значимости с использованием пакетов аналитических программ SIFT, Polyphen2, LRT MutationTaster, MutationAssessor, FATMM, M-CAP, CADD было показано, что миссенс-мутация с.233G>A имеет потенциально патогенный характер.

Таким образом, в результате поиска изменений нуклеотидной последовательности гена *PBRM1* мутации были выявлены в 1,4% (3/210) случаев первичных опухолей почки. Согласно литературным данным, частота соматических мутаций в гене *PBRM1* при раке почки достигает 40% [7]. Возможно, низкая частота мутаций в исследованных нами образцах связана с тем, что инактивация гена *PBRM1* происходит иными способами, а также может быть обусловлена этноспецифичностью исследуемых пациентов.

Литература

1. Ricketts C.J., Linehan W.M. Intratumoral heterogeneity in kidney cancer // *Nature Genetics*. 2014. V. 46. P. 214–214.
2. Macher-Goeppinger S., Keith M., Tagscherer K.E. et al. PBRM1 (BAF180) protein is functionally regulated by p53-induced protein degradation in renal cell carcinomas // *J. Pathol.* 2015. V. 237 (4). P. 460–471.
3. Audenet F., Yates D.R., Cancel-Tassin G. et al. Genetic pathways involved in carcinogenesis of clear cell renal cell carcinoma: genomics towards personalized medicine // *BJU Int.* 2011. V. 109. P. 1864–1870.
4. Кутлыева Л.Р., Гилязова И.Р., Хусайнова Р.И. и др. Поиск изменений нуклеотидной последовательности в гене фон Хиппеля–Линдау и анализ аллельных делеций в генах-супрессорах опухолевого роста у больных светлоклеточным раком почки из Республики Башкортостан // *Медицинская генетика*. 2012. № 12. С. 27–35.
5. Huang L., Peng Y., Zhong G. et al. PBRM1 suppresses bladder cancer by cyclin B1 induced cell cycle arrest // *Oncotarget*. 2015. V. 6 (18). P. 16366–16378.
6. He N., Zheng H., Li P. et al. miR-485-5p binding site SNP rs8752 in *HPGD* gene is associated with breast cancer risk // *PLoS One*. 2014. V. 9 (7). e102093.
7. Sato Y., Yoshizato T., Shiraishi Y. et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma // *Nat. Genet.* 2013. V. 45 (8). P. 860–867.

ПОИСК МУТАЦИЙ В ГЕНЕ-СУПРЕССОРЕ ОПУХОЛИ TP53 У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Г.Б. Кунсбаева¹, И.Р. Гилязова^{1,2}, А.Т. Мустафин³, Р.И. Сафиуллин³,
В.Н. Павлов³, Э.К. Хуснутдинова^{1,2}

¹ Башкирский государственный университет, г. Уфа

² Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

³ Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Уфа

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований во всем мире [1] и находится на втором месте по распространенности среди онкологических заболеваний у мужчин. Ежегодно во всем мире регистрируется около 1 100 тыс. новых случаев заболевания РПЖ и 300 тыс. случаев смерти, что составляет почти 4% от всех случаев смерти от рака [2]. В России за 2015 г. было диагностировано 38 812 новых случаев РПЖ и зарегистрировано 11 987 случаев смерти от данного заболевания [3]. Как правило, РПЖ является болезнью старения, приводящей к смерти мужчин в возрасте старше 70 лет [4], однако большинство литературных данных указывает на то, что в патогенезе РПЖ, как и многих других онкологических заболеваний, задействовано множество генетических и эпигенетических процессов, которые ведут к активации онкогенов и подавлению генов опухолевой супрессии, лежащих в основе опухолевой трансформации [5].

Ген TP53 локализован на хромосоме 17 в области р13.1, состоит из 12 экзонов и кодирует белок р53, состоящий из 393 аминокислот. TP53 является геном-супрессором опухолевого роста, и его функциональная значимость заключается в том, что он участвует в процессе регуляции клеточного цикла и ограничивает вероятность возникновения генетически нестабильных клеток. Ген TP53 является транскрипционным фактором свыше 300 генов, отвечающих за активацию таких жизненно важных процессов, как репликация, репарация ДНК, апоптоз, антиоксидантная защита и др. [6]. Ген TP53 как наиболее транскрипционно активный, экспрессия которого индуцируется многими стрессорными стимулами, является высокочувствительной мишенью мутагенеза [5]. При раке молочной железы до 50% опухолей содержит мутации в гене TP53, приводящие к частичной либо полной потере функциональности белка и, более того, часто способствующие приобретению им онкогенных свойств. Согласно литературным данным, мутации в гене TP53 встречаются достаточно редко: при исследовании первичных опухолей предстательной железы – менее чем у 10% больных. Однако существуют данные, указывающие на то, что увеличение частоты мутаций в гене TP53 в 4–5 раз происходит при раке предстательной железы, резистентном к кастрации. Кроме того, мутации в генах TP53 и RB1 считаются ключевыми факторами развития мелкоклеточного нейроэндокринного рака предстательной железы и других органов [7].

С целью поиска мутаций в гене TP53 нами было проведено секвенирование 20 образцов ДНК, выделенных из опухолевой ткани предстательной железы неродственных больных с аденокарциномой

простаты, проживающих на территории Республики Башкортостан. В работе применялись следующие методы: выделение ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции, полимеразная цепная реакция; система прямого капиллярного секвенирования на Applied Biosystems 3500.

В результате секвенирования образцов ДНК, выделенных из ткани предстательной железы, у 7 больных были обнаружены 3 мутации в гене TP53. Мутации, локализованные в 7-м интроне, представляют собой однонуклеотидные замены, выявленные в гетерозиготном и гомозиготном состояниях: rs12947788 (с.782+72C>T), rs12951053 (с.782+92T>G) и одна ранее неизвестная замена с.782+30G>A.

Ассоциативные исследования полиморфных вариантов rs12947788 (с.782+72C>T), rs12951053 (с.782+92T>G) проводились большой группой исследователей при изучении многих онкологических заболеваний, таких как рак прямой кишки, рак поджелудочной и молочных желез, рак легкого и др. Часто ассоциация с риском развития того или иного онкологического заболевания была выявлена при анализе гаплотипов [8–12].

Нами также была обнаружена ранее неизвестная мутация с.782+30G>A у одного пациента с раком предстательной железы. Предполагается, что данная однонуклеотидная замена может влиять на изменение сайта сплайсинга гена TP53.

Для установления частоты и роли мутаций в гене TP53 при РПЖ необходимы дальнейшие исследования на расширенных группах пациентов и здоровых индивидов.

Литература

1. Каприн А.Д., Старинский В.В. Злокачественные новообразования в России в 2013 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2015. 250 с.
2. Welch H.G., Gorski D.H. Trends in Metastatic Breast and Prostate Cancer // N. Engl. J. Med. 2016. V. 374. P. 596.
3. Каприн А.Д., Старинский В.В. Злокачественные новообразования в России в 2015 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2017. 250 с.
4. Hayat M.J., Howlader N. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program // The oncologist. 2007. V. 12. № 1. P. 20–37.
5. Денисов Е.В. Мутационная изменчивость гена TP53 при раке молочной железы: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07. Томск, 2010. 134 с.
6. Kumar S., Walia V. p53 in breast cancer: mutation and countermeasures // Front. Biosci. 2007. V. 12. P. 4168–4178.
7. Guedes L.B., Almutairi F. Analytic, pre-analytic and clinical validation of p53 immunohistochemistry for detection of TP53 missense mutation in prostate cancer // American Association for Cancer Research. 2017. P. 40.

8. Zhang B., Beeghly-Fadiel A. Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence // *The lancet oncology*. 2011. V. 12, № 5. P. 477–488.
9. Naccarati A., Pardini B. Genotype and haplotype analysis of TP53 gene and the risk of pancreatic cancer: an association study in the Czech Republic // *Carcinogenesis*. 2010. V. 31, № 4. P. 666–670.
10. Vymetalkova V., Soucek P. et al. Genotype and haplotype analyses of TP53 gene in breast cancer patients: association with risk and clinical outcomes // *PloS One*. 2015. V. 10, № 7. e0134463.
11. Mechanic L.E., Bowman E.D. Common genetic variation in TP53 is associated with lung cancer risk and prognosis in African Americans and somatic mutations in lung tumors // *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2007. V. 16, № 2. P. 214–22.
12. Ru J.Y., Cong Y. Polymorphisms in TP53 are associated with risk and survival of osteosarcoma in a Chinese population // *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015. V. 8, № 3. P. 3198.

МЕТАСТАТИЧЕСКИЕ КЛОНЫ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Н.В. Литвяков^{1,2}, М.К. Ибрагимова^{1,2}, М.М. Цыганов^{1,2}, А.В. Дорошенко¹,
П.В. Казанцева¹, Н.В. Чердынцева^{1,2}, Е.М. Слонимская¹**

¹НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра, г. Томск

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

Развитие метастатической болезни даже после, казалось бы, радикально проведенного комбинированного лечения является основной причиной смерти онкологических больных в различные сроки после удаления первичной опухоли. В зависимости от локализации опухоли и стадии процент больных, у которых развиваются метастазы, колеблется от 15 до 90%. Все без исключения известные прогностические факторы, с одной стороны, получены в результате ассоциативных исследований и не объясняют механизмы метастазирования, а с другой стороны, ни один прогностический фактор не является абсолютным, т.е. не прогнозирует метастазирование в 100% случаев при наличии признака и в 100% – выживание при его отсутствии. Считается, что только у 30% пациентов известные прогностические факторы могут с высокой долей вероятности прогнозировать развитие метастазов или благоприятный исход, у подавляющего же большинства пациентов (70%) прогноз исхода заболевания остается неопределенным [1]. В 2015–2016 гг. при исследовании клональной эволюции опухоли молочной железы в процессе предоперационной (неоадьювантной) химиотерапии (проект РФФИ № 15-04-03091а) нами впервые был выявлен абсолютный прогностический фактор для рака молочной железы, который позволяет со 100%-й эффективностью прогнозировать исход заболевания. Оказалось, что если в процессе предоперационной химиотерапии в опухоли появляются новые клоны, несущие амплификации в любом из указанных регионов – 5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 18chr, 19p, то у пациентов в 100% случаев развивались гематогенные метастазы. Если же указанные клоны, несущие амплификации, не появлялись или исходно существующие элиминировались до одного или полностью в остаточной (резидуальной) опухоли, то все больные пережили 7-летний период наблюдения без признаков прогрессирования заболевания [2]. Было высказано предположение, что амплификационные клоны 5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 18chr и 19p являются потенциальными метастатическими клонами, которые осуществляют метастазирование, и неоадьювантная химиотерапия (НАХТ) должна быть направлена на элиминацию имеющихся метастати-

ческих клонов и не проводиться при их отсутствии, чтобы не стимулировать их появление.

Целью настоящего исследования явились определение прогностической значимости наличия в первичной опухоли молочной железы амплификационных клонов и апробация на этой основе новых показаний к проведению НАХТ.

Материалы и методы

В исследование включены 64 больных раком молочной железы люминального В молекулярного подтипа. У каждого пациента до проведения лечебных мероприятий из биопсии опухоли молочной железы выделяли ДНК и исследовали ее на микроматрице CytoScan HD Array (Affymetrix, США). Определяли наличие амплификаций в регионах 5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 18chr, 19p и маркеры для назначения персонализированной НАХТ в соответствии с нашим патентом RU 2594251. По результатам микроматричного исследования и ранжирования было сформировано 4 группы пациентов. В 1-ю вошли больные, в опухоли которых определялось наличие любых двух и более потенциальных метастатических клонов. Им назначалась персонализированная НАХТ. Больным 2-й группы с двумя и более клонами не проводили НАХТ. Во 3-ю группу были включены пациенты, у которых исходно в ткани опухоли было не более одного потенциального метастатического клона и лечение начинали с оперативного этапа. Пациентам 4-й группы, также исходно имеющим не более одного клона, лечение начинали с персонализированной НАХТ. Остальные этапы лечения были стандартными. По основным клинко-морфологическим параметрам (возраст, стадия, гистотип и др.) группы статистически не различались. Оценивали непосредственную эффективность НАХТ в 1-й и 4-й группах по критериям ВОЗ при помощи УЗИ и маммографии и 2-летнюю безметастатическую выживаемость во всех четырех группах.

Результаты

У 29 пациентов 1-й группы с двумя и более потенциальными метастатическими клонами в опухо-

ли, которые получали персонализированную НАХТ, ее непосредственная эффективность (достижение полных или частичных регрессий) составила 86% (25/29). Безметастатическая 2-летняя выживаемость в этой группе составила 97% (28/29), и только у одного пациента через 20 мес развились метастазы в подлопаточном лимфоузле. Во 2-й группе с двумя и более клонами НАХТ не проводилась, в эту группу вошли два пациента, и у обоих больных развились гематогенные метастазы: безметастатическая выживаемость 0%. По этическим соображениям набор больных во 2-ю группу был прекращен. В 3-й группе с 0–1 метастатическими клонами без НАХТ безметастатическая выживаемость составила 93% (13/14). В 4-й группе с 0–1 клонами непосредственная эффективность персонализированной НАХТ составила 84% (16/19), но при этом показатели выживаемости были статистически значимо ниже – 68% (13/19), чем в 1-й группе (по критерию Фишера, $p = 0,011$). По-видимому, НАХТ у шести больных этой группы стимулировала появление новых клонов, несущих амплификации в обозначенных выше регионах, что и способствовало метастазированию. Набор пациентов в 4-ю группу также прекращен по этическим соображениям. Между 3-й и 4-й группами различия не достигали уровня статистической значимости ($p = 0,10$) ввиду малочисленности 3-й группы.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о высоком метастатическом потенциале амплификационных клонов (5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 18chr, 19p), их предиктивной и прогностической значимости. Успешно апробированы новые показания к назначению неоадьювантной химиотерапии, целью которой явилась элиминация амплификационных клонов, имеющих в первичной опухоли, что способствовало улучшению безметастатической выживаемости больных. Установлено, что назначение НАХТ наиболее целесообразно у пациентов с наличием в первичной опухоли двух и более потенциальных метастатических клонов, в то время как при 0–1 клоне проведение химиотерапии в предоперационном режиме не показано.

Работа поддержана грантом РФФ № 17-15-01203.

Литература

1. Weigelt B., Baehner F.L., Reis-Filho J.S. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade // *The Journal of pathology*. 2010. V. 220, № 2. P. 263–280.
2. Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Litviakov N.V. Natural and chemotherapy-induced clonal evolution of tumors // *Biochemistry (Moscow)*. 2017. V. 82, № 4. P. 413–425.

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ ИНТРАПЕРИТОНЕАЛЬНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ В КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ ДИССЕМИНИРОВАННОГО РАКА ЖЕЛУДКА

В.А. Маркович, С.А. Тузиков, Н.В. Литвяков, Н.О. Попова

НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

Одной из приоритетных задач стратегии развития медицины до 2025 г. является разработка технологий персонализированной лечебной помощи для адекватного подбора лечебной тактики и мониторинга течения заболевания. При этом индивидуализация лечения злокачественных опухолей должна быть основана не только на совершенствовании хирургической техники, но и на изучении молекулярно-генетических и гуморальных механизмов развития патологического процесса, а также на анализе особенностей индивидуальной чувствительности каждого пациента к выбранному методу лечения.

Рак желудка остается одним из самых распространенных злокачественных новообразований в мире, характеризующихся высокими показателями заболеваемости и смертности. Ежегодно регистрируется около 1 млн новых случаев и 730 тыс. смертей от данной патологии [1].

Согласно данным ВОЗ, рак желудка по распространенности среди злокачественных новообразований занимает второе место в мире, уступая лишь раку легкого, и по-прежнему остается ведущей причиной смертности от онкологической патологии во всем мире. Каждый год в России регистрируется 48,8 тыс. новых случаев рака желудка, что составляет немногим более 11% от всех злокачественных опухолей; примерно 45 тыс. больных умирают от

рака желудка ежегодно [2]. На момент обращения около 70% больных имеют местно распространенный опухолевый процесс, у 60–90% больных выявляют заболелание в III–IV стадии, при этом удельный вес IV стадии не имеет тенденции к снижению и составляет 50–60% [3].

Одним из частых вариантов прогрессирования рака желудка является канцероматоз с поражением опухолевыми клетками серозных оболочек – брюшины, сальника. Опухоли желудочно-кишечного тракта осложняются канцероматозом в 30–40% случаев [4, 5]. В большинстве случаев распространение злокачественных клеток по брюшине рассматривается как неблагоприятный прогностический фактор, данная форма прогрессирования опухолей практически не поддается хирургической коррекции, а существующие подходы в химиотерапии способны лишь на незначительное время облегчить состояние больного [6].

Основным методом лечения рака желудка остается хирургический метод [7].

Основными методами лечения диссеминированного рака желудка являются паллиативная химиотерапия и оперативное лечение по экстренным показаниям в объеме наложения обходных анастомозов, если это возможно, либо паллиативных резекций желудка при высоком риске или развившемся

ся кровотечении, опухолевом стенозе, при этом не требуется лимфодиссекция. Большинство онкологов считают, что выполнение перитонеэктомии и паллиативных операций (гастрэктомия, субтотальная дистальная резекция желудка) при диссеминированном раке желудка нецелесообразно и неэффективно.

Успехи химиотерапии рака желудка в настоящее время скромны, однако данный вид лечения увеличивает продолжительность жизни у больных метастатическим процессом с 3–5 до 10–12 мес [8]. Так, при диссеминации опухоли по брюшине, когда очаги отсева недоступны действию цитостатиков, вследствие слабой васкуляризации, внутрибрюшной путь введения химиопрепарата незаменим. При использовании данного способа введения цисплатины удается достичь высоких градиентов концентрации между интраперитонеальным уровнем и уровнем препарата в плазме на длительный срок [9].

Несмотря на все возможности современной терапии, в том числе связанные с применением трастузумаба у больных с гиперэкспрессией HER2, продолжительность жизни больных метастатическим раком желудка составляет около 1 года [10, 11].

В настоящее время цитостатическая терапия активно используется в предоперационном режиме. Это продиктовано, во-первых, стремлением к уменьшению объема первичной опухоли, что создает более благоприятные условия для выполнения операций, во-вторых, определением чувствительности первичной опухоли к проводимой химиотерапии *in vivo*, что позволяет адекватно планировать лечение в послеоперационном режиме [12].

По мнению некоторых современных ученых, большой интерес представляют молекулярно-генетические исследования, направленные на выявление и изучение различных мутаций генов в клетках опухоли. Большие перспективы имеет индивидуальный подход в назначении химиотерапии, основанный на результатах молекулярно-генетического исследования и определения чувствительности клеток опухоли к химиопрепаратам. Данный подход мало изучен, но, несмотря на это, имеет большие шансы стать основным в лечении рака. На данный момент в литературе подробно описано влияние работы ABC-транспортеров на химиорезистентность новообразований на модели рака молочной железы.

Одним из механизмов, который обеспечивает резистентность опухолей и, в частности, опухолей желудка к химиотерапии, является множественная лекарственная устойчивость, обусловленная работой генов ABC-транспортеров. Активация выброса противоопухолевых препаратов из клеток при участии ABC-транспортеров является одной из наиболее частых и универсальных причин развития множественной лекарственной резистентности (MultiDrug Resistance, MDR). На раке молочной железы было показано, что опухоли с делециями генов ABC являются чувствительными к химиотерапии, в то время

как нормальное состояние аппарата ABC-транспортеров обуславливает устойчивость к лечению [13].

При раке желудка исследований значения делеций ABC-транспортеров для эффективности химиотерапии еще не проводилось. Даже в случае высокой вероятности достижения объективного ответа опухоли на предоперационную химиотерапию, нерешенной остается проблема выбора схемы лечения. С этих позиций исследуется значение определенных молекулярно-генетических характеристик опухоли, претендующих на роль маркеров монорезистентности. К ним относятся гены-мишени действия химиопрепаратов и (или) гены, продукты которых участвуют в метаболической внутриклеточной активации конкретного цитостатика.

Литература

1. *Jemal A., Bray F., Center M.M. et al.* Global Cancer Statistics // *CA Cancer J. Clin.* 2011. V. 61. P. 69–90.
2. *Чиссов В.И.* Современное состояние онкологии и перспективы ее развития // *Российский онкологический журнал.* № 4. С. 50–54.
3. *Чиссов В.И., Вашакмадзе Л.А., Бутенко А.В. и др.* Возможности хирургического лечения резектабельного рака желудка IV стадии // *Российский онкологический журнал.* 2003. № 6. С. 4–7.
4. *Sugarbaker P.H.* Cytoreduction including total gastrectomy for pseudomyxoma peritonei // *Brit. J. Surg.* 2002. V. 89. P. 208–212.
5. *Jacquet P., Vidal-Jove J., Zhu B., Sugarbaker P.* Peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal malignancy: natural history and new prospects for management // *Acta Chir. Belg.* 1994. V. 94 (4). P. 191–197.
6. *Степанов И.В., Падеров Ю.М., Афанасьев С.Г.* Перитонеальный канцероматоз // *Сибирский онкологический журнал.* 2014. № 5. С. 45–53.
7. *Kajihara K., Ishikawa H., Akama F. et al.* A case of advanced gastric cancer with Virchow's metastasis responding remarkably to combination chemotherapy of low-dose CDDP and 5-FU // *Gan To Kagaku Ryoho.* 1998. V. 25, № 4. P. 585–588.
8. *Тюляндин С.А.* Химиотерапия рака желудка // *Практическая онкология.* 2001. № 3. С. 44–52.
9. *Попов Д.Н.* Комбинированное лечение рака желудка IV стадии: дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2005. 181 с.
10. *Power D.G., Kelsen D.P., Shah M.A.* Advanced gastric cancer: Slow but steady progress // *Cancer Treat. Rev.* 2010. V. 36. P. 384–392.
11. *Bang Y.J., Van Cutsem E., Feyereislova A. et al.* Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of Her2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial // *Lancet.* 2010. V. 376. P. 687–697.
12. *Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М., Красулина Н.А. и др.* Неоадьювантная химиотерапия при раке молочной железы // *Сибирский онкологический журнал.* 2005. № 2 (14). С. 63.
13. *Богуш Т.А., Равчеева А.Б., Конухова А.В. и др.* Новый подход к оценке функциональной активности ABC-транспортеров, контролирующих внутриклеточное распределение противоопухолевых препаратов, методом проточной цитофлюориметрии // *Доклады АН.* 2005. Т. 405, № 5. С. 682–685.

АНАЛИЗ АССОЦИИ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА rs1946518 В ГЕНЕ *IL18* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РАКА ЯИЧНИКОВ

Э.Т. Мингажева¹, Д.С. Прокофьева¹, Д.Д. Сакаева², Э.К. Хуснутдинова^{1,3}

¹ Башкирский государственный университет, г. Уфа

² Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Уфа

³ Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Рак яичников (РЯ) является одной из наиболее агрессивных гинекологических опухолей и стойко занимает одно из лидирующих мест среди причин смертности от онкопатологий. Ежегодно в мире регистрируются более 238 тыс. новых случаев заболевания, половина из которых заканчиваются летальным исходом. Аналогичная ситуация складывается и в России [1]. Важной особенностью рака яичников является то, что продолжительное время он протекает без выраженных симптомов и, как правило, диагностируется на поздних стадиях развития (III–IV), когда общая 5-летняя выживаемость пациентов не превышает 45%.

Рак яичников является распространенным многофакторным заболеванием. Существенным фактором риска данной патологии выступает наследственная предрасположенность. В первую очередь развитие РЯ ассоциировано с мажорными мутациями в высокопенетрантных генах *BRCA1* и *BRCA2*, белковые продукты которых являются ключевыми участниками сигнального пути клетки в ответ на воздействие ионизирующей радиации. Однако нарушения в этих генах объясняют не более 15% всех случаев заболевания. В последнее время важная роль в возникновении и прогрессии злокачественных опухолей яичников отводится компонентам иммунной системы.

Интерлейкин 18 (*IL18*) – один из основных иммунорегуляторных цитокинов, играющий важную роль в противоопухолевой защите организма. У человека ген *IL18* расположен на хромосоме 11 (11q22.2-q22.3) и состоит из шести экзонов и пяти интронов [2]. Наиболее изученным полиморфным вариантом, влияющим на экспрессию гена *IL18*, является *rs1946518* (-607C>A). Замена C>A в позиции -607 в промоторном регионе данного гена приводит к снижению транскрипционной активности гена *IL18* и, соответственно, к пониженному синтезу белка [3]. Согласно ряду исследований, обнаружена ассоциация данного полиморфного локуса с риском развития различных патологических процессов, включая ревматоидный артрит, гепатит С и некоторые виды опухолей [4–6].

Целью данной работы явилось изучение ассоциации полиморфного варианта *rs1946518* (-607C>A) в гене *IL18* с риском развития рака яичников у женщин из Республики Башкортостан.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 286 больных раком яичников и 228 здоровых индивидов. Идентификация аллелей полиморфного локуса *rs1946518* гена *IL18* выполнена методом аллель-специфичной ПЦР.

Результаты

В результате сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса *rs1946518* в гене *IL18* между группой больных раком яичников и контрольной группой выявлена ассоциация гетерозиготного генотипа AC с повышенным риском развития заболевания: $OR = 1,67$, 95% CI: 1,17–2,39, $p = 0,009$. Также была обнаружена ассоциация данного полиморфного варианта с риском развития РЯ в рецессивной модели наследования (AA vs AC+CC): $OR = 0,49$, 95% CI: 0,26–0,93, $p = 0,03$.

В 2014 г. L.K. Back с соавт. [6] провели ассоциативный анализ полиморфного локуса *rs1946518* в гене *IL18* с риском развития рака молочной железы у бразильянок и установили, что гомозиготный генотип AA значительно чаще встречается у больных по сравнению со здоровыми индивидами: $OR = 2,843$, 95% CI: 1,360–5,986, $p = 0,005$. Аналогичное исследование было проведено в 2012 г. M. Taheri с соавт. [7] в иранской популяции, однако ассоциации однонуклеотидной замены -607C/A с раком молочной железы обнаружено не было. Данные описанных исследований не согласуются с нашими результатами, что, вероятно, связано с наличием существенных различий в распределении частот аллелей и генотипов между разными популяциями и регионами мира. В работе P. Sáenz-López с соавт., [8] посвященной изучению влияния полиморфного варианта *rs1946518* на клинические симптомы пациентов с карциномой почек, была выявлена ассоциация гомозиготного генотипа CC с размером ($OR = 3,35$, 95% CI: 1,60–7,02, $p = 0,001$), стадией ($OR = 3,60$, 95% CI: 1,70–7,64, $p = 0,001$), степенью злокачественности опухоли ($OR = 3,40$, 95% CI: 1,06–10,76, $p = 0,030$) и наличием метастазов ($OR = 2,70$, 95% CI: 1,22–5,96, $p = 0,012$). Наши данные указывают на то, что генотип, содержащий аллель C, ассоциирован с повышенным риском рака яичников.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об ассоциации полиморфного варианта *rs1946518* в гене *IL18* с риском развития рака яичников у женщин из Республики Башкортостан.

Литература

1. GLOBOCAN 2012. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. URL: <http://globocan.iarc.fr>. (дата обращения: 05.10.2016).
2. Rothe H., Jenkins N.A., Copeland N.G., Kolb H. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGF, which is located near Idd2 // J. Clin. Invest. 1997. V. 99. P. 469–474.
3. Giedraitis V., He B., Huang W.X., Hillert J. Cloning and mutation analysis of the human *IL-18* promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation // J. Neuroimmunol. 2001. V. 112 (1–2). P. 146–152.

4. Cai L.P., Zhou L.J., Lu S.Y. et al. Association of *IL-18* promoter gene polymorphisms with rheumatoid arthritis: a meta-analysis // *Mol. Biol. Rep.* 2014. V. 41 (12). P. 8211–8217.
5. Santos K.N., Almeida M.K., Fecury A.A. et al. Analysis of polymorphisms in the interleukin 18 gene promoter (-137 G/C and -607 C/A) in patients infected with hepatitis C virus from the Brazilian amazon // *Arq. Gastroenterol.* 2015. V. 52 (3). P. 222–227.
6. Back L.K., Farias T.D., da Cunha P.A. et al. Functional polymorphisms of interleukin-18 gene and risk of breast cancer in a Brazilian population // *Tissue Antigens.* 2014. V. 84 (2). P. 229–233.
7. Taheri M., Hashemi M., Eskandari-Nasab E. et al. Association of -607 C/A polymorphism of *IL-18* gene (rs1946518) with breast cancer risk in Zahedan, Southeast Iran // *Prague Med. Rep.* 2012. V. 113 (3). P. 217–222.
8. Sáenz-López P., Carretero R., Vazquez F. et al. Impact of interleukin-18 polymorphisms-607 and -137 on clinical characteristics of renal cell carcinoma patients // *Hum. Immunol.* 2010. V. 71 (3). P. 309–313.

ОНКОГЕННАЯ НКРНК HOTAIR ОБЕСПЕЧИВАЕТ ГЕННУЮ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПРОФИЛЕЙ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ

Е.А. Москалев^{1,2}, И.В. Буре^{1,3}, С. Геер¹, Я. Кнопф¹, А. Хартманн¹, Ф. Халлер¹, И.Н. Лебедев²

¹ Институт патологии, Университет им. Фридриха–Александра в Эрлангене и Нюрнберге, г. Эрланген, Германия

² НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, г. Москва, Россия

Обратимость эпигенетических модификаций генома является основой для эпигенетической противоопухолевой терапии. Принципиальная возможность нормализации опухолевого фенотипа показана даже при сохранении онкогенных мутаций в репрограммированных неопластических клетках, сопровождающихся эпигенетическими изменениями. Однако важным недостатком применяемых эпигенетически активных препаратов является неспецифичность индуцируемых ими изменений. Например, изменения профилей метилирования ДНК под действием ингибиторов ДНК-метилтрансфераз происходят в целом геноме и могут иметь побочные эффекты.

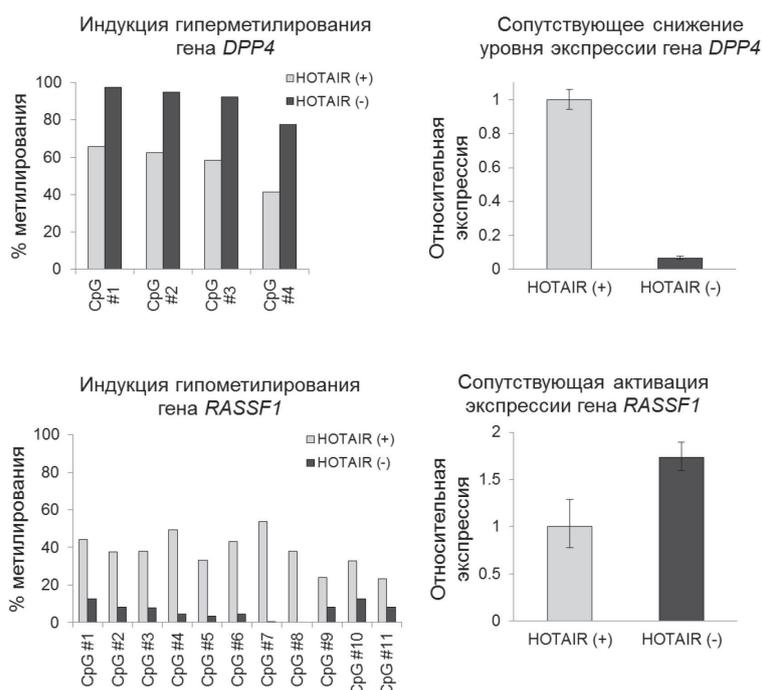
Значительно более эффективным подходом могла бы стать направленная индукция желаемых эпигенетических изменений в функционально важных для опухоли генах. Поскольку изменения эпигенетического состояния множества онкоассоциированных генов происходят скоординированно в ходе развития опухоли, разработка способов таргетной эпигенетической терапии должна опираться на понимание молекулярных механизмов, обеспечивающих их генную специфичность.

В данной работе, используя гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) в качестве модели, мы предположили, что ряд опухолеспецифичных профилей метилирования ДНК может быть индуцирован описанной ранее онкогенной длинной некодирующей РНК (нкРНК) HOTAIR. Данный транскрипт был выбран в качестве примера в связи с его ранее установленной способностью рекрутировать репрессорный комплекс белков группы поликомб 2 (PRC2) ко множеству геномных локусов, обуславливающий репрессивное метилирование H3K27me₃, функциональность которого проявляется в более агрессивном фенотипе опухолей с повышенным уровнем экспрессии HOTAIR. Учитывая физическое взаимодействие комплекса PRC2 и ДНК-метилтрансфераз, мы предположили, что не только гистоновые модификации, но и ряд наблюдаемых аномалий CpG-метилирования при ГИСО может

быть обусловлен aberrантной экспрессией нкРНК HOTAIR.

Для проверки данной гипотезы была выбрана клеточная модель ГИСО GIST-T1 с многократно повышенным уровнем экспрессии нкРНК HOTAIR по сравнению с контрольной клеточной линией MCF7. Предполагаемое влияние HOTAIR на профили метилирования ДНК в клетках GIST-T1 было изучено с помощью стабильного нокдауна данного транскрипта посредством конститутивной экспрессии соответствующей shRNA с лентивирусного вектора pRS19 и последующей оценки изменений уровня CpG-метилирования в масштабе целого генома с помощью метилочипов Infinium HumanMethylation450 Beadchip (Illumina, США). Полученный массив данных, отражающих степень метилирования в каждом из 485 тыс. потенциально метилируемых остатков цитидина, был обработан в программе RnBeads. Валидация отдельных генов-кандидатов была проведена с помощью бисульфитного пиросеквенирования. Функциональность изменений CpG-метилирования оценивали, измеряя уровень экспрессии генов с помощью количественной ОТ-ПЦР.

Действительно, нокдаун HOTAIR индуцировал в клетках значительные изменения профилей метилирования ДНК, которые были разнонаправленными. Так, произошла индукция гипометилирования 51 и гиперметилирования 100 CpG-динуклеотидов в генах важных функциональных групп. Наблюдаемые изменения профилей метилирования ДНК были полностью подтверждены с помощью бисульфитного пиросеквенирования, которое также позволило расширить анализ на большее число CpG-динуклеотидов (рисунок). Например, деплеция HOTAIR приводила к существенному росту процента CpG-метилирования в гене фермента дипептидилпептидазы 4 (*DPP4*), вовлеченного в протеолиз внеклеточного матрикса (клеточная миграция, инвазия), что сопровождалось значительным снижением его экспрессии. Напротив, практически полное деметилирование наблюдалось в гене опухолевой супрессии *RASSF1* на фоне нокдауна HOTAIR, что приводило к его активации.



Уровень метилирования CpG-сайтов генов *DPP4* и *RASSF1* и соответствующие им уровни экспрессии генов в зависимости от функционирования HOTAIR

Таким образом, впервые установлена роль нкРНК HOTAIR как одного из факторов, обуславливающих генную специфичность ряда аномалий метилирования ДНК при ГИСО. Молекулярный механизм, посредством которого HOTAIR индуцирует разна-

правленные эпигенетические изменения (гипо- и гиперметилирование) в разных генах, требует дальнейшего изучения. Его понимание может стать основой для разработки способов направленного изменения опухолевого метилома с терапевтическими целями.

РОЛЬ N-ЭТИЛМАЛЕИМИДА В УПРАВЛЕНИИ АПОПТОЗОМ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ P19

Д.С. Орлов^{1,2}, Н.В. Рязанцева^{3,4}, Е.А. Степовая¹,
О.Л. Носарева¹, Е.В. Шахристова¹, В.В. Иванов¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск

² НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

³ Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск

⁴ Сибирский федеральный университет, г. Красноярск

Формирующаяся в процессе опухолевой прогрессии гипоксия приводит к изменению внутриклеточного редокс-статуса. Важную роль в определении судьбы клетки в таких условиях играют факторы транскрипции, активирующие экспрессию как про-, так и анти-апоптотических генов. Целью настоящего исследования являлось изучение влияния N-этилмалеимида (NEM) на редокс-зависимую регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии P19, культивируемых при нормальном и сниженном поступлении кислорода.

В качестве материала исследования использовалась культура опухолевых клеток линии P19 (тератокарцинома мыши). Моделирование гипоксии осуществляли в камере Huroxia Incubator Chamber с помощью газовой смеси (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂). В качестве блокатора SH-групп пептидов и белков использовали NEM. Количество клеток, вступивших в апоптоз, оценивали аннексиновым методом с использованием проточного цитофлуориметра. Концентрацию восстановленного (GSH), окисленного (GSSG),

а также белково-связанного глутатиона (белок-SSG) измеряли спектрофотометрическими методами. Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы SPSS 17.0, проверку нормальности распределения количественных показателей – с использованием критерия Шапиро–Уилка. Статистическую значимость различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Уровень значимости *p* принимали равным 0,05.

Величина соотношения GSH/GSSG считается одним из основных показателей внутриклеточного редокс-статуса. Культивирование опухолевых клеток линии P19 в условиях гипоксии приводило к уменьшению величины отношения концентраций восстановленного и окисленного глутатиона в 1,8 раза по сравнению с нормоксией. Изменение внутриклеточного редокс-гомеостаза приводило при этом к увеличению концентрации белково-связанного глутатиона в клетках в 3,5 раза, что сопровождалось увеличением в культуре количества клеток, вступивших в апоптоз, в 4,1 раза.

При добавлении блокатора сульфгидрильных групп в среду для культивирования отношение GSH/GSSG в опухолевых клетках линии P19 снижалось как при нормоксии, так и при гипоксии. При этом концентрация белково-связанного глутатиона повышалась только в условиях нормоксии. Воздействие NEM значительно увеличивало число аннексин-позитивных клеток в условиях и нормального, и сниженного поступления кислорода.

Одним из механизмов запуска запрограммированной гибели клеток является изменение активности факторов транскрипции. Характерной чертой

редокс-чувствительных белков (к ним относятся p53, AP-1, NF-κB) является наличие в структуре остатков аминокислоты цистеина, подверженного глутатионилированию. Образование смешанных дисульфидов с глутатионом приводит к изменению связывания транскрипционных факторов с ДНК, а следовательно, регулированию экспрессии генов-мишеней.

Исследования выполнены в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (грант № МК-1742.2017.7).

ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВАРИАЦИЙ В ГЕНЕ *TP53* У ЖЕНЩИН, БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ИЗ КОГОРТЫ Р. ТЕЧА

В.П. Пушкарев, А.В. Возилова

Уральский научно-практический центр радиационной медицины, г. Челябинск

Ген *TP53* расположен на коротком плече хромосомы 17 человека и кодирует белок-онкосупрессор, который принимает участие в клеточных ответах на стрессы эндогенного и экзогенного характера. Ген содержит 22 тыс. пар нуклеотидов, представлен 11 экзонами, которые кодируют 2,2 kb мРНК. При отсутствии повреждений ДНК экспрессия гена *TP53* минимальна. В зависимости от условий роста клетки, типа и качества стресса *TP53* активирует разные участки генов-мишеней, участвующих в апоптозе, аресте клеточного цикла, в репарации поврежденной ДНК или в дифференциации.

Целью нашего исследования был поиск вариантов последовательности гена *TP53* у женщин, подвергшихся хроническому облучению на Южном Урале, имеющих рак молочной железы (РМЖ), и у женщин, не имеющих онкопатологии.

Дизайн исследования: I группа – женщины с РМЖ в анамнезе (дозы на КKM 2–146 сГр). II группа – женщины аналогичного возраста, подвергшиеся облучению (дозы на КKM 2–326 сГр), но не имеющие онкозаболеваний в анамнезе.

Методы исследования

ДНК экстрагировали из крови с помощью органической экстракции. Образцы ДНК оценивали с помощью Nano Drop 2000. Последовательности 15 пар праймеров для амплификации фрагментов гена *TP53*, охватывающих 2–11-е экзоны, подбира-

ли с помощью Primer Designer Tool (Thermo Fisher Scientific (TFS), США). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в термоциклере C1000 (Bio-Rad, США). Наличие ампликонов после ПЦР проверяли на 2%-м агарозном геле-электрофорезе. Ампликоны чистили с помощью Exo SAP (GMLAG, Швейцария). Секвенирующие реакции ставили с помощью Big Dye Terminator 3.1 (TFS, США). Продукты секвенирующей реакции чистили с помощью Big Dye Xterminator (TFS, США). Продукты секвенирующей реакции разделяли на генетическом анализаторе 3500 (TFS). Последовательности гена *TP53* обследованных женщин сравнивали с референтной последовательностью (NG_017013.2), генетические вариации (замены, делеции, инсерции) во 2–11-й экзонах искали с помощью программы SeqScape® Software (TFS, США). В раздел NTVariants были внесены 120 клинически значимых мутаций (SNP, инсерции и делеции).

Заключение

В геномной ДНК большинства обследованных женщин не были выявлены клинически значимые мутации в экзонах 2–11 гена *TP53*. В одном образце ДНК выявлено две мутации, которые могут оказывать существенное влияние на функцию гена *TP53* – сдвиг рамки считывания и нонсенс-мутация, приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона.

ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В ТКАНИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: СВЯЗЬ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ

**Л.В. Спирина^{1,2}, Н.В. Тарасенко^{2,3}, А.К. Горбунов¹,
И.В. Кондакова¹, Е.М. Слонимская^{1,2}, Е.А. Усынин¹**

¹ НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

² Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск

³ НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

Рак предстательной железы (РПЖ) является одной из самых распространенных опухолей среди мужчин. Известно, что ответ опухоли на прово-

димое комбинированное лечение регистрируется более чем у 90% пациентов с метастатическим РМЖ.

Цель проведенного исследования заключалась в изучении экспрессии транскрипционного фактора *Vpn-3a*, *AR*, *ERa* в процессах развития рака предстательной железы в связи с уровнем активации АКТ/mTOR сигнального пути.

Материалы и методы

В исследование были включены 50 больных местно-распространенным РПЖ, прошедших стандартное лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ. Определение уровня экспрессии генов *Vpn-3a*, *AR*, *ERa* и компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути оценивали при помощи ПЦР в реальном времени.

Результаты

Показано увеличение экспрессии ядерного белка *Vpn-3a* с развитием РПЖ, что связано с возрастанием уровня *ERa* и активацией АКТ/m-TOR сигнального каскада. Отмечено снижение экспрессии *Vpn-3a* и *4E-BP1* у пациентов с кастрационно-рефрактерным раком предстательной железы. Принимая во внимание тесные связи между ядерным фактором *Vpn-3a* и рецепторами стероидных гормонов, становится понятной также полученная зависимость между экспрессией данного транскрипционного фактора и

уровнем мРНК *AR* ($r = 0,28$; $p = 0,018$). Эти изменения наиболее выражены при развитии инвазивного роста опухоли, когда они касались уровня экспрессии *AR* и *ER*. У больных с наличием инвазивного роста отмечено увеличение их экспрессии в 1,78 и 3,9 раза соответственно, по сравнению с пациентами без инвазии. Также распространение опухоли и наличие инвазии в семенные пузырьки приводило к снижению уровня активации АКТ/m-TOR сигнального пути на фоне повышения экспрессии *PTEN*. Выявлено снижение уровня мРНК *m-TOR* в 135,6 раза на фоне роста экспрессии фосфатазы в 2,19 раза у больных с инвазией в семенные пузырьки.

Выявлены связи между индексом Глисона и уровнем мРНК изучаемых молекулярных маркеров. Снижение экспрессии *AKT*, *GSK-3b* на фоне возрастания уровня мРНК *4E-BP1* наблюдалось по мере снижения степени дифференцировки опухоли. Такие измерения происходили на фоне гиперэкспрессии фосфатазы *PTEN*.

Заключение

Представленные факты, отражающие особенности изменений биологических свойств опухоли, вероятно, могут составлять основу молекулярной панели для прогноза течения и эффективности терапии РПЖ.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕРВИСА xGENCloud ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ NGS ПО ОНКОГЕНЕТИКЕ

И. Угаров^{1,2}, В. Черных^{2,3}, О. Новоселова^{2,3}, И. Шаркова^{2,3}, А. Шарков², Н. Иванов²

¹ Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, г. Москва

² ООО «эксДжен Сайбернетикс», г. Москва

³ Медико-генетический научный центр, г. Москва

Колоссальный объем генетической информации, сложности в интерпретации, научном и практическом использовании результатов полноэкзомного и полногеномного секвенирования для онкологических заболеваний требуют разработки и использования специализированных компьютерных программ.

Материалы и методы

Для наполнения базы знаний экспертной системы xGenCloud использованы доступные публичные источники сети Интернет. Для формирования каталога моногенных заболеваний использовали информацию из каталога менделирующих состояний OMIM. Сведения о патогенности мутаций взяты из ClinVar. Для формирования тестовых примеров была использована онкопанель TruSight Cancer от Illumina.

Результаты

Разработана структура заключения, представленная следующими разделами: вводная информация об интерпретации генетического исследования, описание панели, критерии ранжирования изменений по патогенности, перечень патогенных мутаций и ассоциированных с ними моногенных и

многофакторных заболеваний, суммарная оценка рисков, рекомендации по дополнительным лабораторным тестам и инструментальным процедурам, консультациям врачей, список литературы, перечень выявленных изменений. База знаний позволяет интерпретировать патогенный эффект около 20 тыс. герминативных и соматических мутаций, приводящих к развитию более 800 моногенных синдромов, для которых характерны опухолевые процессы. За счет автоматизации процесса удалось сократить время анализа выявленных изменений и формирования заключения от 3–5 ч, требующихся ранее специалисту, до 5–10 мин в зависимости от количества патогенных мутаций.

Заключение

Использование сервиса xGenCloud при интерпретации полученных результатов NGS позволяет значительно оптимизировать работу врача и, следовательно, повысить эффективность медико-генетического консультирования пациентов, в том числе с онкологическими заболеваниями. Однако автоматизация клинической интерпретации требует дальнейшего улучшения и отдельной разработки алгоритмов ранжирования заболеваний по рискам, которая будет продолжением данной работы.

Раздел 5

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ОСОБЕННОСТИ СПЕКТРА МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *CFTR* У РОССИЙСКИХ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ

Т.А. Адян¹, А.А. Степанова¹, С.А. Красовский^{1,2}, А.В. Поляков¹

¹ Медико-генетический научный центр, г. Москва

² Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России, г. Москва

Муковисцидоз (МВ) – одно из самых частых наследственных аутосомно-рецессивных заболеваний среди представителей белой расы. Оно характеризуется системным поражением желез внутренней секреции, имеет тяжелое прогрессирующее течение и значительно снижает качество и продолжительность жизни больных. Молекулярно-генетическая причина МВ – мутации гена *CFTR*, расположенного в локусе 7q31.2 и участвующего в создании регулируемого цАМФ хлорного канала на поверхности эпителиальных клеток. На данный момент описано около 2 тыс. мутаций в гене *CFTR*.

Общеизвестно, что профиль мутаций в гене *CFTR* весьма вариабелен и широко изменяется в зависимости от географического положения и этнического происхождения. С целью выявления наиболее частых мутаций, характерных для российских больных, и создания высокоинформативной диагностической панели проведен анализ 40 мутаций в гене *CFTR* в выборке из 408 больных МВ из различных регионов РФ. Выбор мутаций основан на данных литературы, а также данных Российского Регистра больных МВ 2014 г. Для регистрации точковых мутаций использовали метод мультиплексного ал-

лель-специфичного лигирования с последующей амплификацией multiplex ligation probe-dependent amplification (MLPA), небольшие инсерционно-делеционные мутации анализировались методом ПДАФ.

В ходе исследования выявлено 35 из 40 проанализированных мутаций. Всего идентифицировано 711 мутантных аллелей. Наиболее частой оказалась мутация F508del (53,6%), второй по частоте – мажорная среди чувашских больных МВ мутация E92K (6,6%), третьей – славянская мутация CFTRdele2,3 (21kb) (5,3%). Мутации I507del, 3849G>A, G551D, 3272-26A>G, 4022insT не встретились ни на одной из хромосом (таблица). У 323 больных мутации были выявлены на обеих хромосомах, у 85 – на одной хромосоме.

Суммарная информативность анализа 40 мутаций в выборке больных МВ составила 92,1%, что позволяет выявлять хотя бы одну мутацию в гене *CFTR* у 99,37% больных и обе мутации – у 85% больных.

Помимо основного исследования в настоящей работе проведен сравнительный анализ частот встречаемости 40 наиболее частых мутаций гена *CFTR* в выборках детей и взрослых, больных МВ. В результате установлено, что мутации W1310X и

Суммарная информативность 40 проанализированных в гене *CFTR* мутаций в выборке больных МВ

Мутация (традиционное название)	Число хромосом	Аллельная частота, %	Мутация (традиционное название)	Число хромосом	Аллельная частота, %
F508del	414	53,6	4015delA	3	0,4
E92K	51	6,6	S1196X	2	0,3
CFTRdele2,3 (21kb)	41	5,3	S945L	2	0,3
1677delTA	23	3,0	R347P	2	0,3
3849+10kbC>T	22	2,8	1367del5	2	0,3
W1282X	18	2,3	3821delT	2	0,3
2143delT	17	2,2	604insA	1	0,1
N1303K	16	2,1	621+1G>T	1	0,1
2184insA	14	1,8	712-1G>T	1	0,1
L138ins	14	1,8	R553X	1	0,1
3272-16T>A	10	1,3	S1159P	1	0,1
394delTT	8	1,0	G85E	1	0,1
G542X	8	1,0	3120+1G>A	1	0,1
W1282R	7	0,9	CFTRdup6b-10	1	0,1
S466X	5	0,6	3944delGT	1	0,1
R1066C	5	0,6	I507del	0	0,0
2789+5G>A	5	0,6	3849G>A	0	0,0
R334W	4	0,5	G551D	0	0,0
W1310X	4	0,5	3272-26A>G	0	0,0
1898+1G>A	3	0,4	4022insT	0	0,0
Всего				711	92,1

1677delTA в выборке взрослых больных МВ встретились значительно реже, чем у детей (0 и 0,58% против 0,48 и 3,1% соответственно); мутации 3849+10kbC>T, R334W и 3849G>A в выборке взрослых больных МВ встретились значительно чаще, чем у детей (5,93% и 1,7%, 1,05% и 0,2%, 0,67% и 0% соответственно).

Известно, что фенотип и тяжесть течения МВ во многом определяются видом повреждения гена *CFTR*. Так, мутации W1310X и 1677delTA считаются «тяжелыми», обуславливающими тяжелые формы МВ; мутации 3849+10kbC>T, R334W и 3849G>A считаются «мягкими», обуславливая относительно доброкачественные формы заболевания с более поздним дебютом.

Таким образом, особенностями спектра мутаций гена *CFTR* у российских больных МВ являются меньшая частота преобладающих в мире мутаций, таких как F508del, G542X, N1303K и др., единичная встречаемость мутаций G551D, 1717-1G>A, I507del

и др., и наоборот – более высокая частота мутаций, являющихся относительно редкими в западноевропейских странах: CFTRdele2,3, E92K, 2184insA, 2143delT, 1677delTA, L138ins. Наряду с качественными различиями спектра мутаций установлена более высокая встречаемость «мягких» мутаций и, соответственно, «мягких» фенотипов в России по сравнению со странами Европы. Очевидно, что большинство наиболее частых мутаций в гене *CFTR* для РФ уже известны, и маловероятно, что при дальнейших исследованиях будут выявлены такие мутации, чей вклад в общий спектр окажется на удивление значимым (если только предположить существование некоего изолята со своими генетическими особенностями). Кроме того, показано, что спектр мутаций в гене *CFTR* варьирующ в группах детей и взрослых, больных МВ: у взрослых пациентов статистически значимо чаще выявляются «мягкие» мутации по сравнению с детьми.

АНАЛИЗ ГЕТЕРОЗИГОТНОГО НОСИТЕЛЬСТВА МУТАЦИЙ P.Arg408Trp, P.Arg261Gln И P.ARG261X ГЕНА ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗЫ (PAH) В ПОПУЛЯЦИЯХ ЕВРАЗИИ

В.Л. Ахметова¹, Р.И. Хусаинова^{1,2}, С.С. Литвинов¹, Э.К. Хуснутдинова^{1,2}

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

² Башкирский государственный университет, г. Уфа

Мутации в гене фенилаланингидроксилазы (PAH) приводят к тяжелому аутосомно-рецессивному заболеванию – фенилкетонурии (ФКУ), частота которой существенно варьирует в различных регионах и этнических группах, составляя в среднем 1 на 15 000 новорожденных [1]. В настоящее время в гене PAH выявлено более 950 различных мутаций [2] с наличием мажорных, происхождение которых связывают с определенными этническими группами и их миграциями, как, например, демонстрирующая восточно-западную клинальную изменчивость миссенс-мутация p.Arg408Trp, предположительно, имеющая балто-славянское происхождение и распространенная по всему миру с преобладанием у больных ФКУ из Европы и крайне редкой встречаемостью у таковых из стран Азии [3, 4]. Наличие мажорных мутаций значительно облегчает и ускоряет молекулярную диагностику заболевания и определение гетерозиготных носителей мутантных аллелей, что важно для медико-генетического консультирования членов семьи больного и прогнозирования ФКУ у их потомства, а изучение распространенности таких мутаций в различных популяциях мира позволяет оценить генетический груз в них и определить причину и источник происхождения как данных мутаций, так и самого заболевания.

Целью настоящей работы является исследование частоты гетерозиготного носительства мутаций p.Arg408Trp, p.Arg261Gln и p.Arg261X гена PAH в отдельных этнических группах Евразии.

Материал исследования

Материалом для исследования послужил 3 951 образец ДНК коренных жителей из 58 этнических групп России, Белоруссии, Украины, Молдавии, Ка-

захстана, Узбекистана и Монголии. Образцы были собраны в период с 2000 по 2014 г. во время экспедиционных выездов. В популяционные выборки на основании анкетирования включены практически здоровые неродственные совершеннолетние индивиды, этническая принадлежность которых устанавливалась до третьего поколения и от которых были получены информированные согласия на участие в научном исследовании.

Результаты

Скрининг мутации p.Arg408Trp гена PAH проведен у 2 652 практически здоровых индивидов из 37 различных популяций Евразии, в 14 из которых она была выявлена с частотой гетерозиготного носительства, варьирующей от 0,0083 у русских из Белгородской области до 0,0417 у марийцев из Мишкинского района Республики Башкортостан (РБ).

При анализе гетерозиготного носительства данной мутации в популяциях Евразии в зависимости от их территориальной локализации показано, что из 20 изученных этнических групп Волго-Уральского региона (ВУР) мутация p.Arg408Trp обнаружена в 9, в том числе в 5 из РБ: у башкир из Баймакского (0,0194), Бурзянского (0,0242) и Салаватского (0,0189) районов, марийцев (0,0417) и русских (0,03), а также у русских из Свердловской области (0,0254), башкир из Челябинской области (0,0377), чувашей (0,0115) и мордвы (0,0109). Средняя частота гетерозиготного носительства мутации p.Arg408Trp в данном регионе составила 0,0127. В Восточной Европе данная мутация определена в 5 из 7 исследованных популяций с частотой гетерозиготного носительства, варьирующей от 0,0083 у русских из Белгородской

области до 0,0192 у русских из Пинежского района и составляющей в среднем 0,0114. В популяциях Северного Кавказа и Центральной Азии мутация р.Arg408Trp не идентифицирована.

Если рассматривать исследованные популяции по их лингвистической принадлежности, то наиболее высокая частота гетерозиготного носительства мутации р.Arg408Trp обнаружена у представителей славянской группы (0,0133), в романской группе, представленной только молдаванами, она была ниже (0,0106), а в тюркоязычной и финно-угорской группах она оказалась минимальной и почти одинаковой – 0,0086 и 0,0084 соответственно. У представителей абхазо-адыгской и монгольской групп данная мутация не выявлена. Мутация р.Arg408Trp определена практически во всех изученных выборках русских, за исключением Республики Мордовия и Кавказа, с частотой гетерозиготного носительства от 0,0083 у русских из Белгородской области до 0,03 у русских из РБ. Средняя частота ее гетерозиготного носительства во всех изученных выборках русских составила 0,0161, при этом она была выше в ВУР (0,0227) по сравнению с более западными регионами Северной Евразии (0,0134). Из 9 изученных этнических групп башкир мутация р.Arg408Trp выявлена в 4 с частотой гетерозиготного носительства, варьирующей от 0,0189 у башкир из Салаватского района РБ до 0,0377 у башкир из Челябинской области, и составляющей в среднем 0,0131.

В результате проведенного исследования образцов ДНК коренных жителей из 18 популяций Евразии мутация р.Arg261Gln гена *PAH* выявлена только в двух популяциях ВУР: у татар из Татарстана и марийцев из РБ с частотой гетерозиготного носительства 0,0123 и 0,0208 соответственно. Средняя частота гетерозиготного носительства мутации р.Arg261Gln в ВУР составила 0,0012, в других регионах она не обнаружена.

Скрининг гетерозиготного носительства мутации р.Arg261X гена *PAH* проведен у 1 419 практически здоровых индивидов из 24 популяций Кавказа, так как ранее мы определили ее только у больных ФКУ из этого региона [5]. Данная мутация выявлена в 4 популяциях с наибольшей частотой гетерозиготного носительства у карачаевцев – 0,0526, тогда как у кабардинцев, караногайцев и кумыков она встретилась в единичных случаях с частотами 0,0103,

0,0204 и 0,0222 соответственно. Таким образом, мутация р.Arg261X обнаружена у представителей тюркоязычной и абхазо-адыгской лингвистических групп с преобладанием средней частоты в первой (0,0269 и 0,0027 соответственно).

Изученные мутации гена *PAH* у здоровых индивидов из различных этнических групп Евразии определены только в гетерозиготном состоянии. Статистически значимых различий по распределению частот мутаций р.Arg408Trp, р.Arg261Gln и р.Arg261X гена *PAH* между исследованными популяциями не обнаружено. Равновесие Харди–Вайнберга поддерживалось во всех изученных популяциях.

Таким образом, в результате проведенного нами исследования получены данные о частоте гетерозиготного носительства мутаций р.Arg408Trp, р.Arg261Gln и р.Arg261X гена *PAH* у практически здоровых индивидов из 58 этнических групп Евразии, которые послужат значительным вкладом в оценку генетического груза на данной территории. Определен характер распространности изученных мутаций гена *PAH* в зависимости от языковой принадлежности и территориальной локализации исследованных популяций. Для мутаций р.Arg408Trp и р.Arg261X показаны дополнительные свидетельства о предполагаемой роли эффекта основателя в их происхождении и распространении в некоторых изученных популяциях. Данные о частоте встречаемости изученных мутаций гена *PAH* в исследованных регионах необходимо использовать при разработке стратегии диагностики ФКУ.

Литература

1. Mitchell J., Trakadis Y., Scriver C. Phenylalanine hydroxylase deficiency // *Genet. Med.* 2011. V. 13. P. 697–707.
2. <http://www.biopku.org/pah/>
3. Zschocke J. Phenylketonuria Mutations in Europe // *Human Mutation.* 2003. V. 21. P. 345–356.
4. Li N., Jia H., Liu Z. et al. Molecular characterization of phenylketonuria in a Chinese mainland population using next-generation sequencing // *Scientific Reports.* 2015. V. 5. P. 15769.
5. Ахметова В.Л., Мурзабаева С.Ш., Хуснутдинова Э.К. Анализ структурных особенностей генов моногенных наследственных заболеваний. Фенилкетонурия // *Этногенетика народов Центральной Евразии: структура генофонда и молекулярно-генетические основы наследственной патологии* / под ред. Э.К. Хуснутдиновой. Уфа: Гилем, 2014. С. 55–75.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА–КОНОВАЛОВА

М.С. Балашова¹, Н.А. Жученко¹, О.С. Глотов^{2,3}, А.С. Глотов^{2,3}, И.В. Полякова^{2,3}, М.А. Федяков²,
О.В. Романова², С.В. Апалько^{2,3}, А.С. Сарана^{2,3}, С.Г. Щербак^{2,3}, А.В. Горбунова³,
И.Г. Тулузановская¹, М.И. Филимонов¹, О.В. Соловьева, Т.П. Розина¹, Т.М. Игнатова¹, А.Ю. Асанов¹

¹ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, г. Москва

² Городская больница № 40, г. Санкт-Петербург

³ Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург

Болезнь Вильсона – Коновалова (БВК) – аутомно-рецессивное наследственное заболевание, возникающее в результате мутаций гена *ATP7B* и ассоциированное с патологическим накоплением меди

в организме. БВК может манифестировать практически в любом возрасте, протекать под маской ряда других заболеваний с отсутствием типичных клинических и биохимических признаков. Особенностью

этого заболевания является то, что при своевременной диагностике оно успешно поддается лечению с помощью хелаторов меди (например, Д-пенициллина). Спектр и частота мутаций в гене *ATP7B* значительно варьируют в различных популяциях [1]. Полагают, что выраженный клинический полиморфизм заболевания может быть обусловлен многочисленностью *ATP7B* мутаций и различающимися компаундными состояниями. Вместе с тем различия в динамике и особенностях клинического течения БВК, наблюдающиеся у больных, имеющих идентичные мутации в гене *ATP7B*, в частности у sibсов, позволяют предполагать влияние других факторов, в том числе генетических, но отличных от мутаций гена *ATP7B*.

В 2015 г. создана клиничко-генетическая база данных, включающая более 160 пациентов преимущественно с абдоминальной формой БВК, длительно наблюдающихся и получающих медьэлиминирующую терапию. База включает данные клинического обследования, семейного анамнеза и молекулярно-генетического обследования. К настоящему времени собраны образцы ДНК 96 пациентов для проведения молекулярно-генетического исследования.

Для исследования была разработана таргетная панель NimbleGen SeqCap EZ Choice: 151012_HG38_CysFib_EZ_HX3 (ROCHE). Методом NGS

(Next Generation Sequencing) проводилось полное секвенирование генов *ATP7B*, *HFE*, *COMMD1*, *XIAP*, *PRPN*, *APOE*, *CFTR*. Для прогнозирования эффекта мутаций использовались алгоритмы SIFT, Polyphen-2, LTR, Mutation Taster и др. Биоинформационный фильтринг результатов секвенирования образцов ДНК проводился с помощью программ GeneTalk (<https://www.gene-talk.de/>), UGENE (<http://ugene.unipro.ru/>), Ion Reporter (<https://ionreporter.lifetechnologies.com/ir/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), PolyPhen2 (genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), PAPI (<http://papi.unipv.it/>).

Включенные в панель гены-модификаторы были выбраны в процессе анализа патогенетических путей метаболизма меди и других двухвалентных металлов, а также возможного влияния их мутаций или полиморфизмов на особенности течения, в частности тяжести БВК [2].

На первом этапе исследования решалась задача по изучению спектра мутаций гена *ATP7B*, а также спектра мутаций возможных генов-модификаторов (*HFE*, *COMMD1*, *PRPN*, *APOE* и *XIAP*) у пациентов с БВК с помощью метода NGS.

Результаты предварительного исследования представлены в табл. 1 и 2. На текущий момент проведен анализ секвенирования 29 образцов ДНК больных.

Таблица 1

Спектр мутаций в гене *ATP7B*

Мутация	Эффект	Общее число выявленных аллелей	Описана в литературе ранее
c.C3207A (p.H1069Q)	Миссенс	25	Да
c.C2332G (p.R778G)	Миссенс	2	Да
c.G3190A (p.E1064K)	Миссенс	3	Да
c.-128_-127insGCCGC	Нарушение промоторного региона (UTR5)	2	Да
c.2293G>A(p.Asp765Asn)	Миссенс	2	Да
c.A3655T (p.I1219F)	Миссенс	1	Да (впервые описана авторами в 2016 г. [3])
c.4301C>T (p.T1434M)	Миссенс	1	Да
c.3948delG(p.Thr1317fs)	Сдвиг рамки считывания	1	Да
c.3942_3943delCA	Сдвиг рамки считывания	1	Да
c.2304dupC(p.Met769fs)	Сдвиг рамки считывания	1	Да
c.G2605T (p.G869X)	Нонсенс	1	Нет
c.197_198insCTTCACA (p.G66fs)	Сдвиг рамки считывания	1	Нет
c.G1603T (p.E535X)	Нонсенс	1	Нет
c.C3955T (p.R1319X)	Нонсенс	1	Да

Таблица 2

Спектр мутаций и полиморфизмов генов-модификаторов

Ген-модификатор	Мутация или полиморфизм	Общее число выявленных аллелей
<i>HFE</i>	c.C187G (p.H63D)	6
	c.G845A (p.C282Y)	1
	c.A193T (p.S65C)	1
	c.G322C (p.E108Q)	2
<i>PRPN</i>	c.A385G (p.M129V)	12
	c.A351G (p.A117A)	2
<i>APOE</i>	c.T388C (p.C130R)	5
	c.C526T (p.R176C)	2
<i>XIAP</i>	c.A1268C (p.Q423P)	15
	c.-25768C>T	3
<i>COMMD1</i>	Ни мутаций, ни полиморфизмов в экзонных областях не выявлено	

Данные, полученные на предварительном этапе исследования, подтверждают генетическую гетерогенность БВК за счет разнообразия мутаций гена *ATP7B*. Спектр мутаций и полиморфизмов генов-модификаторов также широк. Изучение влияния генов-модификаторов на клинические особенности заболевания актуально для выявления генотип-фенотип корреляции при БВК.

Данное исследование проводится при поддержке РФФИ, грант № 14-50-00069.

Литература

1. *Amanda G., George V.D.* Geographic distribution of ATP7B mutations in Wilson disease // *Annals of Human Biology*. 2016. V. 43, № 1. P. 1–8.
2. *Maine G.N., Mao X., Muller P.A. et al.* COMMD1 expression is controlled by critical residues that determine XIAP binding // *The Biochemical journal*. 2009. V. 417 (2). P. 601–609.
3. *Балашова М.С., Соловьева О.В., Фастовец С.В. и др.* Клиническая ценность секвенирования гена *ATP7B* в диагностике болезни Вильсона – Коновалова // *Медицинская генетика*. 2016. Т. 15, № 7. С. 14–16.

ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *ATP7B* У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ «БОЛЕЗНЬ ВИЛЬСОНА–КОНОВАЛОВА»

Г.М. Баязутдинова, О.А. Щагина, А.В. Поляков

Медико-генетический научный центр, г. Москва

Болезнь Вильсона–Коновалова (БВК) – тяжелое аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное избыточным накоплением в организме и токсическим воздействием меди. Это приводит к сочетанному поражению внутренних органов и мозга [1]. Причиной БВК являются мутации в гене *ATP7B*, кодирующем трансмембранный белок АТФазу Р-типа. Ген *ATP7B* локализован в области 13q14.3. Для данного заболевания существует этиотропная терапия [2].

Целью нашего исследования было изучение спектра мутаций в гене *ATP7B* у российских больных и создание эффективной диагностической системы для ДНК-диагностики БВК.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы ДНК 457 пробандов с направляющим диагнозом «болезнь Вильсона–Коновалова». Поиск частых мутаций в гене *ATP7B* осуществлен посредством мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции с последующей амплификацией (MLPA) и мультипраймерной полимеразной цепной реакции. Поиск второй мутации у пробандов с одной найденной мутацией в гене *ATP7B* проводили с помощью массового параллельного секвенирования (NGS).

Результаты и обсуждение

На основании публикаций и ранее проведенных в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ МГНЦ исследований нами отобраны встретившиеся у наибольшего количества больных мутации в гене *ATP7B* [3]. Выборка пробандов была исследована на носительство этих мутаций. Самой частой мутацией оказалась миссенс-мутация с.3207C>A (p.His1069Glu), ее аллельная частота составила 51,2%. Исходя из формулы Харди–Вайнберга, ожидаемое количество больных с диагнозом БВК в нашей выборке составило 182 человека. В результате исследования обнаружены мутации: с.3207C>A на 203 хромосомах, с.2304insC на 21 хромосоме,

с.3036insC на 11 хромосомах, с.3402delC на 10 хромосомах, с.[3942delCA;3947delG] на 8 хромосомах, с.1770insT на 4 хромосомах, с.2532delA на 3 хромосомах, с.3649_3654del6 на 2 хромосомах. Патогенные варианты с.3036insC и с.1770insT в гене *ATP7B* впервые описаны в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ МГНЦ. По результатам исследования в гене *ATP7B* были обнаружены две мутации у 88 человек и одна мутация у 94 человек. На основании полученных данных была создана диагностическая система поиска частых мутаций в гене *ATP7B*, в нее вошли восемь мутаций. Также была создана система исследования всей кодирующей последовательности и областей экзон-интронных соединений гена *ATP7B* на основе метода массового параллельного секвенирования. Пригодные по качеству образцы ДНК пробандов с одной найденной мутацией (47 человек) были исследованы с помощью данной системы, в результате вторая мутация была найдена у 36 человек. Мутации с.2998G>A, с.3121C>T, с.3190G>A, с.3659C>T встретились более чем на одной хромосоме. Они будут включены в систему поиска частых точковых мутаций в гене *ATP7B*. У пробандов с найденной второй мутацией будет проведен анализ числа копий экзонов гена *ATP7B*.

Заключение

Самым частым патогенным вариантом в гене *ATP7B* оказалась миссенс-мутация с.3207C>A. Доля этой мутации в ожидаемой выборке больных составила 55,7%. Доли других мутаций оказались следующими: с.2304insC – 5,7%, с.3036insC – 3,02%, с.3402delC – 2,74%, с.[3942delCA;3947delG] – 2,19%, с.1770insT – 1,09%, с.2532delA – 0,82%, с.3649_3654del6 – 0,55%.

Литература

1. *Shah A.B., Chernov I., Zhang H.T. et al.* Identification and analysis of mutations in the Wilson Disease gene (*ATP7B*): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. V. 61. P. 317–328.

2. Асанов А.Ю., Соколов А.А., Волгина С.Я. и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Вильсона–Коновалова (гепатолентикулярная дегенерация). М., 2015. 71 с.
3. Карунас А.С., Магжанова А.Р., Магжанов Р.В. и др. Молекулярно-генетическое исследование болезни Вильсона – Коновалова в республике Башкортостан // Медицинская генетика. 2009. Т. 8, № 6. С. 41–48.

СЛОЖНЫЕ СЛУЧАИ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ГЕМОФИЛИИ А

Т.С. Бескоровайная, Т.Б. Миловидова, О.А. Щагина, А.В. Поляков

Медико-генетический научный центр, г. Москва

Гемофилия А (ОМIM 306700) – самая частая наследственная патология среди нарушений свертывания крови. Заболевание наследуется по X-сцепленному рецессивному типу, встречается с частотой 1 : 5 000 новорожденных мальчиков. Данная форма гемофилии обусловлена мутациями в гене *F8*, которые в различной степени влияют на синтез, строение и функционирование фактора свертывания VIII. В зависимости от активности фактора выделяют несколько степеней тяжести заболевания: менее 1% – тяжелая, 1–5% – средней тяжести, 5–40% – легкая. В базе HGMD в гене *F8* описано более 3 тыс. мутаций. Они равномерно распределены по всему гену и могут представлять собой как крупные структурные перестройки, так и точечные изменения последовательности. Большинство из этих мутаций уникальны, однако у больных с тяжелой формой гемофилии выявляются две частые мутации: в 40–50% случаев инверсия интрона 22 (*Inv22*) и в 1–5% случаев – инверсия интрона 1 (*Inv1*). Помимо классических инверсий в гене описано большое количество сложных структурных перестроек, трудно поддающихся диагностике, точному определению точек разрывов на хромосоме и установлению последовательности событий, приведших к данным перестройкам.

Материалы и методы

Для поиска инверсий интронов 22 и 1 гена *F8* из архива лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» было отобрано 96 семей с входящим диагнозом «гемофилия А». В 58 семьях был пригоден для анализа образец ДНК пробанда, еще в 38 семьях исследование проводилось на материале матерей и дочерей пробандов. Поиск мутаций проводили методом *Inverse Shifting-PCR*, предложенным L.C. Rossetti и внедренным в практику лаборатории ДНК-диагностики [1, 2].

Результаты

Инверсия интрона 22 была выявлена в 36,5% российских семей. Матери девяти пробандов с мутацией, материал которых был доступен, являлись гетерозиготными носительницами данной инверсии. Стандартная инверсия интрона 1 в нашей выборке не обнаружена. В четырех семьях были выявлены аномальные варианты инверсий, при которых либо длины амплифицированных методом *IS-PCR* фрагментов не соответствовали ни норме, ни мутации, либо такие фрагменты отсутствовали вовсе. Доля сложных перестроек гена *F8* в нашей группе обследуемых составила 4,2%.

У двух пробандов из этих семей с праймеров, предназначенных для поиска *Inv22*, были получены фрагменты аномальной длины. В результате дополнительных методов исследования у них выявлено отсутствие ПЦР-продуктов, соответствовавших экзонам с 15-го по 21-й. Таким образом, причиной гемофилии А в данных семьях является протяженная перестройка гена *F8* с делецией экзонов с 15-го по 21-й. Также методом количественного *MLPA* анализа было установлено, что мать одного пробанда и дочь второго являются гетерозиготными носительницами данных мутаций.

У одного пробанда было зафиксировано отсутствие фрагмента, который соответствовал бы либо нормальному строению гена *F8*, либо *Inv22*. Методом количественного *MLPA* анализа у него не выявлено делеций или дупликаций отдельных экзонов, и на данный момент точно установить характер структурной перестройки в данной семье не удалось.

Кроме того, в нашей выборке был выявлен аномальный вариант инверсии интрона 1, при котором у пробанда в результате неизвестной перестройки при проведении *IS-PCR* исчез фрагмент, соответствующий как нормальному, так и инвертированному интрону 1. Методом количественного *MLPA* анализа установлено, что причиной заболевания в данной семье является дупликация экзонов со 2-го по 13-й.

Заключение

Полученные результаты частот инверсий интрона 22 и 1 гена *F8* согласуются с мировыми данными. В Российской Федерации, как и во всем мире, доля инверсии интрона 22 весьма высока. Кроме того, в связи с тем, что ген *F8* большой и находится на активно рекомбинирующей в процессе мейоза хромосоме X, в нем могут происходить различные сложные перестройки. В нашей выборке семей с гемофилией А зафиксировано несколько таких случаев. Система *IS-PCR* предназначена для выявления стандартных инверсий интронов 1 и 22, однако обнаружение иных сложных генных перестроек говорит о том, что данная методика обладает более широкими диагностическими возможностями. Для уточнения характера таких перестроек необходимо проводить дополнительные исследования.

Литература

1. Rossetti L.C., Radic C.P., Larripa I.B., De Brasi C.D. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia causative rearrangements involving *int22h* and *int1h*

- hotspots in the factor VIII gene // J. Thromb. Haemost. 2008. V. 6. P. 830–836.
2. Бескоровайная Т.С., Миловидова Т.Б., Щагина О.А., Поляков А.В. ДНК-диагностика гемофилии А с использова-

нием новой медицинской технологии «Система детекции инверсии интрона 22 гена *F8*» в группе больных из Российской Федерации // Медицинская генетика. 2016. Т. 15, № 3 (165). С. 23–29.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ САРКОГЛИКАНОПАТИЙ

М.В. Булах, Д.А. Полякова, О.П. Рыжкова, А.В. Поляков

Медико-генетический научный центр, г. Москва

Саркогликанопатиями называют группу аутосомно-рецессивных поясно-конечностных мышечных дистрофий (ПКМД), обусловленных мутациями в генах, кодирующих трансмембранные белки саркогликаны четырех типов (α -, β -, γ -, δ -). Перечисленные белки представляют собой субъединицы саркогликанового комплекса сарколеммы мышечных клеток, который является частью большого дистрофин-дистрогликанового комплекса, соединяющего внутриклеточный цитоскелет мышечных клеток с ламинином внеклеточного матрикса. Саркогликанопатии включают в себя ПКМД 2D (альфа-саркогликанопатия), ПКМД 2E (бета-саркогликанопатия), ПКМД 2C (гамма-саркогликанопатия) и ПКМД 2F (дельта-саркогликанопатия), вызываемые различными патогенными вариантами в генах *SGCA*, *SGCB*, *SGCG* и *SGCD* соответственно. Частота саркогликанопатий варьирует в различных странах и составляет 1 : 370 000 в Великобритании и 5,6 : 1 000 000 в Италии, при этом в европейских странах (Германия, Дания и Чехия) на их долю приходится от 2,3 до 23% от всех аутосомно-рецессивных форм ПКМД. Отличительной особенностью данной группы заболеваний является схожесть их клинической картины с таковой при мышечной дистрофии Дюшенна / Беккера (МДД / МДБ), поскольку фенотипически саркогликанопатии также проявляются проксимальной мышечной слабостью, псевдогипертрофиями икроножных мышц в сочетании с кардиомиопатией, которая выявляется не у всех пациентов. Интеллект больных данными формами ПКМД остается сохранным. Заболевание в зависимости от формы дебютирует в возрасте от 1 до 12 лет.

В настоящее время в России больные с клинически установленным диагнозом МДД / МДБ имеют возможность проведения генетической диагностики и установления молекулярного диагноза. При этом, исходя из вышеупомянутых характерных особенностей саркогликанопатий и литературных данных, следует ожидать, что у части таких больных молекулярной причиной заболевания служат мутации в генах, кодирующих субъединицы саркогликанового комплекса. Ранее в РФ было проведено пилотное исследование, в результате которого в выборке 68 больных женского пола со входящим диагнозом МДД / МДБ у 7% пробандов были выявлены два мутантных аллеля в гене *SGCA* и у 1,5% – два мутантных аллеля в гене *SGCB*. Интересно отметить, что мутационный спектр гена *SGCA* составили всего две мутации: с.229C>T (p.R77C)

и с.271G>A (p.G91S), причем, по литературным данным, мутация с.229C>T является самым распространенным патогенным вариантом этого гена.

На основании полученных результатов была разработана диагностическая MLPA-система для поиска указанных мутаций, в которую был включен еще один патогенный вариант гена *SGCA* – с.850C>T (p.V247M), отобранный из базы данных LOVD на основании высокой частоты встречаемости среди европейских больных. С помощью этой системы проанализированы две выборки больных мышечными дистрофиями, разделенные на основании направляющего клинического диагноза. Среди 1 368 больных мужского пола со входящим диагнозом МДД / МДБ искомые мутации выявлены у 0,3% пациентов на 0,26% хромосом; в выборке 508 больных со входящим диагнозом ПКМД, не дифференцированных по биологическому полу, искомые мутации обнаружены у 1% пробандов на 0,9% хромосом. Столь низкую частоту саркогликанопатий в когорте больных МДД / МДБ мальчиков можно объяснить, во-первых, тем фактом, что МДД / МДБ является превалирующей формой прогрессирующих мышечных дистрофий у лиц мужского пола во всем мире, поэтому у большинства больных выявляются патогенные мутации в гене *DMD*.

Во-вторых, использование выбранного заведомо ограниченного поискового метода не позволяет выявить весь спектр мутаций в генах саркогликанов, который, очевидно, шире, нежели выявленный в пилотном исследовании на малой выборке больных. Последний аргумент также касается результатов, полученных в выборке с входящим диагнозом ПКМД. Однако доступный на тот момент метод секвенирования по Сэнгеру для диагностики саркогликанопатий оказался экономически невыгодным и трудозатратным при исследовании больших выборок пациентов. В то же время следует упомянуть, что ПКМД – генетически гетерогенная группа, в которой, помимо саркогликанопатий, на настоящий момент описано еще 22 формы с аутосомно-рецессивным типом наследования. Потому наиболее оптимальным решением для диагностики саркогликанопатий в период бурно развивающейся и получившей широкое распространение методики массового параллельного секвенирования является создание узкой «панели» генов, ответственных за развитие саркогликанопатий, а также других распространенных форм ПКМД, в том числе МДД / МДБ.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГИПЕРФЕНИЛАЛАНИНЕМИЙ В КАРАЧАЕВО-ЧЕРКЕССКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

П. Гундорова¹, Р.А. Зинченко^{1,2}, А.А. Степанова¹, И.А. Кузнецова¹, А.В. Поляков¹

¹ Медико-генетический научный центр, г. Москва

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, г. Москва

Гиперфенилаланинемиями (ГФА) называют группу нозологий, основным общим симптомом которых является повышение уровня фенилаланина (ФА) в крови (> 2 мг/дл) и при отсутствии специфического лечения – задержка умственного и психомоторного развития. Основной причиной гиперфенилаланинемии является дефект гена *PAH*, кодирующего фермент фенилаланингидроксилазу (ФАГ). Патология наследуется по аутосомно-рецессивному типу и обеспечивает 98% всех ГФА, ее называют фенилкетонурией (ФКУ) или *PAH*-зависимой ГФА [1]. Изучение патогенных вариантов гена *PAH* является актуальной задачей, так как позволяет делать прогнозы относительно клинического течения заболевания, чувствительности к кофакторной терапии и необходимо для планирования деторождения в отягощенных семьях.

Карачаево-Черкесская Республика (КЧР) – регион на севере Кавказа, на территории которого проживает несколько этнических групп: карачаевцы (40% населения республики), черкесы, абазинцы, ногайцы и русские. Общая численность населения республики – 470 тыс. человек. Моноэтнические браки между карачаевцами составляют 88,3% [2]. Данная ситуация может привести к снижению генетической изменчивости и изменению частот гомозигот в популяции, в частности, возможно увеличение частот конкретных нозологических форм.

В сотрудничестве с МГК КЧР получены данные о 84 больных различными клиническими формами ФКУ. Получен материал от 49 пациентов с диагнозом «фенилкетонурия», из которых 42 являются неродственными пробандами. Также получен материал от 26 пациентов с диагнозом «мягкая ГФА» (мГФА), из которых 21 является неродственными пробандами. Мягкой ГФА называют форму ФКУ, при которой уровень ФА пациента находится в пределах от 2 до 10 мг/дл. Также был исследован материал от 58 здоровых родственников и 774 здоровых жителей КЧР (популяционная выборка).

Материал 63 неродственных пробандов был исследован на наличие частых мутаций гена *PAH* методом MLPA. Первоначально был проведен поиск 9 частых на территории РФ мутаций гена *PAH* с помощью системы PKU-9: IVS4+5G>T, R158Q, EX5del4154ins268, R252W, R261Q, P281L, IVS10-11G>A, IVS12+1G>A, R408W. Эффективность системы для российских больных составляет около 70% [3]. В выборке пробандов из КЧР методом поиска 9 частых мутаций были выявлены молекулярно-генетические дефекты на 7,2% хромосом. Далее для пробандов, у которых не были выявлены обе мутации гена *PAH*, было проведено исследование с помощью диагностической системы поиска 10 повторяющихся мутаций гена *PAH* PKU-10 (L48S, IVS2+5G>A, IVS2+5G>C, R243Q, R243*, R261*,

E280K, E390G, A403V, Y414C). Для российских больных эффективность этой системы составляет около 9% [3]. В выборке больных ФКУ и ГФА из Карачаево-Черкесии на 60% исследуемых хромосом были обнаружены мутации с помощью системы PKU-10. Причем на 55,2% хромосом была выявлена мутация R261. Таким образом, после поиска частых мутаций с использованием MLPA-систем диагноз не был подтвержден у 34 пробандов. В результате секвенирования ДНК у этих пробандов среди прочих выявлены 4 повторяющихся варианта: P211T (8%), R413P (7,2%), V230I (2,4%), F331S (1,6%).

Наличие в спектре мутаций гена *PAH* повторяющихся вариантов позволяет создать систему, предназначенную для детекции частых в регионе мутаций. Система детекции, основанная на принципе MLPA, PKU-K42 включает в себя 7 мутаций: R261*, R413P, V230I, P211T, F331S, P211L, R408W. Суммарная аллельная частота мутаций, входящих в систему, составила 79,2% для общей выборки и 88,1% для карачаевцев. Наиболее распространенная среди больных из выборки мутация R261* (55,2%) выявлена почти исключительно у карачаевцев. Частота мутации R261* среди карачаевцев составляет 67,3%. Среди российских больных аллельная частота данной мутации составляет менее 1% [3].

Генофенотипический анализ был проведен в выборках 42 больных с входящим диагнозом «фенилкетонурия» и 21 пациента с диагнозом «мГФА». На основании данных базы PAHvdb [4] мутации были разделены в зависимости от остаточной активности фермента ФАГ на «мягкие» ($> 10\%$) и «тяжелые» ($< 10\%$). Парно сравнив суммарные частоты «тяжелых» и «мягких» мутаций в выборках больных ФКУ и мГФА, было показано, что «мягкие» мутации статистически значимо чаще встречаются среди больных с клиникой мГФА, «тяжелые» мутации статистически значимо чаще встречаются среди больных с классической ФКУ ($p < 0,00001$). Все больные с мягким фенотипом имеют в генотипе хотя бы одну «мягкую» мутацию. В результате анализа генотипов и клинических данных показано, что «мягкие» мутации обладают псевдоминантным эффектом, обуславливая мягкий фенотип.

По данным неонатального скрининга за 2007–2015 гг., частота всех форм ГФА в КЧР составляет 1 : 850 новорожденных ($1,18 \pm 0,16\%$). К настоящему моменту это самая высокая частота, зарегистрированная для данной патологии в мире. Больные мГФА составляют почти половину от всех больных, выявляемых на скрининге. С одной стороны, таким пациентам не назначается диета, и они могут вести образ жизни, приближенный к таковому у здоровых людей. С другой стороны, имея две мутации в гене *PAH*, в браке с носителем вероятность рождения больного ребенка будет составлять 50% и, соответственно,

50% – вероятность рождения здорового носителя. При этом больные потомки могут, в свою очередь, иметь тяжелую клиническую форму заболевания.

В результате поиска частых для КЧР мутаций гена *PAH* в популяционной выборке с использованием созданной системы PKU-K42 были получены частоты гетерозиготного носительства и расчетная частота заболевания для представителей коренных этносов. Для черкесов, абазин и ногайцев частоты близки к средним по РФ. Вариант R261* встречается с частотой 1 : 16 у здоровых карачаевцев и является основной причиной аномально высокой расчетной частоты заболевания ФКУ среди карачаевцев – 1 : 332. Суммарная частота носительства мутаций гена *PAH* составляет 1 : 9 у здоровых карачаевцев. Очевидно, что высокую частоту фенилкетонурии в Карачаево-Черкесской Республике обеспечивает в основном высокая частота гетерозиготного носительства мутаций гена *PAH* у карачаевцев, причем главным образом варианта R261*.

Широкое распространение варианта R261* среди карачаевцев позволяет предположить наличие эффекта основателя. Выявлен общий гаплотип на хромосомах с мутацией R261*, что подтверждает влияние эффекта основателя на накопление фенилкетонурии среди карачаевцев. Гаплотип гена *PAH* на хромосомах с мутацией R261* не совпадает с ранее описанными в литературе гаплотипами. Предполага-

ется независимое происхождение мутации R261* на территории Карачаево-Черкесской Республики или общее происхождение этого патогенного варианта у карачаевцев и иранцев, так как описаны контакты этих двух народов в прошлом. На основании расчета неравновесия по сцеплению R261* с полиморфными локусами установлен возраст мутации $g_{cp} = 10,2 \pm 2,7$ поколений (275 ± 73 лет). Период распространения R261* совпадает с фазой роста численности популяции карачаевцев конце XVIII – начале XIX в.

Литература

1. Blau N., Hennermann J.B., Langenbeck U., Lichter-Konecki U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies // *Mol. Genet. Metab.* 2011. Т. 104. Suppl. С. 2–9.
2. Ельчинова Г.И., Иванов А.В., Ревазова Ю.А. и др. Брачно-миграционная характеристика карачаевцев // *Генетика*. 2015. Т. 51, № 8. С. 941–945.
3. Гундорова П., Степанова А.А., Щагина О.А., Поляков А.В. Результаты использования новых медицинских технологий «Детекция основных точковых мутаций гена *PAH* методом мультиплексной лигазной реакции» и «Детекция десяти дополнительных точковых мутаций гена *PAH* методом мультиплексной лигазной реакции» в ДНК-диагностике фенилкетонурии // *Медицинская генетика*. 2016. Т. 15, № 2. С. 29–36.
4. Blau N., Yue W., Perez B. *PAH*vdб. URL: <http://www.biopku.org/pah/>

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВОЙ МУТАЦИИ В ГЕНЕ *CLN6*, ОТВЕТСТВЕННОЙ ЗА ВОЗНИКНОВЕНИЕ НЕЙРОНАЛЬНОГО ЦЕРОИДНОГО ЛИПОФУСЦИНОЗА 6-ГО ТИПА В ЯКУТИИ

П.И. Гурьева¹, Д.А. Петухова¹, А.Л. Сухомясова^{1,2}, Е.Е. Гуринова², И.А. Николаева², Р.Н. Иванова², Д.Д. Ноев², А.А. Афанасьев², А.А. Кузнецов², Ф.Ф. Васильев¹, Н.Р. Максимова¹

¹ Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск

² Медико-генетический центр ГБУ РС (Я) «Республиканская больница № 1 – Национальный центр медицины», г. Якутск

Нейрональный цероидный липофусциноз (НЦЛ, болезнь Баттена) – это группа клинически и генетически гетерогенных нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся внутриклеточным накоплением аутофлюоресцирующих липопигментов в различных ультраструктурных локусах. НЦЛ относится к группе лизосомных болезней накопления [1]. Распространенность в мире составляет 1 : 12 500 [2]. В настоящее время выделяют 14 генетических форм НЦЛ [3, 4]. Тип наследования заболевания – аутосомно-рецессивный. Клинически дебютирует в виде прогрессирующей неврологической симптоматики: атаксии, эпилептических припадков, регресса психомоторного развития, нарушения зрения [3]. Прогноз при данном заболевании крайне неблагоприятный, эффективного лечения в настоящее время не существует.

Одной из форм НЦЛ является нейрональный цероидный липофусциноз 6-го типа, вызванного мутацией в гене *CLN6*, который кодирует мембранный белок с неизвестной функцией [3]. Большинство пациентов с НЦЛ 6-го типа являются выходцами из стран Южной Европы, в частности Португалии, или индийского и пакистанского происхождения, в том числе цыганского народа в Чехии [2]. Для этой

редкой тяжелой болезни характерно накопление в изолированных популяциях с низким уровнем миграции [5]. По результатам проведенных ранее генетико-эпидемиологических исследований якутская популяция также относится к числу изолированных гомогенных популяций с низким уровнем миграции [6]. Возраст начала заболевания при нейрональном цероидном липофусцинозе 6-го типа варьирует от 18 мес до 8 лет. Клиническая картина включает задержку психомоторного развития, дизартрию, атаксию, потерю зрения и эпилептические припадки. Эпиприпадки являются ранней особенностью заболевания, у большинства пациентов обычно начинаются до 5 лет. Характерно быстрое прогрессирование заболевания, смерть наступает в возрасте от 5 до 12 лет [7–9].

В данной статье приведены результаты молекулярно-генетического исследования тяжелого наследственного нейродегенеративного заболевания – нейронального цероидного липофусциноза 6-го типа в Якутии.

Цель исследования – поиск молекулярно-генетической причины у больных с подозрением на лейкоцистоз с использованием таргетного экзомного секвенирования.

Материалы и методы

Исследовано 18 образцов ДНК детей и 24 образца ДНК их родственников из 17 якутских семей с подозрением на лейкодистрофию. Все больные состоят на учете и наблюдаются в Медико-генетическом центре ГАУ РС (Я) «Республиканская больница № 1 – Национальный центр медицины». Молекулярно-генетический анализ проведен на базе учебно-научной лаборатории «Геномная медицина» клиники медицинского института ФГАОУ ВПО СВФУ им. М.К. Аммосова. Выделение геномной ДНК проводили из лейкоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Проведено таргетное экзомное секвенирование с помощью панели TruSight Inherited Disease (Illumina, США) на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Результаты анализа были валидированы с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру.

Результаты

При проведении данного исследования 8 пациентам из 6 семей установлен генетический диагноз нейрональный цероидный липофусциноз 6-го типа с аутосомно-рецессивным типом наследования (OMIM 601780). У них нами обнаружена новая мутация с.396dupT в 4-м экзоне гена *CLN6* в гомозиготном состоянии, приводящая к аминокислотной замене p.Val133fs (сдвиг рамки считывания). Родители больных являлись гетерозиготными носителями. Заболевание манифестировало в возрасте 3–4 лет. В клинической картине наблюдались миоклоническая эпилепсия, атаксия, регресс психомоторного развития, деменция, нарушение зрения. На МРТ головного мозга перивентрикулярно выявля-

лись симметричные изменения в белом веществе полушарий головного мозга, атрофия червя и полушарий мозжечка.

Заключение

Таким образом, с помощью таргетного экзомного секвенирования выявлена новая мутация в гене *CLN6*, которая явилась причиной нейронального цероидного липофусциноза 6-го типа у пациентов, наблюдавшихся с подозрением на лейкодистрофию.

Литература

1. Mole S., Gardiner M. Molecular genetics of the neuronal ceroid lipofuscinoses // *Epilepsia*. 1999. V. 40. (Suppl. 3). P. 29–32.
2. Haltia M. The neuronal ceroid lipofuscinoses // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2003. V. 62, № 1. P. 1–13.
3. Mole S.E., Cotman S.L. Genetic of the neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease) // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. V. 1852. P. 2237–2241.
4. Haltia M., Goebel H.H. The neuronal ceroid-lipofuscinoses: a historical introduction // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013. V. 1832. P. 1795–1800.
5. Moore S.J., Buckley D.J., MacMillan A. et al. The clinical and genetic epidemiology of neuronal ceroid lipofuscinosis in Newfoundland // *Clin. Genet*. 2008. V. 74. P. 213–222.
6. Пузырев В.П., Максимова Н.Р. Наследственные болезни у якутов // *Генетика*. 2008. Т. 44, № 10. С. 1308–1314.
7. Schulz A., Kohlschütter A., Mink J. et al. NCL diseases – clinical perspectives // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1832 (11). P. 1801–1806.
8. Santorelli F.M., Garavaglia B., Cardona F. et al. Molecular epidemiology of childhood neuronal ceroid-lipofuscinosis in Italy // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2013. V. 8. P. 19.
9. Canafoglia L., Gilioli I., Invernizzi F. et al. Electroclinical spectrum of the neuronal ceroid lipofuscinoses associated with *CLN6* mutation // *Neurology*. 2015. V. 85. P. 316–324.

ПОИСК СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ГЕНАХ *CYP1B1* И *PITX2* У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНОЙ ВРОЖДЕННОЙ И ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ

Р.Р. Еникеева¹, С.Л. Лобов², А.Ш. Загидуллина³, И.С. Зайдуллин⁴,
Л.У. Джемилева^{2,3}, Э.К. Хуснутдинова^{1,2}

¹ Башкирский государственный университет, г. Уфа

² Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

³ Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Уфа

⁴ Уфимский НИИ глазных болезней АН РБ, г. Уфа

Глаукома – общий термин, который объединяет большую группу заболеваний органа зрения с различной этиологией, но имеющих ряд общих особенностей в патогенезе, клинике и методах лечения. Для глаукомы характерны атрофия зрительного нерва при повышении внутриглазного давления и возникновение типичных дефектов поля зрения. Глаукома является одной из наиболее актуальных и важных проблем в офтальмологии, имеющей большое медико-социальное значение ввиду высокой распространенности и тяжести исходов заболевания, нередко ведущих к слепоте и инвалидности. В мире от глаукомы страдают более 90 млн человек, а к 2030 г. ожидается увеличение числа таких больных в 2 раза.

Материалы и методы

В качестве исследуемого материала были использованы образцы ДНК 215 пациентов с клиническим диагнозом «первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ)», предположительно наследственной этиологии, не связанных родством, 14 образцов ДНК пациентов (14 семей) с установленным диагнозом «первичная врожденная глаукома (ПВГ)» и 40 образцов ДНК членов их семей, проживающих в Республике Башкортостан. Контрольную группу составили 250 образцов ДНК здоровых индивидов, не имеющих заболеваний глаз. Забор материала проводился на базе Центра лазерного восстановления зрения «Оптимед», МБУЗ «Городская клиническая

больница № 10», ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней АН РБ» с информированного согласия пациентов и членов их семей.

Был проведен поиск структурных изменений в генах *CYP1B1* и *PITX2* с применением метода анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (SSCP) с последующим ресеквенированием на автоматическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

Результаты

Во втором экзоне гена цитохрома P450 (*CYP1B1*) у одного пациента с клиническим диагнозом ПОУГ, русского по этнической принадлежности, обнаружена миссенс-мутация с.343G>C (р.Ala115Pro) в гетерозиготном состоянии. Данный однонуклеотидный вариант зарегистрирован в геномном браузере Ensembl, но литературные данные отсутствуют, поэ-

тому сделать какое-либо предположение о функциональной значимости данного изменения достаточно сложно.

В третьем интроне гена *PITX2* было выявлено изменение нуклеотидной последовательности rs2276966 (с.-10-30T>C). Данное изменение выявлено у одного пациента с клиническим диагнозом ПВГ, башкира по этнической принадлежности, одного пациента с диагнозом ПОУГ, русского по этнической принадлежности, и у одного индивидуума из контрольной группы. Согласно программе Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/index.html>), rs2276966 приводит к созданию и изменению интронных сайтов ESE и ESS соответственно.

Таким образом, функциональная значимость выявленных нами изменений нуклеотидной последовательности носит дискуссионный характер, и необходим дальнейший анализ их патогенетического влияния на развитие и течение заболевания.

ПРИНЦИПЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПАНЕЛИ ГЕНОВ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНА ЗРЕНИЯ

Е.А. Иванова, О.В. Хлебникова, О.П. Рыжкова, А.В. Поляков

Медико-генетический научный центр, г. Москва

Распространенность наследственных заболеваний глаз варьирует от 4 до 9 человек : 10 000 населения в Российской Федерации и до 12 : 10 000 человек в государствах Средней Азии. Наиболее распространенными заболеваниями в структуре наследственной патологии глаз являются катаракты, болезни сетчатки и зрительного нерва. Для многих моногенных патологий органа зрения характерна вариабельность клинических проявлений в зависимости от возраста пациента. Недостаточная изученность клинических характеристик отдельных генетических вариантов и отсутствие единой классификации наследственных болезней органа зрения приводят к тому, что в одну нозологическую форму могут объединяться заболевания с различной генетической природой, патогенетическими механизмами и типом наследования. Однако патогенные варианты в одном гене могут быть связаны с несколькими разными фенотипами. Клинический полиморфизм и высокая генетическая гетерогенность наследственных заболеваний органа зрения затрудняют медико-генетическое консультирование и молекулярно-генетическую диагностику для пациента с офтальмопатологией. Стоимость диагностических тестов зачастую не позволяет провести исследование в полном объеме, что снижает вероятность нахождения причины развития патологии глаз. В настоящее время актуальной задачей молекулярной диагностики является внедрение метода секвенирования следующего поколения для повышения эффективности поиска патогенных вариантов и снижения стоимости молекулярно-генетического исследования в сравнении с прямым автоматическим

секвенированием по Сэнгеру. Оптимальным решением является разработка панели генов, задействованных в патогенезе группы заболеваний со схожей клинической картиной.

В панель генов, сформированную в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ МГНЦ, вошли гены, ответственные за развитие различных только изолированных моногенных форм дегенерации сетчатки (53 гена), катаракты (33 гена), атрофии зрительного нерва (11 генов), амавроза Лебера, глаукомы, дистрофии роговицы и некоторых врожденных пороков развития глаз (всего 211 генов). При выборе гена принималось во внимание наличие в нем патогенных вариантов в функциональных доменах белка, приводящих к развитию заболевания, или в регуляторных элементах, влияющих на экспрессию гена, выявленных более чем в трех неродственных семьях с проявлением характерного фенотипа. Допускалось включение генов, патогенные варианты в которых встретились менее трех раз, но патогенность была подтверждена биоинформатическими и функциональными исследованиями. Также учитывалось соответствие типа наследования патогенного варианта и фенотипа в семьях. Основными ресурсами для формирования панели генов служили базы данных OMIM, PubMed и профессиональная версия базы данных HGMD. В данную панель включено максимально возможное число генов изолированных патологий органа зрения, ограниченное техническими возможностями программы расчета оригинальных праймеров для амплификации выбранных фрагментов генома, которая используется ресурсом Ion Ampliseq Designer (Thermo Fisher Scientific).

НАСЛЕДСТВЕННАЯ СПАСТИЧЕСКАЯ ПАРАПЛЕГИЯ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

В.А. Кадникова, О.П. Рыжкова, Г.Е. Руденская, А.В. Поляков

Медико-генетический научный центр, г. Москва

Наследственные спастические параплегии (НСП, SPG) – гетерогенная группа нейродегенеративных болезней с преимущественным поражением пирамидного тракта; их ведущим или единственным симптомом является прогрессирующий нижний спастический паразез, проявляющийся нарушением ходьбы вплоть до ее утраты.

В генетическом спектре преобладают аутосомно-рецессивные формы SPG, но более частыми являются доминантные (АД) – за счет SPG4 и SPG3, к которым приводят мутации в генах *SPAST* и *ATL1* соответственно. В совокупности две эти формы ответственны за ~50% случаев АД НСП.

Материалы и методы

С 2002 г. нами были собраны ДНК 73 неродственных пробандов (46 семейных случаев, 27 изолированных) с клинической симптоматикой НСП. Образцы ДНК 56 пробандов (76,7%) были проанализированы на наличие мутаций в гене *SPAST* методом секвенирования по Сэнгеру и 20 (27,4%) – в

гене *ATL1* (некоторые пациенты имели оба входящих диагноза). Пациенты без мутаций были проанализированы методом MLPA-анализа, который идентифицирует протяженные делеции и дупликации в обоих генах.

Результаты

В результате анализа было обнаружено 19 (26%) мутаций в гене *SPAST* и 8 (11%) в гене *ATL1* (таблица).

Полученные результаты отличаются от литературных данных по частоте встречаемости мутаций для гена *SPAS* (37,6% в Италии, 48% в Канаде, 62% в Германии, 50% в Венгрии) и сопоставимы с таковыми для *ATL1* (6,8% в Италии, 16% в Канаде, 3% в Германии, 18% в Венгрии). Таким образом, мутации были найдены для 37% пациентов, что значительно меньше, чем в других популяциях (42% в Италии, 64% в Канаде, 65% в Германии, 68% в Венгрии). Полученные данные указывают на необходимость изучения других форм SPG.

Спектр мутаций в генах *SPAST* и *ATL1*

Ген	Семья	Экзон	Мутация
<i>SPAST</i>	20, 210	10	c.1291C>T (p.Arg431Term)
	430**	15	c.1663G>T (p.Asp555Asn)
	440	8	c.1107A>G (p.Thr369Thr)*
	5**	11	c.1391A>G (p.Glu464Gly)*
	19	17	c.1750_1751delGAinsT
	32	8	c.1139T>C (p.Leu380Pro)
	35	10	c.1271delG*
	44	1	c.286delG
	54	9	c.1245+1G>A (IVS9+1G>A)
	73**	9	c.1216A>G (p.Ile406Val)
	75	15	c.1684C>T (p.Arg562Term)
	530	3	c.551A>C (p.Asn184Thr)
	260	6–16	del.ex6-16*
	330	1	del.ex1
	590**	10–12	dup.ex10-12
20	10–13	del.ex10-13*	
84**	15–16	del.ex15-16*	
88	1	dup.ex1*	
<i>ATL1</i>	46, 370	12	c.1243C>T (p.Arg415Trp)
	13**, 60	7	c.715C>T (p.Arg239Cys)
	22	8	c.757G>A (p.Val253Ile)
	51	12	c.1483C>T (p.Arg495Trp)
	70**	8	c.773A>G (p.His258Arg)
	42	1–14	del.ex1-14*

* – неописанные ранее мутации; ** – изолированные.

Заключение

Благодаря внедрению метода высокопроизводительного параллельного секвенирования (ВПС) было открыто порядка 30 новых форм НСП и генов, ответственных за их возникновение. Существуют разные технологии ВПС, однако секвенирование па-

нелей заболевания имеет некоторые преимущества благодаря сниженной стоимости и более легкой интерпретации данных. Была разработана панель для идентификации всех известных на данный момент форм НСП. В ближайшее время планируется проанализировать пациентов без мутаций в генах *SPAST* и *ATL1* с помощью данной панели.

АНАЛИЗ СПЕКТРА ИЗОЛИРОВАННОЙ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ В ЗЕЛЕНЧУКСКОМ И УРУПСКОМ РАЙОНАХ КАРАЧАЕВО-ЧЕРКЕССКОЙ РЕСПУБЛИКИ

В.В. Кадышев¹, В.А. Галкина¹, С.И. Куцев^{1,2}, Е.К. Гинтер^{1,3}, Р.А. Зинченко^{1,2}

¹ *Медико-генетический научный центр, г. Москва*

² *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, г. Москва*

³ *Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, г. Москва*

Наследственные заболевания органа зрения составляют в среднем 30% среди всех наследственных болезней человека. Патологические изменения глаз являются как симптомом синдромальной патологии, так и самостоятельной (изолированной) нозологической единицей. В настоящем тезисе представлены данные, характеризующие нозологический спектр изолированной наследственной офтальмопатологии Зеленчукского и Урупского районов Карачаево-Черкесской Республики. Обследованные районы составляют западную часть республики. Этнос обследованных регионов представлен в основном русскими (70%).

Медико-генетическое обследование населения проведено в соответствии с протоколом генетико-эпидемиологических исследований, разработанным в ФГБНУ «МГНЦ» [1]. Осмотр пациентов осуществлен врачами разного профиля: неврологом, педиатром, офтальмологом, генетиком. Численность обследованной популяции составила 72 957 человек. Верификация офтальмологической патологии проведена на основании данных офтальмологического обследования (визометрия, биомикроскопия, офтальмоскопия, тонометрия и т.д.) инструментального обследования (оптическая когерентная томография сетчатки, электрофизиологические и эхографические исследования). Формулировка диагноза выполнена с учетом МКБ-10 и базы данных наследственных болезней OMIM [2].

В результате проведенной работы выявлено, что нозологический спектр в западной части Карачаево-Черкесской Республики представлен 25 клинико-генетическими формами изолированной наследственной патологии органа зрения.

Одной из самых распространенных групп офтальмологических заболеваний, обусловленных генетическими изменениями, явилась патология сетчатки и зрительного нерва. Суммарная распространенность патологий данной группы составила 2,2 : 10 000 населения. Спектр представлен тапеторетинальной абитрофией, вителлоформной макуллодистрофией Беста, болезнью Штаргардта, палочко-колбочковой дистрофией сетчатки, атрофией зрительного нерва и нейропатией Лебера.

Вторая по распространенности группа изолированной наследственной офтальмопатологии

(1,8 : 10 000 населения) представлена моногенными пороками развития зрительного анализатора: изолированный микрофтальм, колобома различных структур глаза, врожденный птоз верхнего века.

Частота встречаемости врожденной катаракты в западных районах Карачаево-Черкесской Республики составила 1,4 : 10 000 населения. В результате обследования популяции выявлен выраженный клинический полиморфизм наследственной патологии хрусталика.

Суммарная распространенность врожденной глаукомы, наследственной патологии роговицы и ретинобластомы составила 0,7 : 10 000 населения.

Таким образом, наиболее частыми наследственными заболеваниями Зеленчукского и Урупского районов Карачаево-Черкесской Республики являются патология заднего отрезка глазного яблока и зрительного нерва. Нозологический спектр западной части региона аналогичен ранее обследованному русскому населению других популяций России [3–5]. Суммарная распространенность изолированной наследственной офтальмологической патологии в обследованных районах Карачаево-Черкесской Республики составила 1 : 1 658.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФ в рамках научного проекта № 17-15-01051.

Литература

1. Зинченко Р.А., Гинтер Е.К. Особенности медико-генетического консультирования в различных популяциях и этнических группах // *Медицинская генетика*. 2008. Т. 7, № 10. С. 20–29.
2. Online Mendelian Inheritance in Man. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (дата обращения: 10.04.2017).
3. Кадышев В.В., Зинченко Р.А., Хлебникова О.В. и др. Генетико-эпидемиологические особенности распространения изолированной наследственной патологии органа зрения среди населения Кировской области // *Медицинская генетика*. 2011. Т. 10, № 3 (105). С. 23–33.
4. Киреева О.Л., Хлебникова О.В., Амелина С.С. и др. Эпидемиология наследственной офтальмопатологии в двенадцати районах Ростовской области // *Медицинская генетика*. 2010. Т. 9, № 9 (99). С. 24–29.
5. Пузырёв В.П., Назаренко Л.П. Генетико-эпидемиологическое исследование наследственной патологии в Западной Сибири. Томск: STT, 2000. 187 с.

НАСЛЕДСТВЕННАЯ ЭНЗИМОПЕНИЧЕСКАЯ МЕТГЕМОГЛОБИНЕМИЯ ПЕРВОГО ТИПА В ЯКУТИИ

А.А. Максимова

Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск

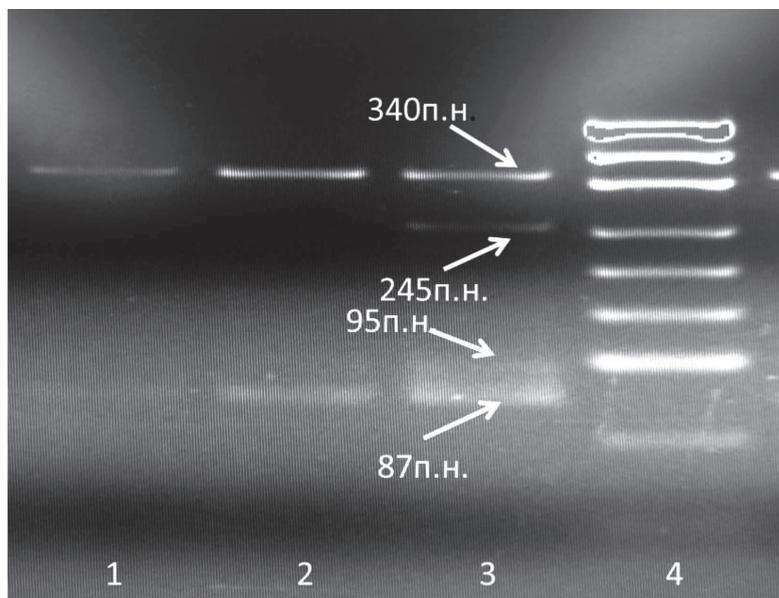
Наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия (НЭМ) – заболевание, при котором содержание метгемоглобина (MetHb) в крови превышает физиологическую норму (> 1–2% общего количества Hb) [1]. К факторам риска развития метгемоглобинемии относят старческий и детский возраст, наличие инфекции, тяжелых сопутствующих заболеваний, анемии, гипоальбуминемии, нарушения функции печени, повреждение слизистых оболочек. Немаловажным фактором является генетическая предрасположенность: нарушение метаболизма анестетиков амидного ряда или наличие мутаций в гене энзимопенической метгемоглобинемии в гетерозиготном состоянии, при котором симптомы проявляются только после интоксикации [3]. Оценена распространенность НЭМ первого типа среди якутов, которая составила 1: 5 677 человек [2].

Цель исследования – изучить распространенность наследственной энзимопенической метгемоглобинемии первого типа и выявить частоту гетерозиготного носительства мутации в якутской популяции.

Материалы и методы

Работа была проведена по данным регистра наследственных и врожденных патологий МГЦ ПЦ «РБ № 1 – НЦМ». Проанализированы генетические карты 68 пациентов с метгемоглобинемией первого типа. Молекулярно-генетическое исследование на носительство метгемоглобинемии первого типа проведено на базе Учебно-научной лаборатории «Геномная медицина». Для исследования использовали образцы геномной ДНК 196 человек якутской этнической группы, проживающих на территории Республики Саха (Якутия), взятых с информированного письменного согласия, из них 131 (67%) женщин и 65 (33%) мужчин.

ДНК выделяли из 10 мл периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Реакция ПЦР была выполнена в объеме 15 мкл с образцом ДНК, содержащим буфер $\times 10$, 2,5 мМ $MgCl_2$, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, по 10 пМ праймеров (F и R), Taq полимеразы, бетаина, деионизированной воды и ДНК. Далее проведен ПДРФ анализ с использованием рестриктазы AluI. Разделение на фрагменты проводили в 4%-ном агарозном геле (рисунок).



Детекция методом электрофореза в 4%-м агарозном геле. На 4-й дорожке виден стандартный маркер pUC19DNA; на 3-й дорожке – исследуемый образец с мутацией в гетерозиготном состоянии

Результаты

По данным регистра наследственных и врожденных патологий 68 больных по месту фактического проживания были распределены следующим образом: 18 (26,5%) из ГО Якутск, 8 (11,7%) из Верхневилуйского улуса, 7 (10,3%) из Намского улуса и 6 (8,8%) пациентов из Вилуйского улуса. Матери 8 (11,7%) пробандов происходили из Намского, 7 (10,3%) из Верхневилуйского, 6 (8,8%) из Вилуйского и 5 (7,4%) из Нюрбинского улусов. Отцы 7 (10,3%) больных являлись уроженцами Нюр-

бинского, 6 (8,8%) Верхневилуйского, 5 (7,4%) Вилуйского, 5 (7,4%) Кобяйского и 5 (7,4%) Намского улусов.

В результате молекулярно-генетического исследования было выявлено, что из 196 человек у 188 (96%) был нормальный генотип; гетерозиготное носительство мутации установлено у 8 (4%) человек. При этом 6 случаев (3%) гетерозиготного носительства мутации приходилось на долю женщин, и только два гетерозиготных генотипа выявлены у мужчин. Гетерозиготное носительство метгемоглобинемии составило 4% среди якутской популяции.

Заключение

Таким образом, в результате проделанной работы было выявлено, что метгемоглобинемия первого типа по месту фактического проживания больных чаще встречается в ГО Якутск (26,5%), Верхневиллюйском (11,7%), Намском (10,3%) и Виллюйском (8,8%) районах. Матери больных чаще являлись уроженцами Намского (11,7%), Верхневиллюйского (10,3%), Виллюйского (8,8%) и Нюрбинского (7,4%) районов, отцы – Нюрбинского (10,3%), Верхневиллюйского (8,8%), Виллюйского (7,4%), Кобяйского (7,4%) и Намского (7,4%) районов. Гетерозиготное носительство метгемоглобинемии составило 4% среди якутской популяции, что говорит о высоком

проценте носительства. Учитывая полученные данные, необходимо проведение генетического скрининга в популяции для профилактики и снижения распространенности данной наследственной патологии.

Литература

1. Казанец Е.Г. Метгемоглобинемии // Детская больница. 2009. № 1. С. 38–42.
2. 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.
3. Vallurupalli S. Methemoglobinemia due to topical pharyngeal anesthesia during endoscopic procedures // Local Reg. Anesth. 2010. № 3. P. 137–142.

НОВЫЙ ТИП МУКОПОЛИСАХАРИДОЗА С ТЯЖЕЛЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ У ЯКУТОВ, ВЫЗВАННЫЙ МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ VPS33A

Н. Максимова¹, Х. Кондо², Т. Отомо^{2, 3, 4}, Е. Гуринова¹⁰, А. Сухомясова^{1, 10}, Х. Като⁵, А. Имаи^{6, 7}, Е. Асано⁶, К. Кабаяши^{7, 8}, С. Ноджима⁹, А. Накая⁷, Yusuke Hamada², Каори Ишихара², А. Ноговицына¹⁰, М. Саввина¹, Т. Ешимори^{3, 4}, К. Озоно², Н. Сакаи²

¹ УНП «Геномная медицина» Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова, г. Якутск, Россия

² Отделение педиатрии Университета Осаки, г. Осака, Япония

³ Отделение генетики Высшей медицинской школы Осаки, г. Осака, Япония

⁴ Исследовательский центр по аутофагии Высшей медицинской школы Осаки, г. Осака, Япония

⁵ Отделение медицинской биохимии Высшей медицинской школы Осаки, г. Осака, Япония

⁶ Отделение кардиологии Высшей медицинской школы Осаки, г. Осака, Япония

⁷ Отделение гемаинформатики Высшей медицинской школы Осаки, г. Осака, Япония

⁸ Отдел медицинских решений корпорации NEC, г. Токио, Япония

⁹ Отделение патологии Высшей медицинской школы Университета Осаки, г. Осака, Япония

¹⁰ Республиканская больница № 1, Национальный центр медицины Республики Саха, г. Якутск, Россия

¹¹ Отдел науки о здоровье, детского здравоохранения и генетической науки Высшей медицинской школы Университета Осаки, г. Осака, Япония

Мукополисахаридозы (МПС) – это группа генетических заболеваний, вызванных недостаточностью лизосомальных ферментов, которые катаболизируют гликозаминогликаны (ГАГ). Мы описали новое МПС-подобное заболевание, вызванное специфической мутацией в гене VPS33A. Мы описали 13 больных с типичной клиникой мукополисахаридозов: грубые черты лица, скелетные аномалии, гепатоспеланомегалия, респираторные проблемы, умственная недостаточность и высокая экскреция ГАГ в моче. Но диагноз МПС у пациентов не был выставлен лишь с помощью биохимических анализов. У пациентов были повышены уровни гепарансульфата в плазме, по сравнению с нормой, в 60 раз и 6 раз – по сравнению с пациентами с другими формами МПС.

Также у пациентов имелись симптомы поражения сердца, почек и гемапоэтической системы, которые не являются характерными для МПС. Они

приводили к летальному исходу детей в возрасте от 1 до 2 лет.

Используя полногеномное секвенирование и секвенирование по Сэнгеру, мы идентифицировали гомозиготную мутацию с.1492C>T (p.Arg498Trp) в гене VPS33A у 13 пациентов якутской национальности. Ген VPS33A участвует в эндоцитарных и аутофогальных путях, но выявленная мутация не влияет ни на один из этих путей. В выведенных из организма и VPS33A-обедненных клетках были обнаружены лизосомальное избыточное подкисление и накопление гепарансульфата, что указывает на новую роль этого гена в функциях лизосом. Поэтому мы предполагаем, что нами описан новый тип МПС, который не вызывается ферментативным дефицитом.

Новому заболеванию дано название «мукополисахаридоз-плюс» (Mucopolysaccharidosis-plus syndrome, MPSPS), оно внесено в международную базу OMIM под номером 617 303.

ПОИСК ПРИЧИН НАСЛЕДСТВЕННОЙ ТУГОУХОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

О.Л. Миронович¹, Е.А. Блинец¹, Т.Г. Маркова², О.П. Рыжкова¹, А.В. Поляков¹

¹ Медико-генетический научный центр, г. Москва

² Российский научно-практический центр аудиологии и слухопротезирования ФМБА, г. Москва

Проблема своевременной диагностики врожденной тугоухости имеет особую актуальность в связи с возможностями ранней реабилитации больных. По данным, полученным при проведении универсального аудиологического скрининга, в России распространенность врожденного нарушения слуха составляет 3 на 1 000 новорожденных. Согласно молекулярно-генетическим исследованиям до трети выявленных случаев представляет собой наследственную несиндромальную форму тугоухости генетического типа DFNB1, обусловленную рецессивными мутациями в одном гене, – *GJB2*. Помимо упомянутого гена на сегодняшний день известны еще более 60 генов, ответственных за несиндромальную тугоухость, и более 100 генов, связанных с различными синдромами с нарушением слуха. При отсутствии мутаций у пациента с тугоухостью в гене *GJB2* или при наличии классической клинической картины частого синдрома наиболее информативным способом поиска молекулярного дефекта являются методы массового параллельного секвенирования (massive parallel sequencing, MPS) экзона или генома. В связи с дороговизной данных методов и сложностью интерпретации полученных результатов сегодня широко применяется метод MPS панелей, включающих несколько десятков или сотен генов. Мы сформировали список генов для исследования тугоухих пациентов методом MPS, основываясь как на результатах анализа существующих панелей генов зарубежными специалистами, так и на данных MPS экзотов зарубежних и российских больных. Полученная панель включает 35 генов, ответственных за несиндромальную и (или) синдромальную тугоухость.

Проведено исследование образцов ДНК 10 пациентов с диагнозом несиндромальной нейросенсорной тугоухости, у которых не выявлено мутаций в гене *GJB2*. Выявлены 8 хромосом с патогенными и вероятно патогенными вариантами. У пациента 1 обнаружены патогенные варианты с.5573T>C (p.L658F) и с.1738_1745del8 в гене *MYO7A* в гетерозиготном состоянии. Рецессивные мутации в гене *MYO7A* ответственные за развитие несиндромальной тугоухости генетического типа DFNB2 и синдрома Ушера. У пациента 2 выявлен описанный ранее в литературе патогенный вариант с.1001G>T в гене *SLC26A4* в гомозиготном состоянии. Мутации в гене *SLC26A4* описаны у пациентов с синдромом Пендреда и несиндромальной тугоухостью генетического типа DFNB4. У пациента 3 обнаружены патогенный вариант с.6442G>A (p.D2148N) и вероятно-патогенный вариант с.5429A>G (p.D1810G) в гетерозиготном состоянии в гене *CDH23*, ответственном за развитие синдрома Ушера и несиндромальной тугоухости генетического типа DFNB12. У пациента 4 выявлены патогенный вариант с.7579_7580insCCAAGGCT и вероятно-патогенный вариант с.5693G>A (p.R1898Q) в гетерозиготном состоянии в гене *MYO15A*, ответственном за развитие несиндромальной тугоухости генетического типа DFNB3.

Таким образом, причину нарушения слуха удалось установить в четырех семьях. Для оценки реальной информативности данной панели в настоящее время мы проводим дополнительное исследование на большем объеме выборки.

НОВАЯ СПЛАЙСИНГОВАЯ МУТАЦИЯ ГЕНА *CFTR* ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ

О.Н. Одинокова, Л.П. Назаренко

НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

Муковисцидоз (МВ) – частое тяжелое аутосомно-рецессивное заболевание, связанное с мутациями гена *CFTR*. Развитие методов и технологий ДНК-тестирования сделало возможным определение в большинстве случаев у больных нарушений синтеза, структуры и функции белка трансмембранного регулятора проводимости муковисцидоза. Согласно современным стандартам, генетический анализ мутаций гена *CFTR* может считаться эффективным при более чем 95%-ной вероятности обнаружения мутаций гена *CFTR*, что до настоящего времени для многих стран (вследствие недостаточности изученности популяционно-специфичных мутаций, приводящих к МВ) остается проблематичным. В связи с этим несомненно актуальным остается описание всего спектра возможных мутаци-

онных событий, приводящих к заболеванию. Нами впервые описывается новая мутация, нарушающая сплайсинг третьего экзона гена *CFTR* у больного с МВ, выявленного в ходе реализации программы неонатального скрининга в Томской области.

Первоначально у новорожденного высокоиммунорным иммунореактивного трипсина (ИРТ = 195 нг/мл), подтвержденным в ретесте, было проведено ДНК-тестирование с набором Elucigene® CF-EU2v1 на 50 частых европейских мутаций гена *CFTR*. С образцом ДНК по протоколу фирмы ставилась мультиплексная аллель-специфическая амплификация в двух вариантах: «А» и «В» – с наборами праймеров, включающими меченые олигонуклеотиды, соответствующие мутантным (постановка «А») и нормальным (постановка «В») ДНК-последовательностям гена *CFTR*.

Для ПЦР использовался амплификатор GeneAmp PCR System 9700. Анализ синтезированных фрагментов ДНК осуществлялся на приборе для капиллярного электрофореза 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с модулем «Фрагментный анализ». В результате была выявлена только одна мутация F508del в гетерозиготном состоянии и исключены I507del, 1677delTA, del21kb, R334W, R347P, R347H, G551D, R553X, G542X, 394delTT, N1303R, W1282X, E60X, P67L, G85E, 444delA, R117C, R117H, Y122X, 621+1G>T, 711+1G>T, L206W, 1078delT, A445E, R560T, 1811+1.6kbA>T, 1898+1G>A, 2143delT, 2184delA, 2347delG, W846X, 2789+5G>A, Q890X,

3120+1G>A, 3272-26A>G, R1066C, Y1092X(C>A), M1101K, D1152H, V520F, 1717-1G>A, S549R(T>G), S549N, R1158X, R1162X, 3659delC, 3849+10kbC>T, S1251N, 3905insT.

Вместе с тем в постановке «В» (рис. 1) у больного отмечалось изменение профиля пиков генных фрагментов: отклонение от нормы по четырем пикам, каждый из которых расщеплялся на два с появлением, наряду с нормальным фрагментом, укороченного на пять нуклеотидов фрагмента ДНК. Анализ показал, что все измененные пики соответствуют фрагментам экзона 3, что позволяло предполагать делецию ~5 bp в указанном участке гена.

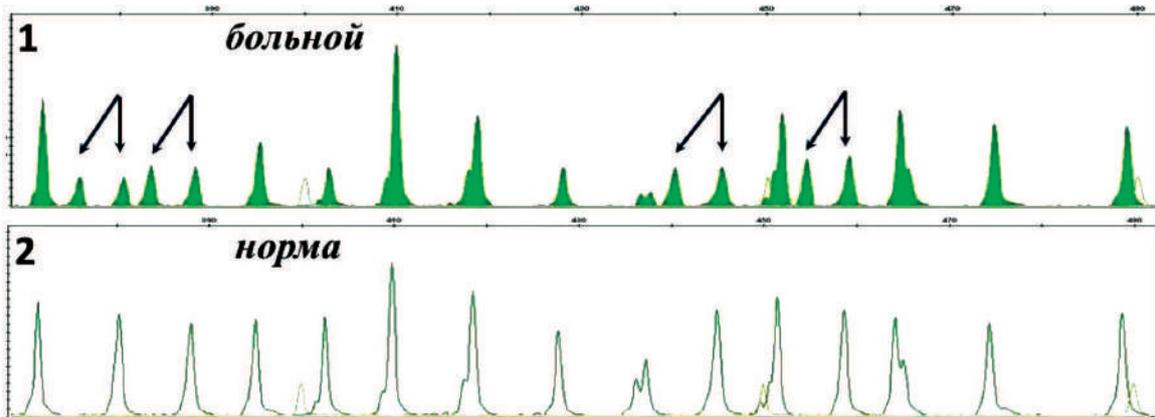


Рис. 1. Фрагментный анализ (постановка «В») участков гена *CFTR*. Стрелками показаны измененные ДНК-фрагменты гена, включающие области тестируемых с набором мутаций (394delTT, G85E, P67L, E60X)

Секвенирование амплифицированного экзона 3 выявило нарушение нуклеотидной последовательности в 3'-области экзона 3 на экзон-интронной границе (рис. 2; нарушения зафиксированы, начиная с нуклеотидной позиции, указанной на рис. 2 стрелкой).

Выявленное изменение нуклеотидной последовательности может быть следствием одного из событий: 1) делеции *Ggtaa* – т.е. делеции последнего нуклеотида экзона 3 и первых четырех нуклеотидов интрона 3; 2) делеции первых пяти нуклеотидов ин-

трона 3 – *gtaag*; 3) делеции со 2-го по 6-й нуклеотид интрона 3, т.е. фрагмента *taagg*.

В соответствии с рекомендациями по номенклатуре мутация была обозначена нами как с.273+2_273+6delTAAGG или IVS3+2_6delTAAGG. Описываемая нами делеция пяти нуклеотидов разрушает каноническую последовательность начальной области соответствующего интрона, следствием чего должно быть нарушение процесса сплайсинга экзона 3 гена *CFTR*.

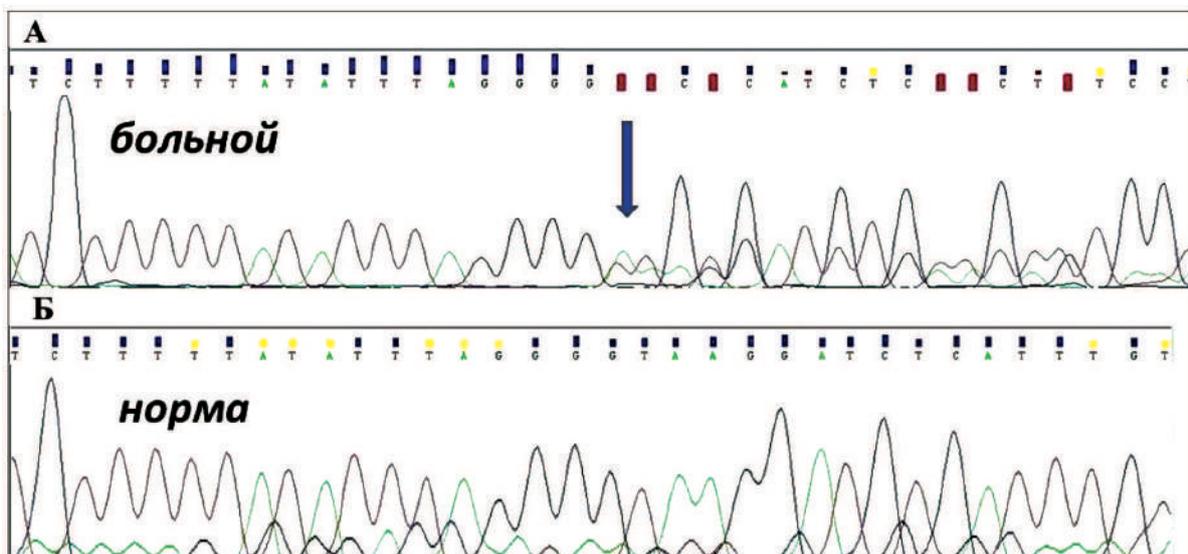


Рис. 2. Фрагмент сиквенса (с F-прайма) 3'-области экзона 3 гена *CFTR*. Нормальный фрагмент: ... ATC TTT TTA TAT TTA GGG **gtaaggatctcattgt** ... Изменённый фрагмент: ... ATC TTT TTA TAT TTA GGG **gatctcattgtacatt** ...

Определение обеих мутаций при МВ важно для ранней точной диагностики, возможного индивидуального подхода к лечению пациентов, а также для медико-генетического консультирования. В частности, вскоре после рождения описываемого пациента его семья решила на рождение второго ребенка. В ходе пренатальной диагностики в ДНК плодных тканей нами была выявлена мутация F508del в одной из двух копий гена *CFTR*, а

описываемая в настоящей работе 5 bp-делеция в зоне сплайсинга 3-го экзона была исключена, что также исключало заболевание муковисцидозом у плода.

Таким образом, нами впервые у больного муковисцидозом установлена не описанная ранее мутация c.273+2_273+6delTAAGG или IVS3+2_6delTAAGG гена *CFTR*, нарушающая сплайсинг 3-го экзона гена *CFTR*.

ПОИСК ПРИЧИН ПОЯСНО-КОНЕЧНОСТНЫХ МЫШЕЧНЫХ ДИСТРОФИЙ МЕТОДОМ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

О.П. Рыжкова, А.Н. Логинова, Н.В. Комарова, М.В. Булах, Д.А. Полякова, А.В. Поляков

Медико-генетический научный центр, г. Москва

Поясно-конечностные мышечные дистрофии (ПКМД) – наиболее генетически гетерогенная и распространенная группа заболеваний среди мышечных дистрофий. Всего различают 7 аутосомно-доминантных (АД) и 26 аутосомно-рецессивных (АР) форм ПКМД. Основная часть ПКМД (до 85%) наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Другая классификация подразделяет ПКМД на синдромальные и несиндромальные. Частота несиндромальных форм значительно выше, однако подгруппа синдромальных ПКМД более гетерогенна. Также существуют заболевания со сходными с ПКМД клиническими проявлениями, относящиеся к другим группам, таким как наследственные миопатии. Для многих форм наследственных болезней обмена, заболеваний с поражением мотонейронов и проводящих трактов также характерны симптомы слабости и атрофии мышц поясов конечностей. Наиболее распространенным заболеванием, с которым необходимо проводить дифференциальную диагностику ПКМД, является миодистрофия Дюшенна / Беккера (МДД / МДБ). МДД / МДБ – X-сцепленное заболевание, встречающееся с частотой 1 : 3 500 новорожденных мальчиков, тогда как расчетная частота всех аутосомно-рецессивных ПКМД в РФ составляет 1 : 27 000, а всех форм ПКМД – 1 : 23 000 [1, 2].

Показано, что в гене *DMD*, мутации которого приводят к развитию МДД / МДБ, наиболее частыми вариантами являются протяженные делеции / дупликации (CNV) [3]. Исходя из частот заболеваний и схожести клинической картины, первым этапом диагностики мальчиков, больных несиндромальными формами ПКМД, должно быть исследование указанных выше вариантов. Однако оставшиеся 30% мутаций рутинными методами выявлять трудоемко и затратно.

В РФ и большинстве европейских популяций наиболее распространенными генетическими вариантами, обуславливающими более половины всех случаев ПКМД, являются 2A и 2I типы. В выборке больных из РФ были выявлены «частые» мутации генов *CAPN3* и *FKRP* [2, 4]. В дальнейшем были обнаружены «частые» мутации, характерные для еще одной подгруппы ПКМД с клинической картиной, практически не отличающейся от МДД / МДБ, – саркогликанопатий. Эффективность систем выявления

только «частых» мутаций генов саркогликанопатий – *CAPN3*, *FKRP* – составляет более 50%, поэтому вторым этапом молекулярной диагностики для мужчин и первым этапом для женщин является поиск именно этих мутаций. При их отсутствии в недавнем времени проводился дальнейший последовательный анализ генов секвенированием по Сэнгеру в зависимости от частоты встречаемости той или иной формы. Однако в РФ для большинства форм ПКМД не проводились исследования и не были известны их частоты. Это приводило к увеличению сроков и критическому повышению стоимости диагностики.

Для АД форм ПКМД наличие «частых» мутаций и «горячих» экзонов не описано, поэтому единственным методом анализа долгое время оставалось последовательное секвенирование по Сэнгеру всех вовлеченных генов.

С появлением технологии массового параллельного секвенирования (MPS) стало возможным исследование большого количества генов одновременно. Однако данная технология имеет ряд ограничений: метод не позволяет выявлять инсерции и делеции длиной более 10 п.н., вариации длины повторов (в том числе экспансии триплетов), а также мутации в генах, у которых в геноме существует близкий по последовательности паралог (псевдоген).

Таким образом, исследования данным методом ни в коем случае не отменяют поиск протяженных CNV в гене *DMD* на первом этапе диагностики пациентов мужского пола. Также при относительной дешевизне исследования на один нуклеотид данный метод остается достаточно дорогим для пациента в целом. Другой особенностью MPS в настоящее время является его длительность. Поэтому исследование «частых» мутаций все еще остается актуальным.

Методы MPS характеризуются получением большого количества данных, что приводит к сложности их интерпретации. Чем большее число генов исследуется, тем дольше и сложнее диагностика. На сегодня выделяют несколько типов анализа методами MPS: исследование панелей генов, «клинического» экзона, полного экзона и генома. Исследование генома для диагностических целей не является оптимальным по соотношению цена / эффективность. Выбор того или иного типа анализа определяется

несколькими характеристиками патологии: клинической гетерогенностью заболевания, количеством описанных и вновь выявляемых генов, наличием / отсутствием четких дифференцирующих признаков.

Исходя из вышеуказанных характеристик, для ПКМД наиболее информативным исследованием является анализ экзема. Если поражение мышц является одним из многих симптомов, клиническая картина «размыта», непонятен этиопатогенез заболевания, более предпочтительным является исследование полного экзема с последующим перепроверением данных при отсутствии «причинного» патогенного варианта. Если клиническая картина достаточно очерчена, имеются четкие клинические признаки поражения мышц поясов конечностей, а также небольшое количество дополнительных симптомов, не связанных с патологией мышц, имеет смысл исследование «клинического» экзема. Однако в связи с открытием 500–600 новых генов в год, мутации в части из которых приводят к развитию моногенных заболеваний, предлагаемые производителями коммерческие решения «клинического» экзема быстро устаревают, и для врачей-генетиков возникает необходимость понимания «состава» данных панелей.

В ФГБНУ «МГНЦ» разработан «клинический» экзом, состоящий из более чем 6 300 генов, выбранных по базам данных OMIM, HGMD и Orfanet, включающий все гены, для которых описана связь с моногенной патологией. На сегодня данный «клинический» экзом является наиболее полным.

Несмотря на всю клиническую и генетическую гетерогенность группы ПКМД, в ней выделяется отдельная подгруппа несиндромальных форм. Для них основными клиническими признаками являются поражение мышц поясов конечностей, манифестация

заболевания после периода нормального развития, отсутствие грубых нарушений в других системах органов. Для диагностики таких пациентов нами была разработана панель, включающая 13 генов группы ПКМД, а также гены *DMD* и *EMD*. В нее не вошли те формы, которые описаны только однажды и только в одной не российской семье. Таким образом, данная панель подходит не только для исследования больных несиндромальными ПКМД, но и для диагностики мальчиков, больных МДД / МДБ, у которых не найдено CNV в гене *DMD*.

В результате пересмотрен алгоритм исследования больных с ПКМД. Появившееся в последнее время разнообразие лабораторных методов позволяет использовать различные подходы к молекулярно-генетической диагностике больных как ПКМД, так и другими заболеваниями со сходной клинической картиной, позволяя дифференцировать заболевания только на лабораторном этапе.

Литература

1. Рыжкова О.П., Дадали Е.Л., Руденская Г.Е., Поляков А.В. Частота кальпаиопатии и причина распространенности мутации с.550delA в гене *CAPN3* в Российской Федерации // Медицинская генетика. 2013. Т. 12, № 5 (131). С. 29–34.
2. Рыжкова О.П., Дадали Е.Л., Руденская Г.Е. и др. Частота пояснично-конечностной мышечной дистрофии типа 2I в Российской Федерации // Медицинская генетика. 2013. Т. 12, № 8 (134). С. 26–31.
3. Комарова Н.В., Логинова А.Н., Рыжкова О.П., Поляков А.В. Разработка эффективной системы детекции дупликаций в гене дистрофина на основе метода MLPA // Медицинская генетика. 2015. № 3. С. 17.
4. Рыжкова О.П., Билева Д.С., Дадали Е.Л. и др. Клинико-генетические характеристики пояснично-конечностной прогрессирующей мышечной дистрофии типа 2A // Медицинская генетика. 2010. Т. 9, № 11. С. 3–10.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОГРЕССИРУЮЩЕЙ ОССИФИЦИРУЮЩЕЙ ФИБРОДИСПЛАЗИИ У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ

И.Г. Сермягина, А.В. Поляков

Медико-генетический научный центр, г. Москва

Фибродисплазия оссифицирующая прогрессирующая (ФОП, FOP, MIM 135100) – редкое наследственное заболевание (частота – 1 : 2 000 000), характеризующееся генетически обусловленной гетеротопической оссификацией мягких тканей больного [1]. Течение патологического процесса имеет непредсказуемый прогрессирующий характер с чередованием «вспышек» возникновения костных образований. Формирование дополнительной патологической костной ткани происходит в различных частях тела, в местах травмирования мышечной и соединительной тканей. У больных с ФОП дополнительные кости могут формироваться в суставах и приводить к нарушениям подвижности опорно-двигательного аппарата, глубокой инвалидизации больных, вплоть до полного обездвиживания. Попытки хирургического удаления оссификатов, как правило, запускают новую волну патологического процесса [2, 3].

Фибродисплазия оссифицирующая прогрессирующая является аутосомно-доминантным заболеванием. За развитие данного патологического состояния ответственны мутации, возникающие в гене *ACVR1*, который локализован в локусе 2q23-q24. Ген состоит из 11 экзонов, первые два являются некодирующими.

В лаборатории ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра с 2009 г. проводится поиск мутаций в четырех экзонах гена *ACVR1*, в которых описано наибольшее количество мутаций. Данный регион соответствует двум функционально важным участкам в структуре белка рецептора *ACVR1*: GS-домен и домен протеинкиназы. Основное количество описанных патологических вариантов относится к типу миссенс-мутаций [4].

Были обследованы 68 неродственных больных. В результате исследований зарегистрированы мутации у 26 человек. В 23 случаях была выявлена

на самая частая мутация с.617G>A (p.Arg206His), локализованная в экзоне 6. В трех других случаях найдены ранее описанные мутации с.619C>G (p.Gln207Glu) в экзоне 6, с.974G>C (p.Gly325Ala) в экзоне 8 и с.1067G>A (p.Gly356Asp) в экзоне 9 гена *ACVR1* [5, 6]. В случаях, когда исследовали остальные экзоны гена *ACVR1*, мутации выявлены не были.

Результаты ДНК-диагностики ФОРП у российских пациентов соответствуют данным мировой научной литературы.

Литература

1. Коваленко-Клычкова Н.А., Клычкова И.Ю., Кенис В.М., Мельченко Е.В. Прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия у детей (обзор литературы и анализ 5 клинических случаев) // Травматология и ортопедия России. 2014. № 1. С. 102–109.
2. Антелева О.А., Лобжанидзе Т.Б., Никишина И.П. и др. Прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия // Русский медицинский журнал. 2005. № 8. С. 560
3. Рябова Т.В., Гелпе Н.А., Михалева Г.В., Сермягина И.Г. Клинические и рентгенологические проявления оссифицирующей прогрессирующей фибродисплазии у детей // Лечащий врач. 2011. № 1. С. 31.
4. Hüning I., Gillessen-Kaesbach G. Fibrodysplasia ossificans progressiva: clinical course, genetic mutations and genotype-phenotype correlation // Mol. Syndromol. 2014. V. 5 (5). P. 201–211.
5. Koster B., Pauli R.M., Reardon W. et al. Classic and atypical fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) phenotypes are caused by mutations in the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor *ACVR1* // Hum. Mutat. 2009. V. 30(3). P. 79–90.
6. Whyte M.P., Wenkert D., Demertzis J.L. et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva: middle-age onset of heterotopic ossification from a unique missense mutation (c.974G>C, p.G325A) in *ACVR1* // J. Bone Miner. Res. 2012. V. 27 (3). P. 729–737.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВРОЖДЕННОЙ ИЗОЛИРОВАННОЙ КАТАРАКТЫ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН

И.И. Хидиятова¹, И.М. Хидиятова¹, М.Т. Азнабаев², Э.К. Хуснутдинова¹

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

² Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Уфа

Катаракта – одно из наиболее частых заболеваний органа зрения, нередко приводящее к слепоте. Частота наследственных врожденных изолированных (несиндромальных) случаев катаракты составляет 1–6 : 10 000 детей [1]. Наследственные врожденные катаракты (НВК) фенотипически и генетически гетерогенны, чаще наследуются по аутосомно-доминантному, реже – по аутосомно-рецессивному и X-сцепленному типам. На сегодняшний день картировано 45 генных локусов, сцепленных с наследственными формами катаракты, идентифицировано 39 генов (<http://www.omim.org>). Около половины мутаций, приводящих к развитию катаракты, выявлено в генах кристаллинов – структурных белков хрусталика, примерно 15% – в генах коннексинов, 10% – в генах транскрипционных факторов [2]. Мутации в известных генах, выявляемые у больных с НВК, проживающих в различных регионах мира, достаточно разнообразны, и накопление данных о популяционном разнообразии спектра мутаций и соответствующих фенотипических признаках катаракты представляет значительный интерес, способствует как совершенствованию методов медико-генетического консультирования семей с данной патологией, так и познанию механизмов патогенеза заболевания.

Целью данного исследования являлось определение спектра мутаций в генах кристаллина альфа А (*CRYAA*), кристаллина альфа В (*CRYAB*), кристаллина гамма D (*CRYGD*), коннексина 46 (*GJA3*) и коннексина 50 (*GJA8*) у больных с врожденной изолированной катарактой из Республики Башкортостан (РБ).

Материалы и методы

Объектом исследования послужили образцы ДНК больных, членов их семей (40 неродственных семей) и контрольных выборок (здоровых жителей

РБ различной этнической принадлежности: русских (60 чел.), татар (65 чел.) и башкир (60 чел.)). Анализ структурных особенностей кодирующих последовательностей исследуемых генов проведен методом прямого секвенирования на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 XL (Applied Biosystems, США). Функциональная значимость выявленных миссенс-мутаций, помимо их скрининга в группах здоровых лиц, была оценена с помощью компьютерных программ PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) и SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>). Для предсказания функциональной значимости впервые выявленной делеции была использована компьютерная программа Mutation tasting (<http://www.mutationtaster.org/>).

Результаты

В результате проведенного нами исследования в гене *CRYAA* у трех неродственных больных с наследственной врожденной катарактой выявлены две новые, ранее не описанные миссенс-мутации: с.253C>T (p.Leu85Phe) идентифицирована в семье с аутосомно-доминантной врожденной ядерной катарактой, ассоциированной с микрофтальмом и микрокорнея; с.291C>G (p.His97Gln) обнаружена у двух неродственных пациентов с аутосомно-доминантной врожденной изолированной ядерной катарактой.

В гене *CRYAB* у обследованных нами пациентов было выявлено одно синонимичное изменение нуклеотидной последовательности – с.165G>A (p.Leu55Leu), оказавшееся известным нейтральным полиморфным вариантом (rs2228387). Данный полиморфный вариант был обнаружен у пяти неродственных пациентов, четыре из которых – башкиры, один – метис (украинец / башкирка).

В гене *CRYGD* идентифицированы две известные нуклеотидные замены: с.376G>A(p.Val126Met) (rs150318966) – миссенс-мутация, представленная в базе данных ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) как вариант, имеющий патогенное значение, и с.130A>G(p.Met44Val)(rs140206746) – миссенс-вариант, характеризующийся, по данным предсказательных программ, как «доброкачественный» полиморфный вариант. Мутация с.376G>A(p.Val126Met) обнаружена нами у пациента русской этнической принадлежности с врожденной ядерной катарактой.

В гене *GJA8* у четырех неродственных пациентов с аутосомно-доминантной врожденной катарактой обнаружены три мутации: с.68G>T (p.Arg23Thr), 179G>A (p.Gly60Asp) и с.133-142delTGGGGGGATG (p.Trp45SerfsX72), две последние из которых ранее не описаны. Миссенс-мутация с.68G>T(p.Arg23Thr) (rs80358203), идентифицированная ранее [3] в иранской семье с наследственной катарактой, была выявлена нами у двух неродственных больных русской этнической принадлежности в гетерозиготном состоянии, у одного из которых установлена передняя полярная катаракта, у другого – ядерная катаракта. Ранее не описанная нуклеотидная замена с.179G>A (p.Gly60Asp) идентифицирована у пациента русской этнической принадлежности с врожденной аутосомно-доминантной зонулярной катарактой, сочетающейся с микрофтальмом и микрокорнеа. У одной больной башкирской этнической принадлежности с передней полярной катарактой идентифицирована делеция 10 нуклеотидов в кодирующей части гена *GJA8*, приводящая к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона (с.del133_142 (p.Trp45Serfs*72)). Данная делеция также ранее не описана в литературе и, предположительно, является функционально значимой мутацией.

В гене *GJA3* в одной семье татарской этнической принадлежности с врожденной аутосомно-доминантной зонулярной катарактой обнаружена делеция

14 нуклеотидов –с.del1126_1139 (p.Asp376Glnfs*69). Данная делеция приводит к сдвигу рамки считывания, изменению сайта сплайсинга, в результате чего происходит удлинение СООН-концевого домена на 26 аминокислот, что теоретически должно оказывать негативное влияние на сборку коннексонов и, соответственно, на последующее формирование межклеточных ионных каналов. Это в итоге приводит к нарушению взаимодействия волокон хрусталика, обуславливая его помутнение. Наряду с этим в гене *GJA3* в двух семьях башкирской этнической принадлежности были выявлены два известных, но редких полиморфных варианта – с.231C>T(p.Phe77Phe) и с.398G>A(p.Arg133Gln), которые, предположительно, являются нейтральными полиморфными вариантами.

Таким образом, в результате исследования пяти генов у пациентов с врожденной изолированной катарактой из РБ было идентифицировано девять различных мутаций, пять из которых – новые, ранее не описанные варианты; генетическая причина заболевания установлена у 22,5% больных. Полученные нами данные пополняют сведения о разнообразии мутаций в исследованных генах, приводящих к развитию наследственной катаракты, об их фенотипическом проявлении. Это вносит вклад в познание патогенеза заболевания, а также его геногеографии, что служит основой для разработки оптимальных для исследуемого региона подходов ДНК-диагностики и эффективных методов генетического консультирования.

Литература

1. Francis P., Berry V., Bhattacharya S., Moore A. The genetics of childhood cataract // J. Med. Genet. 2000. V. 37. P. 481–488.
2. Shiels A., Hejtmancik J.F. Genetics of human cataract // Clin. Genet. 2013. V. 84, № 2. P. 120–127.
3. Willoughby C.E., Arab S., Gandhi R. et al. A novel *GJA8* mutation in an Iranian family with progressive autosomal dominant congenital nuclear cataract // J. Med. Genet. 2003. V. 40. P. e.124.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ СПАСТИЧЕСКИХ ПАРАПЛЕГИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН

И.М. Хидиятова^{1,3}, А.Ф. Ахметгалева¹, М.А. Янкина¹, Е.В. Сайфуллина²,
Р.Ф. Идрисова², В.В. Шавалиева³, Р.В. Магжанов², Э.К. Хуснутдинова^{1,3}

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

² Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Уфа

³ Башкирский государственный университет, г. Уфа

Наследственные спастические параплегии (НСП) – группа клинически и генетически гетерогенных нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся прогрессирующей спастичностью и гиперрефлексией нижних конечностей. В настоящее время известно более 70 генетических локусов, связанных с различными по типу наследования и клиническим проявлениям формами НСП. В большинстве случаев гены НСП были идентифицированы в результате исследований, проведенных методами NGS секвенирования, в частности полноэкзомного секвенирования. Значительная генетическая и клиническая гетерогенность НСП сочетается с по-

пуляционной неоднородностью как по распространенности заболевания, так и по спектру и частоте мутаций в ответственных генах, что определяет актуальность изучения этих показателей в отдельных регионах.

Целью настоящего исследования являлось изучение молекулярно-генетических основ НСП у больных из Республики Башкортостан (РБ), направленное на оптимизацию подходов ДНК-диагностики данной группы заболеваний в исследуемом регионе. В задачи исследования входили анализ генов спастина (*SPAST*), атластина (*ATL1*), белка REEP1 (*REEP1*) и NIPA1 (*NIPA1*) у пациентов из РБ и опре-

деление особенностей клинической картины заболевания у лиц с идентифицированными мутациями. Наряду с этим была поставлена задача поиска генетической причины заболевания в семье с аутосомно-доминантной (АД) НСП без мутаций в указанных четырех генах методом полноэкзомного секвенирования.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили ДНК 56 неродственных пациентов с диагнозом «наследственная спастическая параплегия» и членов их семей. Контрольную выборку составили образцы ДНК 150 здоровых индивидов. Поиск мутаций был осуществлен методами SSCP-анализа с последующим секвенированием образцов с измененной электрофоретической подвижностью, прямого секвенирования ряда экзонов гена *SPAST*, MLPA-анализа генов *SPAST* и *ATL1*. В одной семье у двух больных (мать и сын) исследование проведено методом полноэкзомного секвенирования с последующим биоинформатическим анализом, валидацией результатов методом секвенирования по Сэнгеру, поиском выявленных патогенных вариантов у двух других членов данной семьи – одного больного и одного здорового, а также скринингом на их наличие / отсутствие в общей обследуемой группе неродственных пациентов с НСП и в контрольной группе здоровых индивидов.

Результаты

В гене *SPAST* методом MLPA-анализа было идентифицировано два типа мутаций: делеция 1-го экзона (del 1 ex) и дупликация 1-го экзона (dup 1 ex). Делеция 1-го экзона была выявлена в гетерозиготном состоянии в четырех неродственных семьях пациентов татарской этнической принадлежности с аутосомно-доминантной формой НСП. Дупликация 1-го экзона идентифицирована у одного пациента, единственного больного в своей семье. Методами секвенирования в гене *SPAST* были идентифицированы три новые, ранее не описанные мутации: две микроделеции (с.322del29 (p.Val108SerfsX18) и с.885del10 (p.Thr295ThrfsX16)) и миссенс-мутация (с.1114A>G (p.Arg372Gly)). Микроделеции выявлены соответственно в семьях татарской и башкирской этнической принадлежности, в которых НСП имеет аутосомно-доминантный тип наследования. Миссенс-мутация обнаружена у пробанда марийской этнической принадлежности, спастическая параплегия у которого носит спорадический характер. Мутации обнаружены у больных НСП в гетерозиготном состоянии; они не выявлены у здоровых членов семей пациентов и в контрольных популяционных выборках, и их функциональная значимость подтверждена рядом компьютерных предсказательных программ. Общий вклад формы SPG4, обусловленной мутациями в гене *SPAST*, в общую структуру НСП в РБ составил 14,3%.

В гене *ATL1*, мутации в котором ответственны за развитие НСП формы SPG3, методом MLPA была идентифицирована дупликация 3-го экзона (dup 3 ex) в гетерозиготном состоянии у пробанда из русской семьи с АД НСП. Вклад гене-

тической формы SPG3 в структуру НСП в РБ составил 1,8%.

В гене *REEP1*, мутации в котором приводят к развитию НСП формы SPG31, было обнаружено два изменения нуклеотидной последовательности. Ранее не описанная нонсенс-мутация с.225G>A (p.Trp75*) идентифицирована в гетерозиготном состоянии у пациента русской этнической принадлежности со спорадической НСП, а известная мутация с.606+43G>T в 3'-UTR [1], также в гетерозиготном состоянии, была выявлена в семье башкирской этнической принадлежности с АД НСП. Вклад генетической формы НСП SPG31 в общую структуру заболевания в РБ составил 3,6%.

В гене *NIPA1* у пациентов с НСП патогенных мутаций не обнаружено.

В результате полноэкзомного секвенирования и последующего анализа у трех пациентов из одной семьи с АД НСП была идентифицирована нуклеотидная замена с.396C>A (p.Tyr132*) в гене *NSG1* (neuron specific gene family member 1), известная как rs377273535, представленная в базе данных ExAC (частота регистрации замены – $4,9 \times 10^{-5}$). Нуклеотидная замена с.396C>A в гетерозиготном состоянии была обнаружена нами только у трех пациентов из одной семьи и не выявлена как у здорового члена данной семьи, так и у других обследованных индивидов – больных НСП и контрольных здоровых лиц. Других патогенных мутаций в известных генах, ответственных за развитие НСП, в данной семье выявлено не было. Ген *NSG1* (*NEEP21*) ранее не был описан как причастный к развитию НСП. Ген *NSG1* (4p16.3) кодирует нейронспецифичный эндосомальный белок NEEP21, участвующий в таких важных для нервных клеток процессах, как синаптический эндоцитоз, эндосомальный транспорт и регуляция рециркуляции AMPA-рецепторов, аксональный транспорт белков, а также апоптоз – через взаимодействие с транскрипционным фактором p53 [2]. Кроме того, согласно результатам анализа *in silico* в программе STRING (<http://string-db.org/>), белок NEEP21 взаимодействует с белком эндоплазматического ретикулаума сейпином (BSC2L2), определенные мутации в котором приводят к развитию стресса ЭПР и вызывают одну из форм спастической параплегии – SPG 17. На основании этих предпосылок мы предполагаем, что ген *NSG1* может претендовать на роль нового гена-кандидата, а нуклеотидная замена с.396C>A (p.Tyr132*) – являться новой патогенной мутацией, приводящей к развитию АД НСП. Для доказательства этой гипотезы необходимы дальнейшие функциональные исследования.

При всех выявленных нами мутациях в исследованных генах клиническая картина заболевания в целом соответствовала неосложненной форме наследственной спастической параплегии, но характеризовалась существенной меж- и внутрисемейной вариабельностью по возрасту манифестации и проявлению основных клинических признаков. Полученные данные вносят вклад в познание патогенеза НСП, их геногеографии и являются основой для разработки оптимальных для населения РБ подходов ДНК-диагностики данной группы нейродегенеративных заболеваний.

Литература

1. Züchner S., Wang G., Tran-Viet K.-N. et al. Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31 // *Am. J. Hum. Genet.* 2006. V. 79. № 2. P. 365–369.
2. Muthusamy N., Chen Y.-J., Yin D.-M. et al. Complementary roles of the neuron-enriched endosomal proteins NEEP21 and calcyon in neuronal vesicle trafficking // *J. Neurochem.* 2015. V. 132. P. 20–31.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ АРХИТЕКТУРА НЕЗАВЕРШЕННОГО ОСТЕОГЕНЕЗА В РОССИИ

Р.И. Хусаинова, Д.Д. Надыршина, А.Р. Габидуллина, Э.К. Хуснутдинова

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

Незавершенный остеогенез (НО) (МКБ-10 – Q78.0), известный также как синдром голубых склер, или несовершенный остеогенез, – клинически и генетически гетерогенное наследственное заболевание, встречающееся с частотой от 1 : 10 000 до 1 : 30 000 новорожденных в различных странах мира, приводящее к инвалидизации с детского возраста из-за многочисленных переломов. По данным Минздрава РФ, в России живут 12,3 тыс. человек с редкими наследственными заболеваниями, из них 556 взрослых и детей с НО, который является самым частым генетическим заболеванием костей. На сегодняшний день идентифицировано 19 генов, ответственных за развитие 18 типов НО, которые наследуются как по аутосомно-доминантному, так и по аутосомно-рецессивному типу, и продолжается поиск новых генов, вовлеченных в патогенез заболевания. У больных НО обнаружены мутации в генах, кодирующих белки коллагена 1-го типа (*COL1A1*, *COL1A2*), пролил-3-гидроксилазы 1 (*LEPRE1*), хрящ-ассоциированного белка (*CRTAP*), пептидил-пролил-цис-транс-изомеразы В (*PIIB*), молекулярного шаперона проколлагена 1 *FKBP65* (*FKBP10*), ингибиторов серпинпептидаз H1 и F1 (*SERPINH1* и *SERP1F1*), костного морфогенетического белка 1 (*BMP1*), интерферон индуцированного трансмембранного белка BRIL (*IFITM5*), трансмембранного белка 38В, вовлеченного в регулирование уровня внутриклеточного кальция (*TMEM38B*), сигнальной молекулы WNT1, необходимой для функционирования остеобластов и развития костей (*WNT1*), транскрипционных факторов, регулирующих дифференцировку костных клеток (*SP7*) и экспрессию проколлагена 1-го типа (*CREB3L1*), пластина 3 (*PLS3*), участвующего в синтезе актиновых пучков, лизингидроксилазы (*PLOD2*), участвующий в формировании коллагеновых волокон, остеоонектина, регулирующего пролиферацию и взаимодействие клеток с матриксом путем связывания ионов кальция с гидроксипатитом (*SPARC*); гены *SEC24D* и *P4HB* идентифицированы недавно, молекулярный механизм, обуславливающий развитие НО, до конца не выяснен. Большинство обнаруженных мутаций в генах, обуславливающих НО, как правило, являются уникальными для каждой семьи, их профили не ограничиваются специфическими регионами генов, а разбросаны по всем структурным областям и характеризуются большим разнообразием. Показано, что существуют мутации, характерные только для отдельных популяций.

Учитывая тяжесть заболевания и инвалидизирующее течение, несмотря на трудоемкость процесса обнаружения мутаций, семьи больных НО нуждаются в определении генетического дефекта заболева-

ния для эффективного медико-генетического консультированияотягощенных семей.

Цель исследования – поиск изменений нуклеотидной последовательности генов *COL1A1*, *COL1A2*, *LEPRE1*, *PIIB1*, *CRTAP*, *SERPINF1* и *IFITM5* у пациентов с НО, оценка патогенетической значимости, анализ генофенотипических корреляций идентифицированных изменений с клинической формой и типом наследования заболевания.

Материалы и методы

В работе использованы образцы ДНК 99 больных незавершенным остеогенезом из 86 неродственных семей из нескольких регионов России и 72 контрольных образца здоровых индивидов с нормальным уровнем МПКТ, соответствующих по возрасту, полу исследуемой выборке пациентов. Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Поиск изменений нуклеотидной последовательности проводили с применением методов SSCP-анализа (анализ конформационного полиморфизма однонитевой ДНК) и секвенирования. Для поиска описанных ранее вариантов использованы базы данных вариантов, найденных при проведении экзомного секвенирования (Exome Aggregation Consortium; Exome Variant Server), геномного и таргетного секвенирования (проект «1 000 геномов»), коротких генетических вариантов (dbSNP) и структурных вариантов (dbVar). Для вариантов, которые не были описаны ранее, проведен анализ патогенности с использованием технологии *in silico* (компьютерное моделирование с применением предсказательных программ SIFT, Polyphen2, MutPred, MutationTaster, Human Splicing Finder).

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований выявлено 13 мутаций в пяти из семи изученных генов, пять из которых идентифицированы впервые.

В гене *COL1A1* обнаружено девять мутаций, пять из которых нонсенс-мутации (с.358C>T (p.Arg120X), с.967G>T (p.Gly323X), с.1081C>T (p.Arg361X), с.1243C>T (p.Arg415X), с.2869C>T (p.Gln957X)), три мутации сдвига рамки считывания (с.3540_3541insC (p.Gly1181AlafsX293), с.579delT (p.Gly194ValfsX71), с.2444delG (p.Gly815AlafsX293)) и одна мутация сайта сплайсинга (с.40005+1G). Мутации с.967G>T (p.Gly323X) и с.3540_3541insC (p.Gly1181AlafsX293) описаны впервые.

Анализ генов пролил-3-гидроксилирующего комплекса (*LEPRE1*, *CRTAP* и *PIIB*) у больных незавер-

шенным остеогенезом выявил ранее не описанные мутации с.641T>C (p.Val214Ala) в 10-м экзоне гена *CRTAP* и с.1724+4G>A в 11-м экзоне гена *LEPRE1*.

В гене *SERPINF1* выявлена ранее не описанная миссенс-мутация с.913C>G (p.Leu305Val) у больного НО башкирской этнической принадлежности с предположительно IV типом НО, у которого также обнаружена мутация с.641T>C (p.Val214Ala) в гене *CRTAP*.

Идентифицирована ранее описанная мутация с.-14C>T в 5'-UTR гена *IFITM5*, которая создает новый стартовый кодон инициации транскрипции, в результате чего добавляется 5 аминокислот в N-конец белка. Данная мутация выявлена в гетерозиготном состоянии у пробанда башкирской этнической принадлежности и приводит к развитию V типа НО.

Все выявленные мутации определены в гетерозиготном состоянии и являются уникальными для каждой семьи (за исключением мутации с.579delT (p.Gly194ValfsX71) в гене *COL1A1*, идентифицированной в двух неродственных семьях). Один пациент с IV типом НО с аутосомно-рецессивным типом наследования является гетерозиготным носителем двух мутаций (с.641T>C (p.Val214Ala) в гене *CRTAP* и с.913C>G (p.Leu305Val) в гене *SERPINF1*). В генах *COL1A2* и *PP1B* патогенных мутаций не обнаружено.

Моделирование потенциального влияния впервые идентифицированных мутаций на функционирование кодируемого белка (с помощью предсказательных программ) оценило их повреждающий эффект для соответствующего белка с вероятностью более 99%.

Семь мутаций приводили к аутосомно-доминантной форме, две – к аутосомно-рецессивной

форме НО, три возникли *de novo*, из них мутация с.579delT (p.Gly194ValfsX71) в гене *COL1A1* встречалась в двух неродственных семьях, в одном случае имела аутосомно-доминантный тип наследования, в другом – возникла *de novo*.

Наши результаты согласуются с данными других исследователей. Несмотря на большое количество мутаций, зарегистрированных в базе данных по незавершенному остеогенезу (<https://oi.gene.le.ac.uk>), для каждой популяции характерен свой спектр, состоящий из небольшого числа мутаций, при этом большинство исследователей находят ранее не описанные в литературе мутации наряду с известными.

Таким образом, НО – гетерогенное наследственное заболевание, в развитие которого вовлечено множество генов, участвующих в формировании структуры основного белка костей – коллагена I-го типа, в его посттрансляционной модификации, фолдинге, секреции и процессинге, а также гены, участвующие в регуляции транскрипции генов, вовлеченных в процессы костного ремоделирования. У российских пациентов с НО выявляются, наряду с известными, ранее не описанные мутации, и, учитывая уникальность генофонда народов, проживающих в России, есть вероятность, что при использовании современных технологий геномного анализа можно выявить и ранее не известные гены, вовлеченные в патогенез НО. Несмотря на трудности в изучении молекулярно-генетических основ НО, разработка надежных способов диагностики и прогнозирования риска развития заболевания необходима для оптимизации медико-генетического консультирования отягощенных семей.

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕЙРОПАТИЙ С СОЧЕТАННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛНОЭКЗОМНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ

О.А. Шагина¹, А.В. Поляков¹, Е.Л. Дадали¹, Т.Б. Миловидова¹, В.П. Федотов²

¹ Медико-генетический научный центр, г. Москва

² Воронежская областная клиническая больница № 1, медико-генетическая консультация, г. Воронеж

Наследственная моторно-сенсорная нейропатия (НМСН) – клинически и генетически гетерогенная группа наследственных болезней. На основе данных электронейромиографического обследования, с одной стороны, выделяют два типа НМСН: демиелинизирующий (НМСН1) и аксональный (НМСН2), базируясь на значении скорости проведения импульса (СПИ) по срединному нерву 38 м/с. Однако внутри каждого из типов описаны более 30 генетических вариантов НМСН. С другой стороны, показана условность выделения двух типов НМСН, так как мутации в одном и том же гене могут приводить как к аксональной, так и к демиелинизирующей форме заболевания. Описаны семьи, в которых у разных больных родственников регистрируются СПИ как больше, так и меньше 38 м/с; такие случаи НМСН предлагают относить к промежуточному типу.

С активным внедрением в клиническую практику полногеномных методов исследования перед врачом остро встал вопрос интерпретации данных и поиска генетического варианта, являющегося причи-

ной заболевания у пробанда. Стала понятна решающая роль знания клинических нюансов и особенностей заболевания в каждом конкретном случае. С появлением публикаций по результатам полногеномных исследований по разным наследственным патологиям становится очевидным, что различные синдромы, которые ранее считались независимыми друг от друга, имеют одну молекулярную основу. Однако описано множество случаев, когда у одного и того же пробанда выявляются мутации различных генов, и его клинический фенотип обусловлен действиями мутаций различных генов.

В течение 20 лет сотрудниками МГНЦ и Самарской МГК наблюдалась семья, в которой в пяти поколениях сегрегировала наследственная моторно-сенсорная полинейропатия у 12 членов семьи. На основании измерения скоростей проведения нервного импульса при электронейромиографическом обследовании не удалось четко дифференцировать НМСН 1-го и 2-го типов, так как СПИ по срединному нерву имели промежуточные значения у разных

пораженных членов семьи. С 2000 по 2015 г. был проведен поиск мутации в частых и относительно частых генах, ответственных за НМСН: *PMP22*, *P0*, *CX32*, *EGR*, *LITAF*, *MFN2*, *NEFL*, *HSPB1*; мутаций в них выявлено не было. Число доступных для сбора материала членов семьи (6 человек) не позволило провести полногеномный анализ сцепления. В 2016 г. был проведен анализ клинического экзоза и выявлена мутация с.271C>G (Arg91Gly) гена *INF2*, который в 2011 г. был описан как причина Charcot-Marie-Tooth disease, dominant intermediate E (OMIM 614455) – промежуточного типа НМСН с гломерулонефритом. Сегрегация данного варианта с заболеванием в семье была подтверждена секвенированием по Сэнгеру. Интересно, что в доступных нам медицинских документах семьи не было никаких упоминаний о болезнях почек у пораженных членов семьи. Однако при запросе выяснилось, что у пораженных членов семьи с детского возраста регистрируется протеинурия, которую никак не связывали с наследственной нейропатией. В то же время ни у кого из больных данная протеинурия не имела исхода в хроническую почечную недостаточность, наблюдаемую у большинства больных с мутациями гена *INF2*.

Так как большинство описанных при наследственной нейропатии мутаций гена *INF2* локализованы в экзоне 2, проведено исследование методом прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру последовательности этого экзона у 140 неродственных больных НМСН. В результате у двух больных были выявлены мутации с.327_344del18 и с.230T>C (Leu77Pro) в гетерозиготном состоянии. При анализе историй болезни установлено, что у обоих больных был диагностирован нефротический синдром, более того, у одной из больных была удалена почка и проведена трансплантация донорской, однако данный синдром никак не связывали с проявлениями нейропатии.

При исследовании обогащенной экзомной панели у двух других неродственных больных с наследственной моторно-сенсорной нейропатией 2-го типа была выявлена одна и та же мутация с.110G>C (Arg37Pro) гена *HINT1* в гомозиготном состоянии. Мутации в этом гене приводят к аутосомно-рецессивной нейромиотонии с аксональной нейропатией (OMIM 137200). Однако обследуемые пробанды предъявляли жалобы только на проявления ней-

ропатии: снижение мышечной силы и похудание дистальных отделов конечностей, невозможность хождения на пятках, изменение походки. Миотонические феномены были выявлены у этих пациентов при прицельном углубленном неврологическом осмотре уже после получения результатов экзомного секвенирования. Кроме этих пациентов были выявлены еще четыре неродственных больных НМСН с миотоническими феноменами, и у всех была выявлена мутация с.110G>C (Arg37Pro) гена *HINT1* в гомозиготном состоянии. Данная мутация описана как частая у греческих больных аксональной нейропатией, неоднократно выявлялась у пробандов из других популяций, и есть основания предполагать высокую распространенность мутации с.110G>C (Arg37Pro) гена *HINT1* как причину НМСН2 у российских больных.

Тем не менее встречаются случаи сочетания фенотипов, причиной которых являются мутации в разных генах у одного пробанда. В лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ МГНЦ обследована пара монозиготных близнецов. Причиной обращения за медико-генетической помощью явились прогрессирующая задержка моторного развития, трудности при ходьбе, атрофии дистальных мышц голени и рук, снижение СПИ по срединному нерву до 4 и 5,2 м/с, наличие множественных костных разрастаний трубчатых костей. При сборе генеалогического анамнеза было установлено, что экзостозы трубчатых костей наблюдались у отца и деда близнецов. У отца пробандов были жалобы на деформацию стоп, слабость рук и ног, неуверенность походки, при проведении электронейромиографии выявлено снижение СПИ по срединному нерву до 10,3 м/с. В результате молекулярно-генетического анализа у сестер и их отца были выявлены ранее описанные в базе HGMD мутации с.389A>G (p.Lys130Arg) гена *P0* (1q22), ответственного за НМСН1 типа, и с.678 C>A (p. Tyr226Stop) гена *EXT2* (11p12).

Таким образом, не только при анализе полногеномных данных, но и при определении спектра необходимых больному молекулярно-генетических обследований следует особо внимательно относиться к особенностям клинического фенотипа пробанда, так как это может существенно снизить материальные и временные затраты на установление причины болезни.

МНОЖЕСТВЕННАЯ ЭКЗОСТОЗНАЯ ХОНДРОДИСПЛАЗИЯ В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

А.Е. Яковлева¹, А.Л. Сухомясова^{1,2}, Н.Р. Максимова¹, А.Л. Данилова¹,
С.И. Пономарева¹, Е.Е. Гуринова², Р.Н. Иванова²

¹ Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск

² Республиканская больница № 1 – Национальный центр медицины, г. Якутск

Множественная экзостозная хондродисплазия (МЭХД) (OMIM 133700, OMIM 133701) – аутосомно-доминантное заболевание, распространенность которого в мире варьирует от 1 : 100 в небольшой популяции Гуама до 1,3 : 100 000 в европейской популяции [1]. В популяциях европейской части России распространенность данного заболевания

составляет: у башкиров – 0,06 : 100 000, у чувашей – 0,34 : 100 000, в Тверской области – 0,39 : 100 000, в Ростовской области – 0,16 : 100 000, в Краснодарском крае – 0,28 : 100 000 [2].

МЭХД характеризуется наличием множественных хрящевых экзостозов в районах костного роста. Появление и рост экзостозов происходят, как пра-

вило, в период физиологического роста и полового созревания, когда идет активный рост скелета. В основном поражаются кости, обладающие наибольшей потенциальной способностью к росту (плечевая и бедренная кости, кости предплечья и голени), несколько реже – плоские кости (ребра, лопатки, кости таза), очень редко – кости кистей, стоп, позвоночника. Кости соединительнотканного происхождения (свода черепа, лицевого скелета и др.), которые в своем развитии не имеют хрящевой стадии, при данном заболевании не страдают [2].

Множественная экзостозная хондродисплазия – генетически гетерогенное заболевание. В настоящее время картировано два гена: *EXT1* (OMIM 608177) (8q24.11-q24.13), содержит 11 экзонов, и *EXT2* (OMIM 608210) (11p12-p11), состоит из 16 экзонов, мутации в которых отвечают за 90% из всех случаев МЭХД [3–5]. Описаны 440 мутаций в гене *EXT1* и 230 мутаций в гене *EXT2*. В зависимости от национальности около 56–78% мутаций обнаруживаются в гене *EXT1*, а в гене *EXT2* – 21–44% мутаций. Большинство мутаций являются точечными. Предполагается, что гены *EXT1* и *EXT2* являются генами-супрессорами канцерогенеза, так как установлено их участие при злокачественной трансформации хрящевой и костной ткани [6]. В Российской Федерации были проведены работы по изучению молекулярно-генетической причины заболевания и поиску хирургического лечения МЭХД [2, 3]. В Республике Саха (Якутия) (РС(Я)) ранее не проводились клинико-генеалогические и молекулярно-генетические исследования МЭХД.

Целью данной работы является анализ случаев с клинически установленным диагнозом «множественная экзостозная хондродисплазия» в Республике Саха (Якутия).

Материалы и методы

Данные о больных получены из Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии Медико-генетического центра Республиканской больницы № 1 – Национального центра медицины. Проведен анализ половозрастного состава, национальной принадлежности, мест проживания больных с МЭХД.

Результаты

В Медико-генетическом центре Республиканской больницы №1 – Национального центра меди-

цины с клинически установленным диагнозом «множественная экзостозная хондродисплазия» состоят на учете 70 больных из 40 семей, преимущественно якуты – 58 (82,9%).

В настоящее время в РС (Я) МЭХД зарегистрирована в 16 улусах и в г. Якутске. Наибольшее число больных проживает в г. Якутске – 21 (30%), в Вилюйском – 10 (14,3%), Кобяйском – 8 (11,4), Сунтарском и Жиганском – по 5 (7,1%) улусах. Распространенность МЭХД в Республике Саха (Якутия) в среднем составила 7,27 на 100 тыс. населения, у якутов – 12,43 на 100 тыс.

Возраст больных варьирует от 7 до 59 лет, 34 больных женского пола (48,6%) и 36 мужского (51,4%). Клиническая картина у больных МЭХД характеризуется выраженным полиморфизмом, обусловленным различным характером поражения костей экзостозами. Средний возраст появления экзостозов – (6,25 ± 0,8) лет.

Таким образом, множественная экзостозная хондродисплазия является одним из распространенных наследственных заболеваний в РС (Я), в дальнейшем планируется проведение молекулярно-генетических исследований генов *EXT1* и *EXT2*.

Литература

1. Xia P., Xu H., Shi Q., Li D. Identification of a novel frameshift mutation of the *EXT2* gene in a family with multiple osteochondroma // *Oncology Letters*. 2016. V. 11. P. 105–110.
2. Наследственные болезни: национальное руководство / под ред. Н.П. Бочкова, Е.К. Гинтера, В.П. Пузырева. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. С. 691.
3. *Благодатский М.Д., Рунович А.А., Рычков А.В.* Случай множественной экзостозной хондродисплазии позвоночника с компрессией спинного мозга // *Сибирский медицинский журнал*. 1999. Т. 19 (4). С. 52–54.
4. *Чеснокова Г.Г.* Изучение структурных аномалий и точковых мутаций генов *EXT1* и *EXT2* при множественной экзостозной хондродисплазии и спорадических злокачественных новообразованиях: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1999. 24 с.
5. Kang Q., Xu J., Zhang Z. et al. Mutation screening for the *EXT1* and *EXT2* genes in Chinese patients with multiple osteochondromas // *Arch. of Med. Res.* 2013. V. 44. P. 542–548.
6. *Ishimaru D., Gotoh M., Takayama S. et al.* Large-scale mutational analysis in the *EXT1* and *EXT2* genes for Japanese patients with multiple osteochondromas // *BMC Genetics*. 2016. P. 17–52.
7. *Wu Y., Xing X., Xu S. et al.* Novel and Recurrent Mutations in the *EXT1* and *EXT2* Genes in Chinese Kindreds with Multiple Osteochondromas // *J. Orthop. Res.* 2013. V. 9. P. 1492–1499.

Раздел 6

ЦИТОГЕНЕТИКА

КЛИНИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМИ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ И ХРОМОСОМНЫМИ МИКРОДУПЛИКАЦИЯМИ

Е.О. Беляева¹, А.А. Кашеварова¹, Н.А. Скрыбин¹, М.Е. Лопаткина¹,
О.А. Салюкова^{1,2}, М.Н. Филимонова¹, О.В. Лежнина¹, А.Р. Шорина^{3,4},
А.Б. Масленников⁴, Л.П. Назаренко^{1,2}, И.Н. Лебедев^{1,2}

¹ НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

² Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск

³ Новосибирский областной детский клинический психоневрологический диспансер, г. Новосибирск

⁴ Городская клиническая больница № 1, г. Новосибирск

Известно, что патогенные вариации в числе копий повторов ДНК (CNV) чаще всего ассоциированы с задержкой умственного и физического развития, психоневрологическими нарушениями и врожденными пороками. Так, у пациентов с умственной отсталостью и нарушениями развития описаны более 230 микроделений и только порядка 80 микроудuplicаций с доказанной патогенетической значимостью. Дисбаланс по соотношению микроперестроек вызывает предположение о том, что микроудuplicациям как причине нарушений интеллекта уделяется недостаточное внимание. Причин гиподиагностики микроудuplicационных синдромов, помимо устоявшегося мнения о меньшем клиническом значении избытка генетического материала по сравнению с гаплонедостаточностью при делециях ввиду более мягкого клинического проявления, может быть несколько. Основными из них являются: особенности механизма генерации реципрокных CNVs, когда при внутрихроматидной неаллельной гомологичной рекомбинации реципрокные удuplicации отсутствуют; неоднозначность генофенотипических корреляций – удuplicации в зависимости от точек разрыва гена могут как быть нейтральными, так и приводить к реализации патологического фенотипа через усиление или снижение / потерю функции гена; частое наследование частичных трисомий от условно здоровых родителей, что не позволяет сразу однозначно интерпретировать их как патогенные; удuplicации могут иметь неполную пенетрантность, вариабельную экспрессивность или затрагивать импринтированные локусы, ассоциированные с интеллектуальными нарушениями.

Цель работы: поиск патогенетически значимых хромосомных микроудuplicаций, установление их частоты и спектра среди пациентов с недифференцированными интеллектуальными нарушениями.

Материалы и методы

Обследованы 216 пациентов с недифференцированными формами интеллектуальных расстройств (умственная отсталость, задержка психомоторного развития) в возрасте от 2 до 18 лет

методом матричной сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (array CGH). Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ и проводилось после получения информированного согласия от родителей пробандов. Поиск микроструктурных хромосомных aberrаций осуществлялся с помощью микрочипов Human Genome CGH SurePrintG3 HumanCGH 8×60K (Agilent Technologies, США) согласно рекомендациям производителя микрочипов. Результаты были визуализированы в программе Cytogenomics (v3.0.2.11) (Agilent Technologies, США). Интерпретация клинической значимости CNV проводилась с использованием Базы данных геномных вариантов (DGV) и онлайн-версии Каталога наследственных болезней «Менделевское наследование у человека» (OMIM). С целью подтверждения наличия обнаруженных патогенетически значимых микроудuplicаций у пробандов и определения их происхождения были подобраны праймеры и проведена количественная ПЦР в режиме реального времени на приборе AriaMXReal-TimePCRSYSTEM (Agilent Technologies, США).

Результаты

Среди выявленных патогенетически значимых вариаций числа копий участков ДНК, зарегистрированных у 81 пациента с недифференцированными интеллектуальными нарушениями (37%), было обнаружено 17 микроудuplicаций (21%). При анализе происхождения частичных трисомий установлено, что в 8 случаях (47%) микроудuplicации возникли *de novo*, а в 9 случаях (53%) были унаследованы от фенотипически здоровых родителей.

Заключение

Доля патогенетически значимых микроудuplicаций среди выявленных CNVs в группе пациентов с недифференцированными интеллектуальными нарушениями составила 21%. Это подтверждает недоучет микроудuplicаций как причины развития патологических состояний и указывает на важность их более детального изучения. Расширение

знаний о генетике недифференцированных интеллектуальных расстройств показывает, что патогенетическую значимость выявляемых микродупликаций при таких распространенных признаках, как умственная отсталость и задержка психомоторного развития нельзя недооценивать.

Работа проведена на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, г. Томск) с использованием материалов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

ЭЛИМИНАЦИЯ КОЛЬЦЕВОЙ ХРОМОСОМЫ КАК ОСНОВА КОРРЕКЦИИ КРУПНЫХ ХРОМОСОМНЫХ ДЕФЕКТОВ

**А.А. Кашеварова¹, Н.А. Скрябин¹, Е.О. Беляева¹, А.М. Никонов²,
О.В. Плотникова², Т.В. Никитина¹, А.Г. Мензоров³, С.А. Васильев¹,
М.Е. Лопаткина¹, Е.Н. Толмачёва¹, Л.П. Назаренко¹, И.Н. Лебедев¹**

¹ НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

² Диагностический центр Алтайского края, г. Барнаул

³ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Развитие и активное применение высокомолекулярных полногеномных технологий привели к выявлению большого числа разнообразных делеций и дупликаций. Некоторые из этих мутаций повторяются у разных пациентов, другие, по крайней мере пока, зарегистрированы единожды. Однако даже в случае, когда абберрации затрагивают один и тот же регион, их границы не всегда точно совпадают. Вследствие этого мы имеем огромный список фактически уникальных мутаций. Иногда делеции или дупликации затрагивают единичные гены, но чаще всего это протяженные аномалии, что затрудняет идентификацию гена или генов, изменение числа копий которых может привести к заболеванию. Не стоит думать, что ситуация сильно упрощается в случае моногенных аббераций. Иногда у пациента с делецией или дупликацией одного гена регистрируется множество клинических симптомов, которые, на первый взгляд, никак не объяснить с помощью обнаруженного генетического дефекта [1, 2]. Но это все касается диагностики генетических причин патологии. Когда же причина установлена, встает вопрос о медицинской помощи пациенту. К сожалению, в настоящее время практически не существует способов эффективного лечения пациентов с хромосомными болезнями. Однако недавно впервые была высказана идея о хромосомной терапии заболеваний, обусловленных протяженными мутациями. В основу лег феномен потери кольцевой хромосомы при культивировании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), полученных из фибробластов пациентов с микроделеционными синдромами, возникающими вследствие терминальной микроделеции при образовании кольца [3, 4].

В связи с этим целью данного исследования явилась разработка методов редактирования генома, содержащего хромосому с мутацией, путем замыкания ее в кольцо. При дальнейшем культивировании ИПСК с кольцевой хромосомой ожидается ее спонтанная потеря и амплификация нормального гомолога. Работа выполняется на материале двух пациентов с задержкой развития, интеллектуальными расстройствами и дисморфиями, у которых на начальном этапе диагностики с помощью стандартного кариотипирования выявлены кольцевые хромосомы 13 и 22.

Пациент Г. с кольцевой хромосомой 13. 17 лет. На момент осмотра вес 93 кг (97-й перцентиль), рост 178 см (50–75-й перцентиль), окружность головы 58 см (98-й перцентиль). Отмечены глубоко посаженные глаза, изогнутая верхняя губа, аномальный рост волос на макушке, волосы жесткие, светлые, избыточный рост волос на предплечьях, микроорхидизм, сандалевидная щель стопы. Для уточнения границ делеции, повлекшей за собой образование кольца, нами проведена аCGH-диагностика и выявлены микроделеция в области 13q34 (1,924 Mb) и трипликация 3q12.2 (74 kb). Клиническая значимость амплификации области 3q12.2 на сегодняшний день не ясна. Она выявляется как у относительно здоровых людей, так и у онкологических больных [5]. С помощью ПЦР в реальном времени показано, что микроделеция возникла *de novo*, а трипликация имеет отцовское происхождение. В первичной культуре фибробластов кожи аCGH также выявлена микроделеция 13q34 (2,099 Mb), но дополнительно еще и полная моносомия по хромосоме 13 в части клеток. С помощью FISH-метода с зондами на центромеры хромосом 13 и 21 и субтеломерную область длинного плеча хромосомы 13 было подтверждено наличие кольцевой хромосомы и обнаружено, что 50% фибробластов имеют моносомию по хромосоме 13.

Пациентка З. с кольцевой хромосомой 22. 4 года. Вес – 14,5 кг (25-й перцентиль), рост – 108 см (95-перцентиль). Телосложение астеническое, узкое туловище. Имеется ряд лицевых дисморфий. На МРТ головного мозга визуализирована картина варианта Денди–Уолкера [6]. С помощью аCGH-анализа идентифицирована микроделеция 22q13.32, обусловившая образование кольцевой хромосомы 22, наличие которой было подтверждено с помощью FISH с зондами на центромеру хромосомы 22 и на ген *TBC1D22A*, локализованный вблизи микроделеции. Кроме того, при проведении микроципового анализа была обнаружена микроделеция 3q13.31, по данным ПЦР в реальном времени унаследованная от здоровой матери, которая, в свою очередь, унаследовала ее от своей матери. В фибробластах пациентки при использовании аCGH также выявлена микроделеция 22q13.32–q13.33. При подтверждении кольцевой хромосомы 22 с помощью FISH в культуре фибробластов на первом пассаже нами было

обнаружено, что 24% клеток имели моносомию по хромосоме 22. Далее наблюдалось увеличение числа моносомных клеток с ростом числа пассажей, которое к 33-му пассажу достигло 42%. Доля ИПСК, моносомных по хромосоме 22, варьировала в пределах 6,3–17% для разных клонов.

Важно отметить, что моносомии у описанных пациентов были зарегистрированы только в фибробластах с помощью FISH и не обнаружены в лимфоцитах при стандартном кариотипировании. Это подчеркивает важность исследования более чем одной ткани в случае, если фенотип пациента невозможно объяснить уже обнаруженными мутациями или ни одной аномалии не было обнаружено в лимфоцитах периферической крови вообще. Кроме того, что особенно важно для разработки технологий хромосомной терапии, наличие моносомного клона указывает на нестабильность кольцевой хромосомы уже *in vivo* и дает надежду на эффективную ее коррекцию в ИПСК.

Работа проведена на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, г. Томск) с использованием материалов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии» (№ 0550-2017-0019).

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-15-10231.

Литература

1. Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Schultz-Pedersen S. et al. Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: *CNTN6* as a new candidate gene for intellectual disability // *Mol. Cytogenet.* 2014. V. 7. P. 97.
2. Лопаткина М.Е., Кашеварова А.А., Лебедев И.Н. Оценка ассоциации вариаций числа копий гена *CNTN6* с идиопатическими интеллектуальными расстройствами // *Генетика.* 2016. Т. 52, № 9. С. 1109–1112.
3. Kim T., Bershteyn M., Wynshaw-Boris A. Chromosome therapy. Correction of large chromosomal aberrations by inducing ring chromosomes in induced pluripotent stem cells (iPSCs) // *Nucleus.* 2014. V. 5, № 5. P. 391–395.
4. Plona K., Kim T., Halloran K., Wynshaw-Boris A. Chromosome therapy: Potential strategies for the correction of severe chromosome aberrations // *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 2016. V. 172, № 4. P. 422–430.
5. Izykowska K., Przybylski G.K., Gand C. et al. Genetic rearrangements result in altered gene expression and novel fusion transcripts in Sézary syndrome // *Oncotarget.* 2017. V. 8, № 24. P. 39627–39639.
6. Беляева Е.О., Кашеварова А.А., Никонов А.М. и др. Значимость молекулярного кариотипирования для уточнения диагноза при цитогенетически визуализируемой хромосомной патологии // *Медицинская генетика.* 2016. Т. 15, № 7. С. 17–20.

НОВЫЕ ХРОМОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ

И.Н. Лебедев

НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

Стремительное развитие методов молекулярной цитогенетики с сопутствующим прогрессом высокоразрешающих технологий анализа генома обусловили наступление нового периода в истории цитогенетики, который вполне может быть обозначен как цитогеномный. Ярким признаком этого является действующая версия цитогенетической номенклатуры хромосом человека, которая, начиная с последнего издания 2016 г., официально называется Международной *цитогеномной* номенклатурой хромосом человека [1]. Взгляд на хромосому как на некоторую последовательность нуклеотидов (сиквенс) определенного участка генома, по мнению самих же цитогенетиков, озаглаивает не просто начало нового периода, а начало «последней и финальной эры цитогенетики» [2]. Вместе с тем наблюдаемый прогресс в изучении организации генома человека уже привел к существенному развитию представлений о многообразии, этиологии и патогенезе особого класса наследственных болезней человека – хромосомных заболеваний.

В 2004 г. появившееся высокоразрешающее молекулярное кариотипирование на основе метода матричной сравнительной геномной гибридизации (array-CGH) позволило открыть новый вид хромосомного полиморфизма – изменчивость по числу копий блоков повторов ДНК (copy number variations, CNV) [3], клиническое значение которого до сих пор остается предметом непрекращающихся дискуссий.

Вместе с тем накапливающиеся в литературе данные показывают, что структура CNV при разных клинических формах патологии, обычно проявляющихся при хромосомных болезнях, по всей видимости, оказывается уникальной, затрагивая определенные хромосомные регионы и локализованные в них гены, при нарушениях интеллектуального развития, врожденных пороках развития, аномалиях преимплантационного и пренатального периодов онтогенеза, нарушениях репродукции. Является ли это отражением особого, эволюционно закрепленного уровня организации наследственной информации, еще предстоит изучить.

Главенствующее изначально представление о том, что CNV, ассоциированные с хромосомными заболеваниями, могут быть ограничены только микроделециями, постепенно трансформируется в открытие новых микродупликационных синдромов, а также клинически значимых хромосомных амплификаций более высокого порядка – трипликаций, квадрипликаций и т.д. [4]. Описаны новые механизмы генерации таких CNV, связанные как с эволюционными особенностями организации генома человека (блоки сегментных дупликаций), так и с процессами репарации и репликации ДНК, в том числе и в ряду поколений. Появился новый класс хромосомных заболеваний – «сестринские геномные болезни» (genomic sister-disorders), объединяющий CNV-ассоциированные заболевания, связанные с

реципрокными изменениями копийности участка ДНК в одном и том же хромосомном регионе [5]. Число таких уже известных хромосомных регионов составляет более 60 и продолжает постоянно увеличиваться [6]. Активно развивается исследование генофенотипических корреляций при сестринских хромосомных болезнях, предполагающее, что в их основе могут лежать соответствующие изменения в характере экспрессии генов, затронутых CNV. Однако непосредственная оценка самого характера этих изменений представляет собой нетривиальную задачу, одно из возможных решений которой связано с технологиями клеточного репрограммирования и получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с последующей направленной дифференцировкой последних в целевые типы клеток или тканей.

Другим итогом применения высокоразрешающего генотипирования в клинической цитогенетике явилось радикальное сужение размеров детектируемых хромосомных аномалий, которые могут затрагивать отдельные гены (single gene chromosomal disorders) [7–9] либо даже его отдельные фрагменты и, более того, быть ограниченными только лишь некоторыми типами клеток или тканей (соматический мозаицизм). Вместе с тем, несмотря на кажущееся стирание физических границ между моногенными и хромосомными мутациями, последние демонстрируют особенности своего фенотипического проявления, сохраняя характерную для хромосомных заболеваний множественность поражений различных систем органов. Предполагается, что такой эффект может быть связан с повреждением при хромосомных перестройках, в том числе и сбалансированных, важных регуляторных топологических ассоциированных доменов, отражающих трехмерный уровень организации хромосомного материала [10].

Таким образом, становится очевидным, что вхождение технологий высокоразрешающего секвенирования генома в цитогенетику человека не только не ограничивает ее будущее, а наоборот, выводит

на новые горизонты развития, связанные с изучением особенностей организации и функционирования хромосом на молекулярном и клеточном уровне, а также в онтогенетическом аспекте.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 14-15-00772.

Литература

1. ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016): Reprint of: Cytogenetic and Genome Research 2016. V. 149. № 1–2.
2. *Ferguson-Smith M., Pereira J., Kasai F.* Chromosome sequencing: the fifth and final era of cytogenetics // *Mol. Cytogenet.* 2017. V. 10 (Suppl. 1): 20. P. 1.
3. *Iafate A.J., Feuk L., Rivera M.N.* Detection of large-scale variation in the human genome // *Nat. Genet.* 2004. V. 36, № 9. P. 949–951.
4. *Lebedev I.N., Nazarenko L.P., Skryabin N.A. et al.* A de novo microtriplication at 4q21.21-q21.22 in a patient with a vascular malignant hemangioma, elongated sigmoid colon, developmental delay, and absence of speech // *Am. J. Med. Genet. A.* 2016. V. 170A. № 8. P. 2089–2096.
5. *Golzio C., Katsanis N.* Genetic architecture of reciprocal CNVs // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2013. V. 23, № 3. P. 240–248.
6. *Кашеварова А.А., Лебедев И.Н.* Геномная архитектура хромосомных болезней человека // *Генетика.* 2016. Т. 52, № 5. С. 511–528.
7. *Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Schultz-Pedersen S. et al.* Single-gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: *CNTN6* as a new candidate gene for intellectual disability // *Mol. Cytogenet.* 2014. V. 7. P. 97.
8. *Kasnauskienė J., Ciuladaitė Z., Preiksaitienė E. et al.* A new single gene deletion on 2q34: *ERBB4* is associated with intellectual disability // *Am. J. Med. Genet. A.* 2013. V. 161A. P. 1487–1490.
9. *Palumbo O., Fischetto R., Palumbo P. et al.* De novo microduplication of *CHL1* in a patient with non-syndromic developmental phenotypes // *Mol. Cytogenet.* 2015. V. 8. P. 66.
10. *Redin C., Brand H., Collins R.L. et al.* The genomic landscape of balanced cytogenetic abnormalities associated with human congenital anomalies // *Nat. Genet.* 2017. V. 49, № 1. P. 36–45.

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХ НОВЫХ СЛУЧАЕВ СИНДРОМА МИКРОДЕЛЕЦИИ 15Q24 У ПАЦИЕНТОВ С НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ФОРМОЙ УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТИ

М.Е. Лопаткина¹, А.А. Кашеварова¹, Л.П. Назаренко^{1,2}, Н.Н. Чечеткина¹, Н.А. Скрыбин¹,
О.А. Салюкова^{1,2}, М.Н. Филимонова¹, А.А. Рудко¹, Ю.С. Яковлева^{1,2}, С.Л. Вовк¹, И.Н. Лебедев^{1,2}

¹ НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

³ Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск

Использование современных полногеномных технологий в практических целях ознаменовало собой новый этап в диагностике хромосомных болезней. Благодаря применению матричной сравнительной геномной гибридизации (аCGH) стали возможными обнаружение большого числа микроструктурных aberrаций и, как следствие, выделение новой группы хромосомных болезней, получивших название синдромов микроделеций и микродупликаций. Одним из

них является синдром микроделеции 15q24 (OMIM 613406), впервые описанный А.Д. Шарп в 2007 г. [1]. Основным симптомом, характерным для данной группы хромосомных синдромов, является нарушение интеллектуального и психомоторного развития индивида. Умственная отсталость (УО) была и продолжает оставаться серьезной медицинской и социальной проблемой, а исследование патогенеза данного состояния – актуальным научным вопросом [2].

К 2017 г. в научной литературе была представлена информация о 50 пациентах с синдромом микроделеции 15q24 [3, 4]. При проведении aCGH-анализа среди пациентов с задержкой интеллектуального развития в лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ было выявлено еще два новых случая микроделеции региона 15q24 [5].

Целью нашей работы стали выявление наиболее значимых клинических признаков синдрома микроделеции 15q24 и выделение кандидатных генов заболевания.

Материалы и методы

Для подтверждения хромосомной мутации в субсегменте 15q24 у двух пациентов с недифференцированной формой УО, а также для установления происхождения микроделеции провели ПЦР в режиме реального времени с использованием двух пар праймеров на гены *HCN4* и *PPCDC*, локализованные в области делеции, и пары контрольных праймеров на конститутивный ген *HEXB*. Данные пациенты с микроделецией в субсегменте 15q24 были выявлены в ходе выполнения работы по гранту 7-й Рамочной программы Евросоюза CHERISH (2009–2012 гг., № 223692), направленной на улучшение диагностики УО у детей.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ фенотипических признаков, встречающихся у 50 ранее описанных пациентов и у двух обследованных нами пациентов, выявил ряд общих клинических проявлений микроделеции в субсегменте 15q24: задержку интеллектуального и психомоторного развития, дисморфические черты лица (98%), неврологические нарушения (87%), аномалии органов зрения (87%) и слуха (67%), нарушение речевого развития (63%), аномалии пальцев верхних и нижних конечностей (62 и 42% соответственно), скелета (60%), носа (58%), нарушение развития половых органов (44%) и низкий рост (42%). Были выявлены уникальные фенотипические признаки, не встречавшиеся у ранее описанных индивидов с синдромом 15q24: короткий фильтр, аплазия и поликистоз почек у пациента № 1, а также короткие глазные щели и целиакия у пациента № 2.

В ходе исследования у пациента № 1 были обнаружены и подтверждены две делеции *de novo* в области 15q24.1–q24.2 размером 3 Мб и 384,5 кб. В данных хромосомных регионах локализованы гены, вовлеченные в процессы нейрогенеза, синаптической передачи и в патогенез аутизма [6]. Наличие двух микроделетий в одной области 15q24 у пациента можно объяснить присутствием в организме нескольких клеточных клонов с разными абберациями, т.е. мозаичным вариантом делеций. Данное предположение требует проведения дополнительных исследований.

У пациента № 2 была обнаружена и подтверждена микроделеция области 15q24.1–q25.2 размером 8,1 Мб. Исследование происхождения абберации показало, что мать не является носительницей дан-

ной мутации, а ДНК отца оказалась недоступной для исследования.

Важным этапом поиска генофенотипических корреляций при данном синдроме стали определение минимального перекрывающегося региона делеции и анализ входящих в данную область генов. На основании координат точек хромосомных мутаций нами была построена карта микроделетий области 15q23–15q24.3 и выделены два минимальных перекрывающихся региона делеции (МРД). МРД1 оказался общим для 37 пациентов, составил ~ 417 кб, находился между блоками сегментных дупликаций LCR15q24B и LCR15q24C и включал 12 генов, среди которых нами были выделены 6 в качестве кандидатных для развития интеллектуальных нарушений при синдроме микроделеции 15q24: *SEMA7A*, *ARID3B*, *CLK3*, *EDC3*, *CSK* и *LMAN1L*. Выделение альтернативного МРД2 (~ 266 кб) связано с изучением случаев микроделетий области 15q24 с атипичными координатами (между блоками сегментных дупликаций LCR15q24C и LCR15q24D), а также с описанием нового самостоятельного синдрома Виттевин–Колка (Witteveen–Kolk syndrome, WITKOS; OMIM 613406), в основе патогенеза которого лежит гетерозиготная мутация в гене *SIN3A* [4]. Другие гены данного МРД2, *NEIL1* и *MAN2C1*, также представляют интерес в качестве кандидатных генов развития нейрокогнитивных нарушений при синдроме микроделеции 15q24.

Заключение

Полученные при исследовании новых случаев синдрома микроделеции 15q24 клинические и генетические данные позволили дополнить и обобщить имеющуюся информацию о фенотипических проявлениях данного заболевания и возможном механизме возникновения абберации, сузить МРД1 и выделить новый, альтернативный МРД2, а также охарактеризовать девять кандидатных генов развития УО при данном хромосомном синдроме (*SEMA7A*, *ARID3B*, *CLK3*, *EDC3*, *CSK*, *LMAN1L*, *SIN3A*, *NEIL1* и *MAN2C1*), каждый из которых может вносить свой вклад в развитие нейрокогнитивных нарушений. Дальнейшее изучение механизмов работы и регуляции кандидатных генов может, вероятно, пролить свет на их роль в патогенезе УО при данном хромосомном синдроме.

Работа выполнена на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, г. Томск) с использованием материалов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии» (№ 0550-2017-0019).

Литература

1. Sharp A.J., Selzer R.R., Veltman J.A. et al. Characterization of a recurrent 15q24 microdeletion syndrome // Hum. Mol. Genet. 2007. V. 16, № 5. P. 567–572.
2. Soltani S., Faramarzi A., Khosravi B. What we should know about health problems in people with intellectual disability: Implications for health policy // J. Res. Med. Sci. 2017. V. 22. P. 66.
3. Samuelsson L., Zagoras T., Hafström M. Inherited 15q24 microdeletion syndrome in twins and their father with phenotypic variability // Eur. J. Med. Genet. 2015. V. 58. № 2. P. 111–115.

4. Witteveen J.S., Willemsen M.H., Dombroski T.C. et al. Haploinsufficiency of MeCP2-interacting transcriptional co-repressor SIN3A causes mild intellectual disability by affecting the development of cortical integrity // *Nat. Genet.* 2016. V. 48, № 8. P. 877–887.
5. 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.
6. Zhao H., Kim Y., Park J. et al. SCAMP5 plays a critical role in synaptic vesicle endocytosis during high neuronal activity // *J. Neurosci.* 2014. V. 34, № 30. P. 10085–10095.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ ДНК ПРИ НЕПОЛНОЙ ПЕНЕТРАНТНОСТИ CNV-ОБУСЛОВЛЕННОЙ УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТИ

Н.А. Скрябин¹, С.А. Васильев¹, Е.Н. Толмачёва¹, А.Р. Шорина², И.Н. Лебедев¹

¹ НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, Томск

² Новосибирский областной детский клинический психоневрологический диспансер, г. Новосибирск

Геном человека характеризуется высокой вариабельностью по изменчивости числа копий ДНК (copy number variations, CNV), размеры которых варьируют от нескольких тысяч до миллиона пар оснований. Значительная их часть (около 7 мм CNV) на данный момент интерпретируется как полиморфные варианты [1], тогда как только для 27 тыс CNV (0,4%) была доказана патогенетическая значимость [2]. Кроме того, большинство патогенетически значимых CNV характеризуется неполной пенетрантностью. Так, пенетрантность патогенетически значимых частей CNV при умственной отсталости в среднем составляет около 30% [3, 4]. Механизмы реализации неполной пенетрантности заболеваний, обусловленных CNV, на настоящий момент практически не изучены. Одними из таких механизмов могут быть эпигенетические модификации ДНК, в частности метилирование ДНК.

Нами был проведен анализ статуса метилирования CpG-островков в промоторных участках генов *IMMP2L*, *METTL4*, *ACAD10*, *GEMIN4*, *SMCHD1*, *KDM5A* и *GRPEL2* в восьми семьях с умственной отсталостью. Выбранные гены были локализованы в участках с вероятно патогенными унаследованными CNV. Детекция микроструктурных перестроек была проведена с использованием микрочипов SurePrint G3 Human CGH Microarray 8×60K (Agilent Technologies, США). С использованием количественной ПЦР в режиме реального времени были подтверждены все идентифицированные CNV и установлено родительское происхождение.

Для анализа статуса метилирования было использовано бисульфитное секвенирование ампликонов (Bisulfite Amplicon Sequencing, BSAS) [5]. Метод основан на ПЦР амплификации бисульфит-конвертированной ДНК с последующим секвенированием с помощью NGS. После бисульфитной конвертации ДНК была проведена амплификация участков 300–800 п.н. в составе CpG-островков в промоторных регионах выбранных генов с помощью ПЦР. Присоединение адаптеров и индексов осуществлялось с помощью набора Nextera XT (Illumina, США). Секвенирование проводилось на секвенаторе MiSeq с помощью набора MiSeq Reagent Nano Kit v2 (Illumina, США). Для цитозина в составе CpG-пар оценивался индекс метилирования (отношение числа ридов с С/Т).

Наиболее интересные результаты были получены при анализе двух семей с унаследованной делецией 7q31.1, затрагивающей единственный

ген *IMMP2L*. Этот ген кодирует митохондриальный белок, принимающий участие в каталитической активности пептидазы внутренней мембраны митохондрий. Показано, что CNV в данном гене приводят к аномалиям развития нервной системы [6]. В обеих семьях делеции были унаследованы от клинически здоровых матерей.

При анализе статуса метилирования ДНК в промоторной области гена было идентифицировано, что все CpG-сайты деметилированы во всех исследованных образцах. В то время как в CpG-сайтах, локализованных в гене, было идентифицировано гипометилирование у матерей по отношению к детям и отцам. Дифференциальное метилирование у здоровых матерей, носителей патогенетически значимой CNV, по сравнению с больными детьми с аналогичной мутацией может объяснять феномен неполной пенетрантности в обследованных семьях.

Однако остается еще ряд вопросов, на которые предстоит найти ответы. В частности, о том, насколько часто эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов могут модифицировать фенотипическое проявления микроструктурных хромосомных аномалий? Каковы механизмы регуляции экспрессии генов при дифференциальном метилировании CpG-сайтов в последовательности самих генов? Ответы на эти и другие вопросы могут помочь в идентификации механизмов неполной пенетрантности CNV. Прояснение механизмов реализации неполной пенетрантности позволит более точно прогнозировать наследуемость хромосомных заболеваний, что является критически важным моментом при медико-генетическом консультировании.

Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, г. Томск) с использованием материалов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии» (№ 0550-2017-0019).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 16-15-10229 (№ 0550-2017-0019).

Литература

1. <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home> – База данных геномных вариантов (DGV).
2. <https://decipher.sanger.ac.uk/> – База данных геномных вариантов и фенотипов (DECIPHER).

3. Rosenfeld J.A., Coe B.P., Eichler E.E. et al. Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy-number variations // *Genet. Med.* 2013. V. 15. P. 478–481.
4. Kirov G., Rees E., Walters J.T.R. et al. The Penetrance of Copy Number Variations for Schizophrenia and Developmental Delay // *Biol. Psychiatry*. Elsevier. 2014. V. 75, № 5. P. 378–385.
5. Masser D.R., Stanford D.R., Freeman W.M. Targeted DNA Methylation Analysis by Next-generation Sequencing // *J. Vis. Exp.* 2015. V. 96. e52488.
6. Gimelli S., Capra V., Di Rocco M. et al. Interstitial 7q31.1 copy number variations disrupting *IMMP2L* gene are associated with a wide spectrum of neurodevelopmental disorders // *Mol. Cytogenet.* 2014. V. 7. P. 54.

ARRAY-CGH В ДИАГНОСТИКЕ ГЕНОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА И ЭКСТРАКАРДИАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

А.А. Слепухина^{1,2}, Н.А. Скрябин¹, А.А. Кашеварова¹,
М.А. Новикова³, Г.И. Лифшиц², И.Н. Лебедев¹

¹ НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск

³ Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск

Активное использование aCGH в диагностике у детей с врожденными пороками сердца (ВПС) пока является сравнительно новым направлением и активно внедряется с 2014–2015 гг. Для ВПС доля патогенных вариантов числа копий ДНК может колебаться от 3 до 26% [1, 2]. Абсолютное большинство микроделеционных синдромов, в том числе затрагивающих области 22q11, 8p23.1, 7q11.23, 16p13, 17p11, 17p13, приводя к множественным повреждениям органов и систем, сопровождаются врожденными пороками сердца. ВПС при микроделециях или микродупликациях хромосом являются столь же высокопенетрантным признаком, как и для хромосомных аномалий. Например, при трисомии хромосомы 21 ВПС характерны для 60–80% больных, а при синдроме микроделеции 22q11 – для 60–85% пациентов.

Материал и методы

Проведен анализ ДНК 15 детей, перенесших оперативное лечение по поводу ВПС в 2016 г. Средний возраст больных ($M \pm s$) соответствовал (20,7 ± 13) мес (от 1 мес до 4 лет). Диагноз ВПС устанавливался на основании эхокардиографических данных согласно рекомендациям РКО, а также клинических, электрокардиографических, биохимических и патологических характеристик этого заболевания с оценкой физиологических изменений кровотока и гемодинамики порока [3]. Согласно протоколу исследования, критерием включения являлось сочетание ВПС с множественными аномалиями развития, включая микроаномалии развития, лицевые дизморфии, анатомические особенности строения тела и внутренних органов, установленные заболевания и (или) глобальное отставание в развитии, задержку психического, психоречевого, речевого, психомоторного, интеллектуального и физического развития.

Мечение обеих анализируемой и контрольной ДНК проводилось с использованием набора SureTag Complete DNA Labeling Kit в соответствии с протоколом производителя (Agilent Technologies, США). Гибридизацию проводили на ДНК-микрочипах SurePrint G3 Human Genome CGH Microarray Kit,

8×60K в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (Agilent Technologies, США). Данные получали с помощью программы Scan (v. 9.1.1.1), визуализировали в программе Cytogenomics (v. 3.0) (Agilent Technologies, США) и анализировали с использованием публично доступных баз данных DGV и DECIPHER. Описания функций генов, локализованных в областях CNV, были получены из баз данных NCBI Gene, GeneCards и OMIM. Верификацию выявленных патогенных и условно патогенных вариантов проводили с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по ранее опубликованному подробному описанию технологии [4].

Результаты и обсуждение

Среди 15 пациентов с врожденными пороками сердца, сочетанными с множественными аномалиями развития, с помощью a-CGH у 7 пациентов (46%) были выявлены патогенные и условно патогенные CNV. У пациентов № 1–4 – синдром микроделеции 22q11.2: у пациентов № 1 и 3 выявлены идентичные микроделеции $arr[hg18]22q11.21(17299942_19770514) \times 1$ размером 2,47 Мб, у пациента № 2 – $arr[hg18]22q11.21(17299942_18691763) \times 1$ размером 1,39 Мб, у пациента № 4 – делеция $arr[hg18]22q11.21(17299942_19709958) \times 1$ размером 2,41 Мб. Во всех случаях они затрагивали ген *TBX1*, который лежит в основе патогенеза пороков сердца при данном синдроме.

Пациент № 5 с микроделецией $arr[hg18]7q11.23(72364514_73777326) \times 1$, размером 1,41 Мб имел классический фенотип синдрома Вильямса. Делеция включала ген *ELN*, мутации в котором лежат в основе развития надклапанного стеноза аорты. У пациента № 6 выявлена микроделеция $arr[hg18]1p36.33-p36.32(749625_3987303) \times 1$ размером 3,24 Мб, включающая критичный регион для развития аномалий сердца, содержащая два гена, участвующих в патогенезе пороков развития данного органа – *SKI* и *PRDM16* [5, 6]. Данная аберрация обуславливает синдром 1p36 микроделеции.

Выявленная у пациента № 7 микродупликация $arr[hg18]20p13(2412867_3824216) \times 3$ размером

1,41 Мб была расценена как потенциально патогенная, так как отсутствует в таком виде в DGV, содержит несколько генов, вероятно, связанных с клиническими проявлениями – *EBF4*, *ADAM33*, *CENPB*, *GNRG2*, *OXT*.

Выявление наследственных заболеваний у детей раннего младшего возраста с множественными аномалиями развития существенно влияет на хирургическую тактику и исходы лечения, что лежит в основе требований к совершенствованию диагностики микроделеционных и микродупликационных синдромов и применению полногеномного анализа с использованием ДНК-микрочипов.

Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, г. Томск).

Литература

1. Thienpont B., Mertens L., de Ravel T. et al. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients // *Eur. Heart J.* 2007. V. 28, № 22. P. 2778–2784.
2. Lalani S.R., Belmont J.W. Genetic basis of congenital cardiovascular malformations // *Eur. J. Med. Genet.* 2014. V. 57, № 8. P. 402–413.
3. Lang R.M., Bierig M., Devereux R.B. et al. Рекомендации по количественной оценке структуры и функции камер сердца // *Российский кардиологический журнал.* 2012. Т. 3, № 95. С. 3–28.
4. Слепухина А.А., Кашеварова А.А., Скрябин Н.А. и др. Алгоритм молекулярно-цитогенетической диагностики микроделеционных синдромов врожденных пороков развития // Методические рекомендации по медицинским технологиям диагностики и лечения хромосомных, орфанных и многофакторных заболеваний человека / под ред. В.А. Степанова. Новосибирск: Академиздат, 2016. С. 175–194.
5. Zaveri H.P., Beck T.F., Hernández-García A. et al. Identification of critical regions and candidate genes for cardiovascular malformations and cardiomyopathy associated with deletions of chromosome 1p36 // *PLoS One.* 2014. V. 9, № 1. e85600.
6. Jordan V.K., Zaveri H.P., Scott D.A. 1p36 deletion syndrome: an update // *Appl. Clin. Genet.* 2015. V. 8. P. 189–200.

ПОЛНОГЕНОМНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК ЦИТОТРОФОБЛАСТА В РАМКАХ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА ПО ОБНАРУЖЕНИЮ ЧИСЛЕННЫХ ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ ПЛОДА

А.А. Твеленёва, Е.В. Мусатова, Ж.Г. Маркова, Н.В. Шилова

Медико-генетический научный центр, г. Москва

Недавними исследованиями было установлено, что основным типом клеток плодной природы, циркулирующих в крови беременной женщины, являются эндovasкулярные трофобласты [1]. Клетки трофобласта можно выделить и изолировать из периферической крови беременной женщины, используя метод фильтрации через поликарбонатный фильтр с последующей лазерной микродиссекцией [2]. Однако основной трудностью в применении последующих молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических методов является тот факт, что в 1 мл крови беременной женщины содержится 2–6 клеток плодной природы [3], что требует применения методов полногеномной амплификации (ПГА). Помимо этого, в процессе пробоподготовки выделенные методом фильтрации трофобласты подвергаются фиксации, что, в свою очередь, влияет на качество анализируемой ДНК.

Таким образом, была определена основная задача исследования: в рамках модельного эксперимента оценить возможность применения методов ПГА для амплификации генетического материала единичных клеток цитотрофобласта, выделенных методом фильтрации и фиксированных в процессе пробоподготовки, в целях обнаружения анеуплоидии методом метафазной сравнительной геномной гибридизации.

Материалы и методы

В качестве модели, отображающей присутствие клеток плода в крови беременной женщины, было приготовлено 10 искусственных (артифициальных) смесей, представляющих собой смесь клеток вор-

син хориона замерших беременностей и периферической венозной крови взрослых индивидуумов. Все образцы поступали в лабораторию цитогенетики ФГБНУ «МГНЦ» РАМН для стандартного кариотипирования. Клетки цитотрофобласта выделяли, используя метод фильтрации, через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 8 мкм. Перед иммуноцитохимическим окрашиванием каждый образец фиксировался в смеси метанол : ацетон (3 : 1). Детекция цитотрофобластов осуществлялась иммуноцитохимическим окрашиванием моноклональными антителами к цитокератину-7. Клетки интереса были изолированы методом лазерной микродиссекции. ПГА генетического материала единичных клеток цитотрофобласта осуществлялась тремя методами: multiple displacement amplification (MDA), linker adapter PCR (LA-PCR), degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR). Определение длины продуктов ПГА осуществлялось методом электрофореза в 1%-м агарозном геле. Концентрация продуктов ПГА определялась флуориметрическим методом. Для обнаружения численных хромосомных аномалий была использована метафазная сравнительная геномная гибридизация.

Результаты

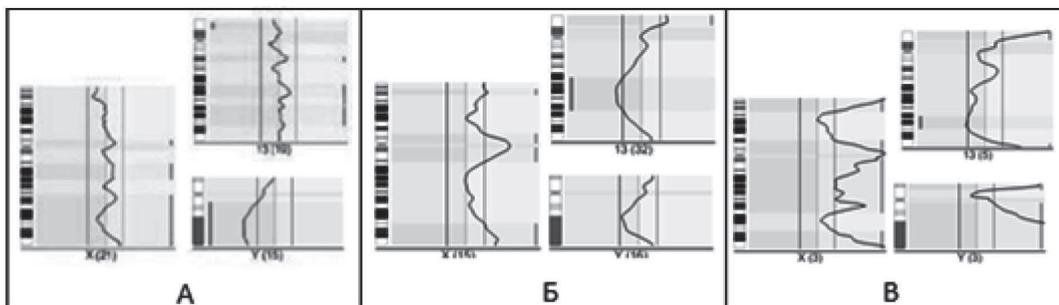
По результатам модельного эксперимента было определено, что не все методы ПГА применимы для анализа единичных клеток цитотрофобласта, выделенных методом фильтрации и фиксированных в процессе пробоподготовки. На основании данных количественного и качественного анализа продуктов ПГА метод амплификации с использованием

вытеснения комплементарно синтезируемой цепи (MDA) продемонстрировал наибольшее значение концентрации и длин продуктов полногеномной амплификации (таблица). Данные различия обусловлены тем, что в отличие от LA-PCR и DOP-PCR, в состав реакционной смеси которых входит Taq-полимераза, элонгацию цепи в методе MDA обеспечивает полимеразы Phi29, обладающая большей процессивностью и корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активностью. Однако по результатам ме-

тафазной сравнительной геномной гибридизации было установлено, что, способ амплификации на основе использования линкер-адаптеров (LA-PCR) показал наибольшую чувствительность (80%), специфичность (80%) и равномерность амплификации по сравнению с другими методами. Профили гибридизации после амплификации генетического материала единичных клеток цитотрофобласта методом DOP-PCR и MDA не подлежали анализу (рисунок).

Сравнение трех методов полногеномной амплификации. Значение критерия Фридмана для концентрации амплифицированного продукта ($N = 10$, $df = 2$) = 20,00000, $p < 0,00005$

Метод ПГА	LA-PCR	DOP-PCR	MDA
Концентрация продуктов ПГА, нг/мкл	27,5 ± 4,6	47,3 ± 5,2	97,3 ± 6,6
Длина продуктов ПГА, п.о.	200–1 000	100–500	> 1 000



Результаты CGH-анализа единичных цитотрофобластов с кариотипом 47,XX, +13, генетический материал которых амплифицирован LA-PCR (А), DOP-PCR (Б), MDA (В)

Данные различия в полученных результатах CGH-анализа объясняются тем, что материалом исследования являлись фиксированные единичные клетки цитотрофобласта. Фиксация клеток ведет к фрагментации матричной ДНК, которая оказывает влияние на результаты амплификации и последующего CGH-анализа и требует применения соответствующего метода ПГА [4].

Таким образом, в рамках модельного эксперимента было определено, что ПГА с использованием линкер-адаптеров (LA-PCR) является оптимальным методом амплификации генетического материала единичных клеток цитотрофобласта, выделенных методом фильтрации и фиксированных в процессе пробоподготовки, для последующего обнаружения численных хромосомных аномалий плода методом метафазной сравнительной геномной гибридизации.

Литература

1. Brinch M., Hatt L., Singh R. et al. Identification of circulating fetal cell markers by microarray analysis // *Prenat Diagn.* 2012. V. 32 (8). P. 742–751.
2. Мусатова Е.В., Мартынов А.В., Маркова Ж.Г. и др. Метод фильтрации для выделения трофобластов из образцов периферической крови с целью детекции анеуплоидий в единичных клетках плодного происхождения // *Медицинская генетика.* 2016. Т. 15 (1). С. 38–42.
3. Krabchi K., Gros-Louis F., Yan J. et al. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques // *Clin. Genet.* 2001. V. 60. P. 145–150.
4. Pirker C., Raidl M., Steiner E. et al. Whole Genome Amplification for CGH Analysis: Linker-Adapter PCR as the Method of Choice for Difficult and Limited Samples // *Cytometry A.* 2004. V. 61 (1). P. 26–34.

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МАРКЕРНЫХ ХРОМОСОМ У ПАЦИЕНТОВ С ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

А.С. Телепова¹, С.А. Романенко¹, Н.А. Лемская¹, Ю.В. Максимова²,
А.Р. Шорина³, М.А. Фергюсон-Смит⁴, Д.В. Юдкин¹

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Новосибирск, Россия

³ Новосибирский областной клинический диагностический центр, медико-генетический отдел, г. Новосибирск, Россия

⁴ Отдел ветеринарной медицины Кембриджского университета, г. Кембридж, Великобритания

Маркерные хромосомы – это структурно ненормальные хромосомы; они могут быть сверхчисленными по отношению к кариотипу человека или заме-

нять одну из нормальных хромосом. Большинство маркерных хромосом обнаруживаются при GTG-окрашивании метафазных пластинок. Маркерные

хромосомы разделяют на две группы: дополнительные хромосомы и малые сверхчисленные маркерные хромосомы. Главным условием для отнесения хромосомы ко второй группе является ее размер. Маркерная хромосома может заменять нормальную аутосому либо одну из половых хромосом [1]. Малые сверхчисленные маркерные хромосомы должны быть меньше размером, чем хромосома 20 на этой же метафазной пластинке. К этой группе относят и кольцевые хромосомы. Определение происхождения малых сверхчисленных маркерных хромосом с помощью GTG-бэндинга является проблематичным в связи с их размерами. Поэтому для их идентификации необходимы молекулярно-цитогенетические методы анализа. Примерно 2,7 млн человек в мире имеют малые сверхчисленные маркерные хромосомы [2]. Частота обнаружения у новорожденных составляет 0,044%, в абортном материале – 0,075%, у умственно отсталых – 0,288% [3]. Фенотипические проявления наличия маркерных хромосом зависят от их размера, генетического содержания и степени мозаицизма. В 86% случаев малые сверхчисленные маркерные хромосомы происходят из акроцентрических хромосом, из них 75% происходят из хромосомы 15. Случаи возникновения сверхчисленных маркерных хромосом из хромосом 13, 14, 21 и 22 составляют всего лишь 7% [1]. Существует множество заболеваний, ассоциированных с наличием маркерных хромосом – синдром Эмануэля, синдром Шмида–Фраккаро, синдром Паллистера–Киллиана, изохромосома i(5p), синдром пятнадцатой маркерной хромосомы, синдром Тернера с маркерной хромосомой и т.д. Около 70% маркерных хромосом возникают *de novo*, а в 30% случаев могут быть унаследованы от родителей [1]. Некоторые синдромы, ассоциированные с маркерными хромосомами, проявляются интеллектуальной недостаточностью разной степени тяжести: от легкой до крайне тяжелой. Это такие синдромы, как синдром Тернера с маркерной хромосомой, синдром пятнадцатой маркерной хромосомы, синдром Эмануэля, синдром Шмида–Фраккаро (в некоторых случаях), *der(22)t(8;22)(q24.1;q11.1)* синдром, изохромосома i(5p), изохромосома 9p, изохромосома 18p, синдром Паллистера–Киллиана [1].

Целью представленной работы является исследование происхождения и молекулярного

состава маркерных хромосом в кариотипах выборки пациентов с интеллектуальной недостаточностью.

В ходе работы детально исследованы кариотипы трех пациентов с интеллектуальной недостаточностью и выявленными маркерными хромосомами, а также кариотипы их ближайших родственников. В одном из случаев наличие маркерной хромосомы сочеталось с синдромом Тернера. У остальных пациентов маркерные хромосомы оказались сверхчисленными по отношению к нормальному кариотипу. Показано, что в одном случае маркерная хромосома образовалась *de novo*. Морфологически обнаруженные маркерные хромосомы являются акроцентрическими.

С помощью набора пэинтинг-проб сортированных хромосом человека проведен анализ происхождения обнаруженных маркерных хромосом. В случае пациентки с синдромом Тернера маркерная хромосома происходит из X-хромосомы. Кариотип мозаичный: 46,X,+mar(X)/45,X. Маркерная хромосома встречается в 33% метафазных пластинок. Второй пациент обладает кариотипом 47,XY,+invdup(15). У последней пациентки также мозаичный кариотип: 46,XX/47,XX+mar/48,XX+2mar. Получены микродиссекционные библиотеки всех исследованных маркерных хромосом, с помощью которых подтверждены их происхождение и, соответственно, предполагаемый молекулярный состав. Подготовлены образцы для дальнейшего полногеномного секвенирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 15-15-10001.

Литература

1. Jafari-Ghahfarokhi H., Moradi-Chaleshtori M., Liehr T. et al. Small supernumerary marker chromosomes and their correlation with specific syndromes // *Advanced biomedical research*. 2015. V. 4. P. 140–147.
2. Liehr T., Trifonov V., Polityko A. et al. Characterization of small supernumerary marker chromosomes by a simple molecular and molecular cytogenetics approach // *Balkan Journal of Medical Genetics*. 2007. V. 10, № 1. P. 33–37.
3. Liehr T., Mrasek K., Weise A. et al. Small supernumerary marker chromosomes – progress towards a genotype-phenotype correlation // *Cytogenetic and genome research*. 2006. V. 112. P. 23–34.

ВЛИЯНИЕ ИНАКТИВАЦИИ X-ХРОМОСОМЫ НА ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ТРАНСЛОКАЦИЙ X;АУТОСОМА

Е.Н. Толмачёва^{1, 2}, Н.А. Скрябин¹, Г.Н. Сеитова¹, Н.Н. Суханова¹,
А.Д. Черемных¹, Л.П. Назаренко^{1, 2}, И.Н. Лебедев^{1, 2}

¹ НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

² Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск

Фенотипические проявления транслокаций X;аутосома, в отличие от транслокаций аутосома;аутосома, часто зависят от нескольких факторов: расположения точек разрыва на обеих хромосомах и особенностей инактивации X-хромосомы. Благодаря развитию молекулярно-цитогенетических и генетиче-

ских методов в настоящее время мы можем более детально исследовать каждый конкретный случай таких транслокаций, что позволяет глубже понять причины проявления патологического фенотипа.

В настоящей работе мы оценили влияние процесса инактивации X-хромосомы на клиниче-

ское проявление различных транслокаций X;ауто-сома.

У трех пациенток женского пола в возрасте от 9 мес до 16 лет с различными транслокациями X;ауто-сома были проведены молекулярно-генетический анализ с использованием матричной сравнительной геномной гибридизации (8×60K, Agilent Technologies, США) и хромосомный микроматричный анализ (микроматрица Affimetrix на 2,67 млн проб), а также с помощью метилчувствительной ПЦР оценен характер инактивации X-хромосомы.

Пациентка А в возрасте 16 лет с предварительным диагнозом «синдром Шерешевского–Тернера». После стандартного цитогенетического и CISS-анализа с цельнохромосомной пробой WCP3 выявлена несбалансированная транслокация 46,X,der(X)t(X;3). С помощью arrayCGH была проведена верификация транслокации и уточнены точки разрыва – 46,X,t(X;3)(p11.3;q21.3). В лимфоцитах периферической крови пациентки наблюдалась асимметричная инактивация X-хромосомы (степень смещения – 100%). У пациентки наряду с признаками синдрома Шерешевского–Тернера (гипоплазия матки и яичников, короткая шея с крыловидными складками, низкая граница роста волос на лбу и шее и т.д.) проявлялись клинические признаки, характерные для дупликаций 3q21q-qter: гирсутизм, синофриз, пороки опорно-двигательного аппарата [1, 2]. Мы предположили, что у пациентки инактивируется перестроенная X-хромосома, но из-за возможной неполной инактивации генов на аутосомной части [3] частично проявляются черты, связанные с избыточным генным балансом.

У пациентки Б в возрасте 9 мес была выявлена реципрокная транслокация 46X,t(X;9)(q22;q13) *de novo*. Последующий анализ с помощью метода aCGH показал, что транслокация у пациентки является сбалансированной, а в регионе 22q11.22 имеется небольшая делеция 65 т.п.н., затрагивающая два гена – *PRODH*, *DGCR5*. Микроделеция в этом регионе является критической для синдрома Ди Джорджи (OMIM 611867).

У пациентки наблюдаются задержка умственного развития, врожденные аномалии головного мозга (пахигирия, лентовидная гетеротропия, гипогенезия мозолистого тела), задержка психомоторного развития, миотонический синдром, эпилепсия симпомотическая фокальная, а также врожденная аномалия развития мочеполовой системы, пизлоктозия двухсторонняя. В результате исследования было выявлено 100%-е смещение характера инактивации X-хромосомы. В этом случае теоретически инактивации может подвергаться как нормальная X-хромосома, так и дериват, так как у пациентки имеются клинические черты, сходные с клинической картиной пациентов с делецией del(9)(q22-q32) и с другими пациентами с различными

транслокациями X;9, у которых либо был инактивирован дериват, либо наблюдалась равновероятная инактивация X-хромосомы. Однако мы не можем исключить влияния на фенотип микроделеции в регионе 22q11.2. Поэтому для прояснения вопроса о том, какая именно из X-хромосом инактивирована в этом случае, необходимы дальнейшие исследования.

Пациентка В с задержкой психомоторного развития, мышечной гипотонией. По результатам электроэнцефалографии выявляются признаки незрелости коркового ритма, активации и умеренной дисфункции срединно-стволовых структур мозга. В возрасте 1 мес с помощью стандартного цитогенетического анализа у девочки была обнаружена реципрокная транслокация 46,X,t(X;10)(p22.2;q11.2) *de novo*. После анализа ДНК пациентки на микрочипах Affimetrix Cytoscan HD (анализ был проведен в лаборатории молекулярной патологии «Геномед», г. Москва) не выявлено патогенного хромосомного дисбаланса. Анализ характера инактивации X-хромосомы выявил равновероятный характер инактивации X-хромосомы (60%). В этом случае инактивация X-хромосомы, скорее всего, никоим образом не повлияла на клинические проявления хромосомной перестройки, так как точка разрыва приходится на регион Xp22.2, который избегает инактивации.

Таким образом, на примере трех транслокаций X;ауто-сома было показано, что процесс инактивации X-хромосомы может быть как протективным, так нейтральным для фенотипических проявлений хромосомной перестройки, возможно даже, что он усугубляет тяжесть проявления клинических симптомов. Для более точного прогноза фенотипического проявления таких транслокаций необходимо использование комплекса цитогенетических, молекулярно-цитогенетических и генетических методов диагностики.

Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, г. Томск) с использованием материалов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии» (№ 0550-2017-0019).

Литература

1. Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. 2001. 966 p.
2. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Хромосомные синдромы и аномалии: Классификация и номенклатура / Моск. НИИ педиатрии и дет. хирургии МЗ РФ [и др.]. Ростов н/Д : Изд. РГМУ, 1999. 191 с.
2. Giorda R., Bonaglia M.C., Milani G. et al. Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in a girl with microcephaly, mild dysmorphic features and t(X;5)(q22.1;q31.1) // Eur. J. Hum. Genet. 2008. V. 16, № 8. P. 897–905.

ТРАНСКРИПЦИЯ И ТРЕХМЕРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ САТЕЛЛИТНОЙ ДНК В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И ЭКСТРАЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА

И.Л. Трофимова^{1, 2}, Н.И. Енукашвили³, А.В. Горбунова³,
Е.С. Вашукова⁴, Т.В. Кузнецова⁴, В.С. Баранов⁴

¹ Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова
Минздрава России, г. Санкт-Петербург

² Международный центр репродуктивной медицины, г. Санкт-Петербурге

³ Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

⁴ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, г. Санкт-Петербург

Тандемно организованные повторяющиеся последовательности ДНК (сателлитная ДНК – сатДНК) формируют протяженные области повторов внутри гетерохроматиновых районов (ГХР) хромосом, составляя значительную часть так называемого некодирующего компонента генома эукариот [1]. Транскрипционная инертность считалась фундаментальным признаком сатДНК, а немногочисленные работы, показывающие ее транскрипцию и выполненные в основном на мейотически делящихся клетках – ооцитах птиц и амфибий, незаслуженно оставались незамеченными [2]. Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные свидетельствуют о том, что некодирующая РНК, транскрибируемая с последовательностей сатДНК, нить- и тканеспецифична, а ее транскрипция зависит от типа клеток, стадии клеточного цикла или развития, клеточной дифференцировки и может быть индуцирована стрессовыми воздействиями [3].

В геноме человека примерно 30% приходится на долю сатДНК ГХР хромосом [4]. Особенно значительные и вариабельные по размерам блоки сатДНК локализованы в районах прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9 и 16, а также в дистальном отделе длинного плеча Y-хромосомы. Этим районам издавна отводится особая роль в нарушениях репродукции у человека [5, 6], однако биологический смысл и механизмы участия этих районов в нормальном и патологическом эмбриогенезе человека остаются предметом дискуссий. Особый интерес в этой связи представляет изучение транскрипции сатДНК человека, РНК транскрипты которых могут участвовать в процессах имплантации и раннего эмбрионального развития, а также в регуляции работы эмбрионального генома.

В данной работе были проанализированы транскрипционная активность и трехмерная организация в интерфазном ядре прицентромерного сателлита 3-го района 1q12 (HS3-1) в эмбриональных и экстраэмбриональных клетках человека. Материалом исследования послужили образцы хориона и эмбриональных органов и тканей, полученные после прерывания беременности по медицинским показаниям или по желанию женщины, а также образцы плаценты после родоразрешения.

Анализ транскрипции HS3-1 проводили с помощью RT-PCR в образцах хориона и эмбриональных органов от абортусов сроком 7–13 нед беременности. Транскрипты HS3-1 были обнаружены в хорионе только в срок 7 нед беременности, на более поздних стадиях, а также в образцах плацент транскрипты обнаружены не были. У 7- и 9-недельных эмбрионов транскрипты выявлены в почке, легком, продолгова-

том мозге, надпочечнике, сердце и кишечнике. В образцах тканей после 11 нед беременности транскрипты в проанализированных эмбриональных органах (продолговатый мозг, надпочечник, печень) выявлены не были. Транскрипты были длиной около 250 и 600 п.н., при этом в сердце были обнаружены транскрипты длиной 100 п.н. Все выявленные транскрипты были полиаденилированы. Во всех тканях, кроме почек и сердца, транскрипция происходила со «смысловой» нити. В почках и сердце транскрипты считывались с антисмысловой цепи ДНК. Подобные исследования на мышцах показали, что разнонаправленная транскрипция сатДНК необходима для развития эмбрионов и формирования правильной структуры ядра [7]. Возможно, наблюдаемая нами транскрипция с одной цепи является элементом подобного процесса, одной из его завершающих стадий.

Ядерная периферия и ГХР традиционно считаются репрессивными доменами, а внутренняя область ядра – районом активной транскрипции [8]. Поэтому пространственную организацию районов 1q12 оценивали с помощью 3D ДНК FISH на ядрах клеток хориона, а также ряда эмбриональных органов. Локализацию HS3-1 оценивали по отношению к границе ядра и относительно хромоцентра на оптических срезах. Анализ результатов 3D FISH проводили с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META и программного обеспечения LSM 510 (Carl Zeiss, Германия). В срок 8–10 нед беременности в ядрах эмбриональных клеток сателлит HS3-1, как правило, занимает периферическое положение и расположен в DAPI-позитивных областях ядра (хромоцентрах). Однако около трети FISH-сигналов, соответствующих району 1q12, в ядрах клеток почки располагались не в хромоцентрах. В ядрах клеток хориона абортусов 4–5 нед беременности FISH-сигналы были локализованы преимущественно во внутренней части ядра и на границе, но не внутри хромоцентров. Аналогичные характеристики этого сателлита были отмечены при малигнизации клеток, их старении и дифференцировке [9], а также в ядрах лимфоцитов больных синдромом ICF [10], ГХР хромосом 1, 9, 16 которых имеют схожие характеристики (деконденсация, гипометилирование) с таковыми в клетках хориона. В ядрах клеток хориона абортусов 5–6 и 10–11 нед беременности FISH-сигналы занимали преимущественно периферическое положение и входили в состав хромоцентров. В плаценте HS3-1 также был выявлен в составе хромоцентров на периферии ядра, что согласуется с данными литературы [9, 11].

Таким образом, нами впервые показаны транскрипция и трехмерная ядерная организация HS3-1

в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях человека.

Литература

1. Lopez-Flores I., Garrido-Ramos M.A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes // *Genome dynamics* / M.A. Garrido-Ramos (ed.). Basel: Karger, 2012. P. 1–28.
2. Trofimova I., Krasikova A. Transcription of highly repetitive tandemly organized DNA in amphibians and birds: a historical overview and modern concepts // *RNA Biology*. 2016. V. 13 (12). P. 1246–1257.
3. Biscotti M.A., Canapa A., Forconi M. et al. Transcription of tandemly repetitive DNA: functional roles // *Chromosome Res.* 2015. V. 23. P. 463–477.
4. Dimitri P., Caizzi R., Giordano E. Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences // *Chromosoma*. 2009. V. 118, № 4. P. 419–435.
5. Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматиновые районы хромосом. М.: Наука, 1986. 432 с.
6. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. СПб.: Изд-во Н-Л, 2007. 439 с.
7. Probst A.V., Almouzni G. Heterochromatin establishment in the context of genome-wide epigenetic reprogramming // *Trends in Genetics*. 2011. V. 27, № 5. P. 177–185.
8. Cremer T., Cremer M., Dietzel S. et al. Chromosome territories – a functional nuclear landscape // *Cell Biology*. 2006. № 18. P. 307–316.
9. Enukashvily N.I., Donev R., Waisertreiger I.S., Podgor-naya O.I. Human chromosome 1 satellite 3 DNA is decondensed, demethylated and transcribed in senescent cells and in A431 epithelial carcinoma cells // *Cytogenet. and Genome Res.* 2007. V. 118, № 1. P. 42–54.
10. Dupont C., Guimiot F., Perrin L. et al. 3D position of pericentromeric heterochromatin within the nucleus of a patient with ICF syndrome // *Clin. Genet.* 2012. V. 82 (2). P. 187–192.
11. Weierich C., Brero A., Stein S. et al. Three dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes // *Chromosome Res.* 2003. V. 11, № 5. P. 485–502.

АУТОСОМНЫЕ РЕЦИПРОКНЫЕ ТРАНСЛОКАЦИИ: ПРЕНАТАЛЬНАЯ СЕЛЕКЦИЯ, СЕГРЕГАЦИЯ И ОЦЕНКА ЭМПИРИЧЕСКОГО РИСКА РОЖДЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОГО РЕБЕНКА С ХРОМОСОМНЫМ ДИСБАЛАНСОМ ПРИ СЕМЕЙНОМ НОСИТЕЛЬСТВЕ

Н.В. Шилова

Медико-генетический научный центр, г. Москва

Аутосомные реципрокные транслокации (АРТ) являются наиболее частой структурной хромосомной перестройкой и встречаются в популяции с частотой 0,08–0,3% [1]. Подавляющее большинство носителей АРТ фенотипически нормальны, но имеют повышенный риск рождения детей с умственной отсталостью и множественными врожденными аномалиями и (или) пороками развития (МВПР). Семейное носительство реципрокных транслокаций является одним из классических показаний для проведения пренатальной цитогенетической диагностики (ПЦД).

ПЦД проведена в 51 случае при носительстве 49 АРТ одним из супругов. В 70,6% случаев (36/51) у плода был выявлен нормальный или сбалансированный кариотип вследствие альтернативного типа мейотической сегрегации родителемской транслокации, причем сбалансированный кариотип диагностирован в 2 раза чаще, чем нормальный. 29,4% (15/51) плодов имели несбалансированный кариотип вследствие патологической сегрегации в гаметогенезе родителя носителя транслокации, среди которых в 12 случаях хромосомный дисбаланс у плода обусловлен совместным-1 типом сегрегации, в 2 случаях – совместным-2 типом сегрегации и в 1 случае – сегрегацией 3 : 1 с третичной трисомией. Таким образом, в собственной выборке АРТ отмечается явная тенденция к преимущественной пренатальной селекции зигот вследствие альтернативного непатологического типа сегрегации, что в целом отражает тенденцию к расхождению гомологичных центромер к противоположным полюсам при клеточном делении [2, 3].

Риски формирования зигот с хромосомным дисбалансом у носителей АРТ значительно варьируют от транслокации к транслокации. Эти риски зависят от наиболее вероятного для каждой конкретной транслокации типа патологической сегрегации, при-

водящей к формированию несбалансированных гамет и вероятной жизнеспособности несбалансированных зигот, эмбрионов, плодов или новорожденных [4]. На основании характеристики пахитенных диаграмм была проведена сравнительная оценка предполагаемой и наблюдаемой патологической сегрегации в каждом случае АРТ и установлено, что для подавляющего большинства транслокаций характерна совместная-1 патологическая сегрегация (39/49). Во всех случаях, когда был известен факт регистрации случаев с несбалансированным кариотипом в семье, ожидаемая патологическая сегрегация соответствовала наблюдаемой, приводящей к определенному хромосомному дисбалансу.

Оценка жизнеспособности как плодов с выявленным хромосомным дисбалансом, так и потенциальных зигот с наиболее вероятным дисбалансом вследствие патологической сегрегации для каждой транслокации проводилась с использованием классической модели «размер хромосомного дисбаланса – выживаемость» и «поверхность жизнеспособных дисбалансов», основанной на измерении хромосомных сегментов дистальнее точек разрывов и определении относительного размера хромосомного дисбаланса. Во всех случаях наблюдаемого хромосомного дисбаланса у плода относительный размер этого дисбаланса был наименьшим из всех возможных вариантов такой сегрегации и укладывался в область «выживаемости», что свидетельствует об *in utero* жизнеспособности плодов вплоть до их рождения. При анализе графиков «выживаемости», построенных для 8 базовых вариантов сегрегации каждой из 49 АРТ, определено, что в 1 из 49 случаев (8,1%) ни в одном из вариантов сегрегации зиготы не будут жизнеспособными. Таким образом, любая беременность у женщины – носительницы этой транслокации – при сегрегации по

альтернативному типу будет заканчиваться рождением ребенка с нормальным или сбалансированным кариотипом; при патологической сегрегации все зиготы нежизнеспособны. Оценка жизнеспособности зигот, основанная на сопоставлении относительного размера несбалансированных хромосомных сегментов, может быть дополнительным этапом при оценке повторного риска рождения ребенка с хромосомной патологией при семейном носительстве АРТ. В случаях АРТ, которые сегрегируют с образованием гамет, из которых возможно формирование только нежизнеспособных зигот, ПЦД является нецелесообразной, поскольку риск прерывания беременности вследствие инвазивной процедуры превышает риск рождения больного ребенка.

Оценить значения повторного риска рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом на основе эмпирических данных оказалось возможным только в 45 случаях АРТ. Из них в 36 случаях (80%) этот риск оценивается как низкий (0–5%), в 6 случаях (13,3%) – как средний (5–10%) и только в 3 случаях (6,7%) – как высокий (более 10%). Оценка эмпирического повторного риска в 31 случае при наличии МВГР у ребенка (плода) с учетом случайного выявления хромосомного дисбаланса при проведении ПЦД показала, что в 16,1% случаев (5/31) риск не повышен, в 48,4% случаев (15/31) является низким, в 25,8% случаев (8/31) – средним, в 9,7% случаев (3/31) – высоким. В 14 случаях транслокаций, при семейном носительстве которых не было зарегистрировано рождения детей с МВГР и (или) хромосомным дисбалансом, такой риск оценивается как нулевой в 28,6% случаев (4/14), как низкий – в 57,1% случаев (8/14), как средний – в 7,15% случаев (1/14) и как высокий также в 7,15% случаев (1/14). В обеих группах как при наличии факта хромосомного дисбаланса у потомков, так и при его отсутствии отмечаются транслокации с различными рисками, при

этом в первой группе частота транслокаций со средним и высоким риском оказалась в 2,5 раза выше, чем во второй. Эти данные подтверждают тот факт, что, хотя и отмечается тенденция низкого повторного риска рождения жизнеспособного ребенка при семейном носительстве АРТ, зарегистрированных по поводу привычного невынашивания беременности, эмпирический риск не может быть использован как единственный и решающий фактор при оценке повторного риска рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом.

Таким образом, пренатальная селекция АРТ происходит с преимущественным формированием сбалансированных гамет (зигот) вследствие альтернативной мейотической сегрегации. При оценке повторного риска рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом у носителей АРТ помимо эмпирического риска необходимо учитывать пахитенную конфигурацию квадривалента, относительный размер хромосомного дисбаланса и потенциальную жизнеспособность зигот.

Литература

1. Kochhar P., Ghosh P. Reproductive outcome of couples with recurrent miscarriage and balanced chromosomal abnormalities // *J. Obstet. Gynecol. Res.* 2013. V. 39. P. 113–120.
2. Scriven P., Flinter F., Khalaf Y. et al. Benefits and drawbacks of preimplantation genetic diagnosis (PGD) for reciprocal translocations: lessons from a prospective cohort study // *Eur. J. Hum. Genet.* 2013. V. 21. P. 1035–1041.
3. Zhang, Y., Zhu S., Wu J. et al. Quadrivalent asymmetry in reciprocal translocation carriers predict meiotic segregation patterns in cleavage stage embryos // *Reproduct. Biomed. Online.* 2014. V. 29 (4). P. 490–498.
4. Armstrong S., Goldman A., Speed R. et al. Meiotic studies of a human male carrier of the common translocation, t(11;22), suggest postzygotic selection rather than preferential 3 : 1 M1 segregation as the cause of the liveborn offsprings with an unbalanced translocation // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 67. P. 601–609.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ И МРТ-ИССЛЕДОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ЛОМКОЙ X-ХРОМОСОМЫ

Д.В. Юдкин¹, А.А. Тулупов^{2,3}, И.В. Грищенко¹, Н.А. Лемская¹, А.А. Дольский¹, Ю.В. Максимова^{4,5}, А.Р. Шорина⁵, А.А. Савелов², Е.Р. Исанова³, А.А. Антонов³, И.С. Колесникова¹

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

² Институт «Международный томографический центр» СО РАН, г. Новосибирск

³ Институт медицины и психологии Новосибирского государственного университета, г. Новосибирск

⁴ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Новосибирск

⁵ Новосибирский областной клинический диагностический центр, г. Новосибирск

Синдром ломкой X-хромосомы является самой распространенной причиной наследственной умственной отсталости у человека. Частота встречаемости данного заболевания составляет 1 : 5 000 среди мужчин и 1 : 4 000–6 000 среди женщин. Синдром развивается из-за экспансии тринуклеотидного повтора (CGG)_n в 5' нетранслируемой области гена *FMR1*, расположенного в районе Xq27.3. В норме размер повтора составляет не более 50 триплетов. При количестве триплетов от 55 до 200 развивается состояние, которое называется премутацией. Оно характеризуется повышением транскрипции гена *FMR1*. При количестве триплетов

(CGG)_n более 200 развивается полная мутация, при этом работа гена полностью прекращается, его промотор становится метилированным, у пациентов развивается умственная отсталость. Кроме того, на X-хромосоме пациентов с полной мутацией появляется ломкий сайт FRAXA. Размер полной мутации при данном синдроме может сильно варьировать. Особо стоит отметить уровень метилирования промотора гена *FMR1*, он также варьирует и проявляется в разной степени в зависимости от размера повтора. Устойчивое метилирование наблюдается лишь при достижении повтором размера 400 триплетов [1].

Показано, что профили белого и серого веществ головного мозга детей с синдромом ломкой X-хромосомы достоверно отличаются от таковых у детей с идиопатическим аутизмом и отрицательных по синдрому ломкой X-хромосомы [2]. Кроме того, показано, что на нейроанатомическом уровне синдром является гетерогенным. Основные изменения головного мозга пациентов с синдромом обнаружены в чечевицеобразном и хвостом ядре, таламусе, миндалинах, мозжечке и еще ряде отделов [3].

Таким образом, ранее показана гетерогенность синдрома ломкой X-хромосомы как на молекулярном, так и на анатомическом уровне, но степень влияния молекулярных изменений на изменения в головном мозге на сегодня не показана.

В ходе работы мы проводили исследование пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы и их матерей, устанавливали наличие метилирования промотора гена *FMR1*, размер CGG повтора и экспрессию ломкого сайта FRAXA на метафазных хромосомах. После этого всем исследованным пациентам и их матерям проводили обследование головного мозга методами МРТ и МР-трактографии. Пациентов разделяли на группы в соответствии с установленным размером повтора (CGG)n и наличием метилирования. Исследована взаимосвязь экспрессии ломкого сайта FRAXA и размера повтора.

С помощью МРТ исследовали морфологию головного мозга пациентов и их матерей, а МР-трактография позволила реконструировать пучки белого вещества, потенциально затронутые генетическими изменениями. Пучки выбирались на основании их участия в реализации когнитивной функции и данных более ранних исследований в иных демографических группах. Всего была произведена реконструкция 11 пучков. Для пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы показана высокая асимметрия проводящих пучков. Проведен анализ взаимосвязи степени изменений морфологии головного мозга и изменений проводящих пучков с размером повтора (CGG)n и степени метилирования промотора гена *FMR1*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 15-15-10001.

Литература

1. *Saldarriaga W., Tassone F., Gonzalez-Teshima L.-Y. et al. Fragile X Syndrome // Colombia Médica. 2014. V. 45, № 4. P. 190–198.*
2. *Hoelt F., Walter E., Lightbody A.A. et al. Neuroanatomical Differences in Toddler Boys With Fragile X Syndrome and Idiopathic Autism // Archives of General Psychiatry. 2011. V. 68, № 3. P. 295–305.*
3. *Romano D., Nicolau M., Quintin E.-M. et al. Topological methods reveal high and low functioning neurophenotypes within fragile X syndrome // Hum. Brain Mapp. 2014. V. 35, № 9. P. 4904–4915.*

Раздел 7

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПРЕССИОННЫЕ МАРКЕРЫ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

С.А. Васильев¹, А.В. Агаб¹, А.А. Беленко¹, Р.Р. Савченко¹,
Н.А. Скрябин¹, А.А. Слепцов¹, В.С. Фишман², О.В. Грибова³, Л.Г. Сухих⁴,
Е.С. Сухих⁴, Ж.А. Старцева³, О.Л. Серов², И.Н. Лебедев¹

¹ НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

² Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

³ НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

⁴ Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск

В настоящее время не существует надежных систем для прогноза индивидуальной радиочувствительности человека, несмотря на то что она может отличаться у разных индивидов в 2 раза и более. Вместе с тем информация об индивидуальной чувствительности к радиационному воздействию необходима в ряде ключевых областей, включая персонализированную лучевую терапию злокачественных новообразований, профессиональный отбор и мониторинг космонавтов и работников атомной промышленности. Целью настоящего исследования стало выявление цитогенетических и экспрессионных маркеров индивидуальной радиочувствительности соматических клеток человека.

В лимфоцитах периферической крови 54 здоровых индивидов после воздействия γ -излучения в дозе 2 Гр *in vitro* были проанализированы спонтанные фокусы белков репарации γ H2AX и радиационно-индуцированные микроядра. Анализ уровня фокусов γ H2AX был осуществлен с помощью иммунофлуоресцентного анализа препаратов, тогда как для оценки частоты микроядер был использован микроядерный тест на цитокинез-блокированных двухъядерных клетках в комбинации с флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH) с панцентромерными ДНК-зондами. В результате исследования была обнаружена обратная корреляция между спонтанным уровнем фокусов γ H2AX и частотой центромеро-негативных микроядер после облучения, являющихся маркером потерь ацентрических хромосомных фрагментов ($R = -0,37$, $p = 0,025$). Сходная корреляция была обнаружена и между спонтанным уровнем фокусов γ H2AX до лучевой терапии и частотой аберраций хромосомного типа после окончания лучевой терапии в группе больных злокачественными новообразованиями ($R = -0,85$, $p = 0,0008$). Это указывает на возможность использования спонтанного уровня фокусов γ H2AX для прогноза индивидуальной радиочувствительности соматических клеток человека как *in vitro*, так и *in vivo*.

В результате полнотранскриптомного анализа экспрессии 27 958 генов (как кодирующих, так и не кодирующих белки) в лимфоцитах периферической крови наиболее радиочувствительных и радиорезистентных индивидов из проанализированной выборки после воздействия γ -излучения в дозе 2 Гр *in vitro*

были выделены дифференциально экспрессирующиеся гены, ответственные за межиндивидуальные различия в ответе клеток разных лиц на воздействие радиации, ключевыми из которых являлись гены *THBS1*, *ADAMTS1*, *WHSC1* и *RBFOX2*. Связь экспрессии генов *ADAMTS1*, *WHSC1* и *RBFOX2* с уровнем фокусов γ H2AX и частотой радиационно-индуцированных микроядер была подтверждена и в другом типе клеток – экстрэмбриональных фибробластах плаценты человека (фокусы γ H2AX: *ADAMTS1* ($R = -0,66$, $p = 0,012$); *WHSC1* ($R = -0,73$, $p = 0,005$); *RBFOX2* ($R = -0,58$, $p = 0,037$); микроядра: *ADAMTS1* ($R = -0,63$, $p = 0,016$); *WHSC1* ($R = -0,56$, $p = 0,037$). Это указывает на то, что выделенные гены действительно отражают общие для различных клеток механизмы формирования ответа на действие радиации. Наконец, для дополнительной проверки того, является ли активность этих генов причиной изменения радиочувствительности, а не побочным маркером, была использована технология редактирования генома CRISPR/Cas9, с помощью которой на основе опухолевой клеточной линии HeLa были созданы нокаутные линии с мутациями в исследуемых генах. Как и ожидалось, это привело к изменениям радиочувствительности опухолевых клеток (в 2 и более раз).

Анализ радиочувствительности нокаутных линий с помощью оценки клональной выживаемости после воздействия γ -излучения в дозе 2 Гр показал, что нокаут гена *THBS1* приводил к снижению радиочувствительности в 2,4 раза относительно исходной линии HeLa, а нокаут генов *ADAMTS1*, *WHSC1* и *RBFOX2*, наоборот, повышал радиочувствительность относительно исходной линии HeLa в 4,9; 2,4 и 3,0 раза соответственно ($p < 0,05$). Кроме того, эффективность удаления фокусов белка 53BP1, являющегося маркером двунитевых разрывов ДНК, после воздействия γ -излучением в дозе 2 Гр была максимальной в клеточной линии, нокаутной по гену *THBS1* (на 13% выше по сравнению с исходной линией HeLa), и минимальной в клеточных линиях, нокаутных по генам *ADAMTS1* и *WHSC1* (на 13 и 21% ниже по сравнению с исходной линией HeLa). Наконец, в клеточной линии, нокаутной по гену *THBS1*, был статистически значимо снижен уровень апоптоза в контроле (в 2 раза) и после воздействия в дозе 1 Гр (в 4 раза) ($p < 0,05$).

Выявленное влияние нокаута исследованных генов на клеточную радиочувствительность подтверждает данные полнотранскриптомного и корреляционного анализа и указывает на непосредственное участие продуктов этих генов в радиационно-индуцированном ответе и обеспечении репарации двуниевых разрывов ДНК. Помимо прогноза радиочувствительности, данная работа открывает перспективы по повышению эффективности лучевой терапии за счет создания радиосенсибилизаторов, селективно ингибирующих активность продуктов исследованных

генов, для повышения радиочувствительности опухолей.

Экспериментальная часть работы проведена на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, г. Томск) с использованием материалов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии» (№ 0550-2017-0019).

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 16-34-50178 и стипендии Президента РФ СП-3647.2015.4.

ОЦЕНКА УРОВНЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК В КЛЕТКАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА И СЕМЕННИКОВ У КРЫС ПОСЛЕ СВИНЦОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ИХ ПОТОМСТВА ПЕРВОГО И ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЙ

В.А. Вокина, Л.М. Соседова, Е.А. Капустина

Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований, г. Ангарск

Особое внимание на современном этапе уделяется проблемам генетической токсичности химических факторов и их негативного влияния на здоровье последующих поколений. Изучение механизмов формирования интоксикаций на фоне наследственного «химического груза» позволит прогнозировать персональный риск развития патологического процесса при действии химических факторов в онтогенезе.

Целью настоящего исследования являлось изучение генетического статуса клеток головного мозга методом ДНК-комет у крыс первого и второго поколений со свинцовой интоксикацией.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования выполнены на беспородных белых крысах – 16 самцах и 96 самках, а также на 80 самцах их половозрелого потомства, массой 200–220 г. Моделирование свинцовой интоксикации у белых крыс-самцов осуществляли путем добавления ацетата свинца в питьевую воду ежедневно в течение 7 нед (доза 60 мг/кг) (группа Pb). Сразу после окончания свинцовой экспозиции крыс-самцов подсаживали к интактным самкам (1 : 3) для получения потомства первого поколения. В возрасте 3 мес проводили моделирование свинцовой интоксикации, а также оценку поврежден-

ности ДНК крыс-самцов из полученного потомства до и после экспозиции (группы F1 и F1 + Pb опыт). Сразу после окончания свинцовой экспозиции крыс-самцов F1 подсаживали к интактным самкам (1 : 3) для получения потомства второго поколения, поврежденность ДНК которого оценивали в половозрелом возрасте (группа F2).

Для регистрации повреждения ДНК животных умерщвляли путем декапитации под легким эфирным наркозом, затем осуществляли забор материала для анализа методом ДНК-комет [1, 2]. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание фрагментов ДНК в хвосте комет (доля ДНК в хвосте, %). Для определения доли клеток с разной степенью поврежденности ДНК клетки были распределены в зависимости от величины показателя «доля ДНК в хвосте, %» по пяти группам: от 0 до 1 (клетка без повреждений); от 1,1 до 10 (клетка с незначительными повреждениями); от 10,1 до 30 (клетка со значительными повреждениями) и более 30% ДНК в хвосте (апоптоз-положительная клетка).

Результаты

Результаты исследования степени поврежденности ДНК в ткани головного мозга животных представлены в таблице.

Уровень ДНК-повреждения и содержание свинца в тканях экспериментальных животных, Me (Q_{25} – Q_{75})

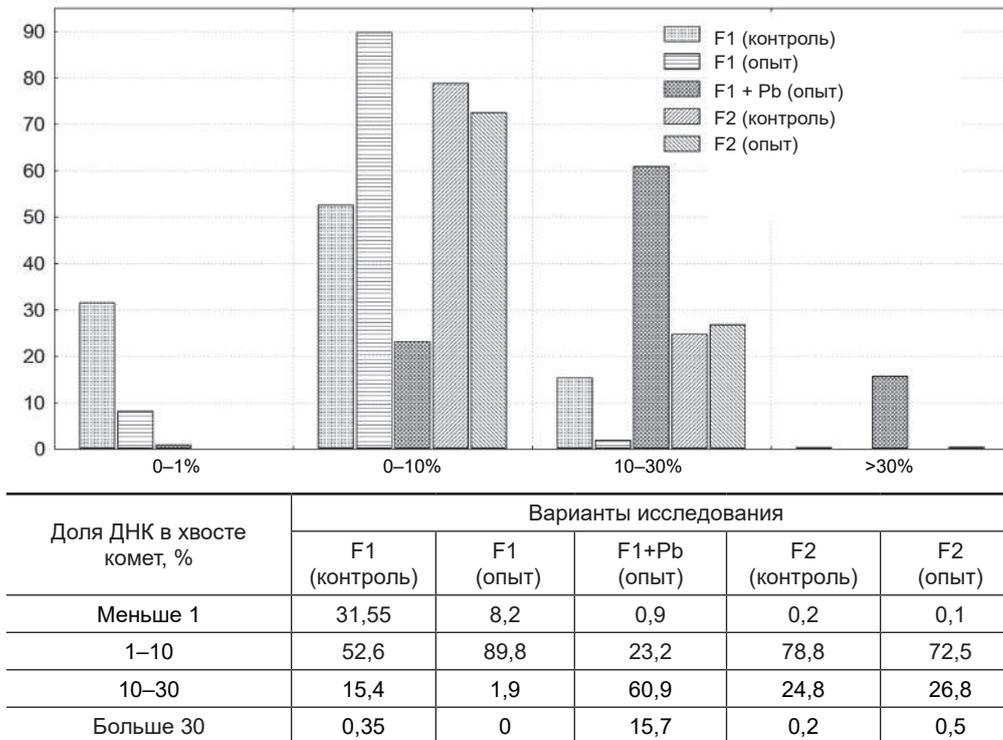
Исследованные ткани	Вариант исследования			
	Группа Pb <i>n</i> = 8	Группа F1 <i>n</i> = 8	Группа F1 + Pb <i>n</i> = 8	Группа F2 <i>n</i> = 8
	Поврежденность ДНК (% ДНК в хвосте)			
Головной мозг	–	<u>0,6 (0,1–1,9)</u> 0,2 (0–2,2)	<u>15,5 (10,4–24,8)*</u> 7,5 (4,9–11,2)	<u>6,2 (0–37,8)</u> 5,8 (0–32,9)
Семенники	<u>0,1 (0,01–2,7)</u> 0,1 (0–1,1)	<u>0,05 (0–2,5)</u> 0,1 (0–1,4)	<u>0,1 (0–2,1)</u> 0,2 (0–2)	<u>0,2 (0–1,9)</u> 0,15 (0–1,1)

Примечание. *n* – число животных. Над чертой приведены показатели для опытной группы, под чертой – для контрольной группы.

* различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Результаты исследования степени повреждения ДНК в клетках головного мозга животных показали, что в группе F1 + Pb содержание ДНК в хвосте комет статистически значимо превышает показатель контрольной группы. При анализе распределения клеток головного мозга с различной степенью

поврежденности ДНК выявлено, что количество клеток со значительными повреждениями ДНК (от 10 до 30%) в группах F1 + Pb (опыт), F2 (контроль и F2 (опыт) значительно выше, чем в ткани семенников, и составляло 60,9, 24,8 и 26,8% соответственно (рисунок).



Распределение клеток головного мозга по количеству ДНК в хвосте комет

Таким образом, исследование методом ДНК-комет не выявило повреждения ДНК в сперматозоидах ни у экспонированных животных, ни у их потомства. Учитывая, что в настоящем эксперименте длительность воздействия ацетата свинца на мужские родительские особи составила 7 нед, что сопоставимо со сроками сперматогенеза у крыс, мы предполагаем, что наблюдаемый эффект может быть опосредован происходящими во время формирования половых клеток эпигенетическими нарушениями, обуславливающими специфические изменения отдельных участков хромосом, что в дальнейшем может при-

водить к стойким функциональным различиям экспрессии генов у потомства.

Литература

1. Капустина Е.А. Трансгенерационные эффекты винилхлорида // Токсикологический вестник. 2015. № 1. С. 36–39.
2. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Анисина Е.А. и др. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: методические рекомендации. М., 2006. 27 с.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ГЕНОМА РАБОТНИКОВ УГОЛЬНЫХ ШАХТ, СТРАДАЮЩИХ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ, И ЕЕ СВЯЗЬ С ПОЛИМОРФНЫМИ ВАРИАНТАМИ ГЕНОВ НЕКОТОРЫХ ЗАЩИТНЫХ МЕХАНИЗМОВ ЛЕГКИХ

В.П. Волобаев

Кемеровский государственный университет, г. Кемерово

Одной из приоритетных задач медицины труда является снижение заболеваемости работников промышленных предприятий. Перспективным подходом для решения данной проблемы с позиций современной экологической и медицинской генетики является изучение индивидуальной чувствительности генома человека к комплексному воздействию химических

и физических факторов производственной среды, провоцирующих общую и профессиональную заболеваемость. В данной работе были изучены генотоксические эффекты у работников угледобывающих шахт, страдающих легочными профзаболеваниями, и их ассоциации с однонуклеотидными вариантами генов *IL-1β* (rs16944), *IL6* (rs1800795), *IL12b*

(rs3212227), *VEGFA* (rs2010963), *MMP1* (rs1799750), *SFTPB* (rs1130866), *SFTPD* (rs721917) и *SFTPD* (rs2243639). Панель SNV была выбрана по данным литературы в связи с их высокой значимостью для развития патологических состояний.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужила периферическая венозная кровь, взятая:

– у работников угольных шахт с диагностированной легочной профпатологией антракоз – 100 человек, антракосиликоз (АС) – 100 человек; средний возраст в данной группе составил (57,2 ± 3,62) года, средний стаж работы в подземных условиях – (27,0 ± 4,38) лет;

– у работников угольных шахт без признаков патологии – 100 человек; средний возраст в данной группе составил (47,11 ± 9,11) лет, средний стаж работы в подземных условиях – (18,45 ± 11,62) лет;

– у лиц, включенных в выборку популяционного контроля – 100 человек; средний возраст в данной группе составил 49,47 ± 8,91 лет.

Все наблюдаемые индивиды относились к мужскому полу и не проходили лучевой диагностики в течение 3 мес до взятия крови. Уровень и спектр структурных хромосомных aberrаций выявлялись методикой учета хромосомных aberrаций в метафазе культивированных лимфоцитов крови [1]. SNV определяли RealTime PCR с использованием TaqMan зондов «БиоСинТек» (Россия). Проводили статистическую обработку. Попарное сравнение частот гено-

типов в группах больных и здоровых лиц осуществляли с использованием двустороннего критерия χ^2 для таблиц сопряженности 2 × 2. Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов (odds ratio, OR). Использовали тест Колмогорова–Смирнова для проверки соответствия данных нормальному распределению. Анализ данных проводился с использованием блока непараметрической статистики. Сравнения показателей хромосомных aberrаций (ХА) между группой с профессиональной патологией и контролем осуществляли с помощью рангового U-теста Манна–Уитни.

Результаты

Результаты изучения ХА у работников угледобывающих предприятий, больных легочной патологией и в контрольных группах представлены в таблице. Наблюдалось значимое увеличение структурных хромосомных aberrаций всех типов у шахтеров по сравнению с популяционным контролем ($p < 0,001$) и у шахтеров с профессиональной патологией по сравнению со здоровыми шахтерами ($p < 0,01$). В группе шахтеров с патологией было отмечено значимое повышение уровня парных фрагментов у больных антракозом по сравнению с АС ($p < 0,01$) и уровня дицентрических хромосом у больных АС по сравнению с антракозом ($p < 0,01$). После введения FDR-поправки была отвергнута значимость различий уровней одиночных фрагментов и aberrаций хроматидного типа между группами с патологией и здоровыми шахтерами.

Уровни хромосомных aberrаций

Показатель	Среднее значение [95% CI]			
	АС	Антракоз	Здоровые шахтеры	Популяционный контроль
Уровень aberrаций	5,12 [4,51–5,72]	5,53 [4,89–6,17]	3,56 [3,17–3,96]	1,13 [0,95–1,30]
Одиночные фрагменты	3,66 [3,08–4,24]	3,78 [3,25–4,32]	2,37 [1,97–2,77]	0,81 [0,67–0,95]
Aberrации хроматидного типа	3,72 [3,14–4,30]	3,88 [3,33–4,42]	2,50 [2,09–2,90]	0,80 [0,66–0,94]
Парные фрагменты	0,94 [0,69–1,18]	1,39 [1,16–1,63]	0,82 [0,60–1,04]	0,27 [0,19–0,34]
Дицентрики	0,37 [0,23–0,52]	0,17 [0,08–0,25]	0,08 [0,03–0,14]	0,04 [0,01–0,06]
Aberrации хромосомного типа	1,62 [1,33–1,91]	1,77 [1,51–2,04]	1,23 [0,93–1,54]	0,31 [0,21–0,41]

Примечание. 95% CI – 95-й доверительный интервал.

В результате изучения SNV были получены данные о распределении частот генотипов этих вариантов в исследованной выборке пациентов и контрольных группах. Частоты всех генотипов соответствовали равновесию Харди–Вайнберга. Была обнаружена тенденция к увеличению частоты дицентрических хромосом для варианта гена *IL-1β* у пациентов с АС. Носители генотипа *IL-1β* T/T имели повышенные частоты дицентрических хромосом (средняя частота 0,81 (95% CI: 0,27–1,36)) по сравнению с носителями гетерозиготного (0,14 (95% CI: 0,03–0,039)) и гомозиготного генотипа C/C (0,32 (95% CI: 0,03–0,61)). Однако эта связь не прошла процедуру FDR, поэтому ее следует интерпретировать с осторожностью. Установлено значимое влияние минорного аллеля (средняя частота 2,71 (95% CI: 2,01–3,41)) и гетерозиготного генотипа (средняя частота 3,09 (95% CI: 2,50–3,68)) гена

SFTPD (rs2243639), по сравнению с мажорным генотипом (средняя частота 1,82 (95% CI: 1,24–2,40)), на повышенный уровень aberrаций хроматидного типа ($p = 0,0029$), в первую очередь за счет одиночных фрагментов ($p = 0,0003$), у шахтеров без легочной патологии. Был проведен анализ чувствительности для оценки прогнозирующего значения индивидуального генотипа для частоты хромосомных aberrаций. Генотип T/T варианта гена *IL-1β* (rs16944) был определен как «удовлетворительный предиктор» ($AUC = 0,676$) для увеличения частоты дицентрических хромосом у больных АС. Генотип A/A варианта гена *SFTPD* (rs2243639) определен как «хороший предиктор» ($AUC = 0,758$) для увеличения частоты aberrаций хроматидного типа в группе здоровых шахтеров.

Значительное увеличение уровня aberrаций хромосомного типа у лиц с легочной патологией при

отсутствии повышения частоты aberrаций хроматидного типа представляет интерес, поскольку такие эффекты являются типичными в первую очередь для радиационного повреждения. В то же время накопление данных о неблагоприятных биологических эффектах ионизирующей радиации в малых дозах приводит к убеждению, что метаболический стресс, а не повреждение ДНК в результате ионизационных событий, может быть основным фактором в определении судьбы клеток после облучения в малых дозах [2]. Профессиональные легочные заболевания шахтеров сопровождаются активной гибелью макрофагов и воспалением, что активизирует оксидативный стресс, который, видимо, приводит к увеличению уровня хромосомных обменов. Более высокая частота дицентрических хромосом у больных шахтеров с генотипом *IL-1β* (rs16944) T/T по сравнению с индивидами контрольной группы, обнаруженная в настоящем исследовании, согласуется с концепци-

ей оксидативной природы увеличения уровня хромосомных aberrаций. Наличие аллеля T приводит к увеличению уровня экспрессии IL-1-цитокина, что приводит к обострению патологического процесса и, как следствие, к сильному окислительному стрессу. SNV rs2243639 приводит к нарушению иммунологической функции коллагенового домена SP-D, в связи с чем усиливается интенсивность воспалительного процесса, что, вероятно, сказывается на увеличении aberrаций хроматидного типа.

Литература

1. *Hungerford P.A.* Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // *Stain Techn.* 1965. V. 40. P. 333–338.
2. *Schipler A., Iliakis G.* DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice // *Nucleic Acids Research.* 2013. V. 41 (16). P. 7589–7605.

СОСТАВ РЕСПИРАТОРНОЙ МИКРОФЛОРЫ КАК ФАКТОР МОДИФИКАЦИИ МУТАГЕНЕЗА В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

В.Г. Дружинин^{1,2}, Л.В. Мацкова³, В.П. Волобаев¹, А.В. Ларионов²

¹ Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Россия

² Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово, Россия

³ Каролинский институт, г. Стокгольм, Швеция

Исследования по идентификации и оценке биомедицинской значимости воздействия генетически активных факторов среды на геном человека за последние десятилетия сформировались в рамках основных направлений генетической токсикологии. Перечень факторов среды, способных индуцировать мутации, включает широкий спектр воздействий физической, химической и биологической природы. В этом обширном списке роль биологических мутагенов, включающих мобильные генетические элементы, экзогенную ДНК, патогенные бактерии, вирусы, антивирусные вакцины, остается наименее изученной [1].

До настоящего времени без должного внимания генетических токсикологов остается еще целая группа факторов, потенциально способных влиять на возникновение мутаций. Речь идет о многочисленных бактериях, населяющих наш организм. Стабильность генома человека, особенно в условиях экспозиции генотоксическими и канцерогенными факторами, может прямо (или опосредованно) зависеть от слаженности и эффективности работы микробиальных сообществ, эволюционно закрепленных в составе микробиома. Известно, что мутагены и канцерогены окружающей среды, включая профессиональные вредности, ксенобиотики в продуктах питания, чрезмерное применение антибактериальных препаратов, неправильное использование слабительных средств и другие факторы существенно влияют на состояние микрофлоры респираторных путей и желудочно-кишечного тракта, вызывая количественные и качественные нарушения соотношений между различными микробными популяциями. В свою очередь, бактерии влияют на способность организма к метаболизму мутагенных соединений,

таких как полициклические ароматические углеводороды, ацетальдегид, N-нитрозосоединения и др. Отдельные представители микрофлоры способны повреждать ДНК клеток хозяина с помощью продукции генотоксинов – токсических активных форм кислорода и реактивного азота [2]. Классическими примерами генотоксинов являются колибактин, который производится некоторыми штаммами сапрофитной кишечной палочки (*E. coli*) [3], и цитотоксический некротический фактор (CDT), производимый *B. Fragilis* [4]. Генотоксины продуцируют также *Helicobacter spp.*, *Salmonella enterica*, *Serovar paratyphi*. Имеются сведения о способности бактерий блокировать механизм репарации ДНК [5]. Таким образом, можно предположить, что процессы индуцированного мутагенеза и канцерогенеза тесно взаимосвязаны с состоянием микробиома. Удивительно, но до сих пор проверка этой очевидной гипотезы практически не стала предметом системного анализа в генетической токсикологии человека.

Исходя из необходимости изучения данной проблемы, логично предположить, что возможная взаимосвязь статуса микробиома человека с мутагенными и канцерогенными эффектами способна наиболее ярко проявиться в условиях выраженной (профессиональной) экспозиции экологическими токсикантами. В ряду промышленных предприятий, относящихся к разряду опасных по параметрам загрязнения окружающей среды мутагенами и канцерогенами, особая роль отводится производствам угольного цикла (добыча и переработка). В производственных циклах и отходах этих предприятий выделяется целый комплекс токсических факторов. Воздействие этих факторов на людей, обладающих высокочувствительным геномом, приводит к уве-

личению общей и онкологической заболеваемости в контингентах работников угольной индустрии. В этих условиях маркерами повышенной индивидуальной чувствительности к действию генотоксических агентов и показателем повышенного канцерогенного риска, с одной стороны, может служить накопление хромосомных aberrаций и микроядер в соматических клетках [6]. С другой стороны, генетически предопределенная специфическая активность генома человека в экспрессии ферментов биотрансформации ксенобиотиков, репарации ДНК, контроля апоптоза и клеточного цикла и др., т.е. систем защиты генома от повреждений, также способны значимо влиять на чувствительность организма человека к воздействию генотоксических канцерогенов. Кроме того, важную информацию об индивидуальной чувствительности к условиям канцерогенноопасного производства может дать анализ экспрессии комплекса генов, обеспечивающих стабильность генома. Наконец, свой вклад в определение стабильности генома, поддержание генетического гомеостаза в условиях экспозиции комплексом негативных факторов угледобывающего производства (согласно предложенной нами гипотезе) должны вносить количественные и качественные особенности микробиома респираторного тракта.

В докладе обсуждаются результаты выполнения пилотного проекта по изучению состава микрофлоры

респираторных путей у жителей шахтерского региона. В рамках исследования впервые дается оценка взаимосвязи повреждений хромосом вследствие влияния генотоксических факторов угледобывающей промышленности с составом микрофлоры в когортах шахтеров и больных с профессиональными заболеваниями верхних дыхательных путей и плоскоклеточным раком легкого.

Литература

1. *Абилев С.К., Глазер В.М.* Мутагенез с основами генотоксикологии: учеб. пособие. М.; СПб.: Нестор-История, 2015. 304 с.
2. *Frisan T.* Bacterial genotoxins: the long journey to the nucleus of mammalian cells // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1858 (3). P. 567–575.
3. *Cuevas-Ramos G., Petit C.R., Marcq J. et al.* Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107 (25). P. 11537–11542.
4. *Guidi R., Guerra L., Levi L. et al.* Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response // *Cell Microbiol.* 2013. V. 15 (1). P. 98–113.
5. *Fall S., Mercier A., Bertolla F. et al.* Horizontal gene transfer regulation in acteria as a «spandrel» of DNA repair mechanisms // *PLoS ONE.* 2007. V. 2 (10). P. 1055.
6. *Milic M., Frustaci A., Del Bufalo A. et al.* DNA damage in non-communicable diseases: A clinical and epidemiological perspective // *Mutat. Res.* 2015. V. 776. P. 118–127.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АНОМАЛИИ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ У РАБОТНИКОВ ЯДЕРНОГО ПРОИЗВОДСТВА, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ИОНИЗИРУЮЩЕМУ ИЗЛУЧЕНИЮ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

**Д.С. Исубакова^{1,2}, Н.В. Литвяков^{1,2}, М.В. Халюзова¹,
Е.В. Брониковская¹, Т.В. Усова¹, А.Б. Карпов¹, Р.М. Тахауов¹**

¹ Северский биофизический научный центр ФМБА России, г. Северск

² НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск

Человечество активно использует в своей жизни «мирный» атом. Это привело к образованию когорты работников радиационно опасного производства и жителей прилегающих территорий, подвергающихся хроническому радиационному облучению. Ионизирующее излучение (ИИ) может вызывать негативные биологические эффекты в человеческом организме, в частности образование хромосомных и генных мутаций в различных клетках-мишенях [1–4]. В этой связи все большее значение приобретает оценка эффектов воздействия ИИ на организм человека, в том числе в «малых» и «средних» дозах. Наиболее объективным и достаточно хорошо разработанным способом биологической индикации мутагенного воздействия на организм человека ионизирующего излучения является цитогенетическое исследование лимфоцитов периферической крови, которое заключается в учете хромосомных aberrаций (ХА) в культивируемых лимфоцитах периферической крови [5].

Цель настоящей работы – исследование частоты и спектра нестабильных цитогенетических аномалий в лимфоцитах крови у здоровых работников ядерного производства, подвергавшихся хроническому радиационному воздействию низкой интенсивности.

Материалы и методы

В исследуемую группу вошли 1 300 работников Сибирского химического комбината (СХК), которые подвергались хроническому воздействию внешнего (γ-излучение), внутреннего (за счет инкорпорированного ²³⁹Pu) или сочетанного (внешнего и внутреннего) облучения в процессе профессиональной деятельности. Контрольная группа состояла из 100 работников СХК, которые не подвергались облучению. Объектом исследования служила периферическая кровь. Всем обследованным работникам был проведен стандартный цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови. Для постановки культуры использовали цельную кровь, которую смешивали с культуральной средой и инкубировали в культуральных флаконах при 37 °С в суховоздушном термостате в течение 48 ч. Для получения метафаз использовали гипотонизацию с помощью 0,56% раствора КСI. Рутинную окраску хромосом проводили красителем Гимза, приготовленным на фосфатном буфере. У каждого индивида обследовали не менее 300 метафаз. Анализировали все виды aberrаций хромосом: aberrантные клетки, aberrации хромосомного типа, хроматидные фрагменты, точечные

фрагменты, дицентрические хромосомы, кольцевые хромосомы, хроматидные обмены и др.

Результаты

В ходе проведенного исследования установлено, что частота ХА не коррелировала с возрастом в диапазоне 40–65 лет. При оценке зависимости частоты ХА от пола при равнозначной радиационной нагрузке гендерных различий также не обнаружено.

Изучив зависимость выхода ХА от разных видов облучения, мы выявили, что для индукции ХА определяющим фактором является хроническое внешнее облучение. При дополнительной радиационной нагрузке за счет инкорпорированного ^{239}Pu в крови работников с сочетанным облучением по сравнению с работниками, подвергавшимися только внешнему облучению (при равных дозовых нагрузках по внешнему облучению), частота ХА снижена.

На следующем этапе мы оценили зависимость частоты и спектра ХА от дозы внешнего облучения. Нелинейный характер дозовой зависимости наблюдался для частоты абберрантных клеток, абберраций хромосомного типа, точечных фрагментов и дицентрических хромосом. При облучении в дозе $> 0\text{--}10$ мЗв наблюдалось статистически значимое уменьшение частоты абберрантных клеток, абберраций хроматидного и хромосомного типов по сравнению с контролем, что соответствует явлению радиационного гормезиса [6, 7]. Вероятно, одним из механизмов уменьшения частоты ХА может быть стимуляция активности апоптоза, что обеспечивает высокий уровень элиминации поврежденных клеток [8]. При хроническом радиационном воздействии в дозах менее 40 мЗв не отмечается значимого повышения частоты ХА, что может свидетельствовать в пользу известной пороговой модели. Начиная с диапазона доз $> 40\text{--}100$ мЗв (для дицентриков с диапазоном $> 100\text{--}200$ мЗв), отмечается статистически значимое увеличение выхода ХА. В диапазоне доз 100–500 мЗв на дозовой зависимости имеется плато, уровень цитогенетических аномалий не увеличивается и только возрастает статистическая значимость различий с контролем. Предположительно, в образовании плато участвует система репарации и апоптоза [8, 9]. После 500 мЗв частота ХА линей-

но возрастает с дозой внешнего облучения. Однако для хроматидных и парных фрагментов ранее установленная нами [4] нелинейная зависимость не подтвердилась. Для хроматидных фрагментов и парных фрагментов отмечается линейная дозовая зависимость. У носителей, имеющих в лимфоцитах крови транслокации и хроматидные обмены, наблюдается статистически значимо более высокий уровень дозы внешнего облучения. Дозовая зависимость не была показана для кольцевых хромосом, хроматидных обменов, мультиабберрантных клеток и транслокаций.

Литература

1. Бочков Н.П. Анализ типов абберрантных клеток – необходимый элемент биологической индикации облучения // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 1993. Т. 38, № 2. С. 32–35.
2. Бочков Н.П., Чеботарёв А.Н., Катосова Л.Д., Платонова В.И. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных абберраций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Генетика. 2001. Т. 37, № 4. С. 549–557.
3. Rodrigues A.S., Oliveira N.G., Monteiro O.G. et al. Use of cytogenetic indicators in radiobiology // Radiation Protection Dosimetry. 2005. V. 115, № 1–4. P. 455–460.
4. Литвяков Н.В., Фрейдин М.Б., Халюзова М.В. и др. Частота и спектр цитогенетических аномалий у работников Сибирского химического комбината // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54, № 3. С. 283–296.
5. IAEA technical reports series No 260 Biological dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment. Vienna: IAEA, 1996.
6. Кузин А.М. Идеи радиационного гормезиса в атомном веке. М.: Наука, 1995. С. 158.
7. Ивановский Ю.А. Радиационный гормезис. Благоприятны ли малые дозы ионизирующей радиации? // Вестник ДВО РАН. 2006. № 6. С. 86–91.
8. Литвяков Н.В., Тахауов Р.М., Агеева А.М. и др. Взаимосвязь активности каспазы-3 в лимфоцитах крови работников Сибирского химического комбината с дозой облучения, уровнем цитогенетических аномалий и полиморфизмом генов репарации ДНК // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2009. Т. 54, № 6. С. 41–48.
9. Поздышкина О.В., Севанькаев А.В. Количественные закономерности выхода абберраций хромосом в культуре лимфоцитов человека при фракционированном γ -нейтронном облучении и в различных стадиях митотического цикла. Цитогенетические эффекты в стадии G0 // Радиобиология. 1992. Т. 32, № 4. С. 506–513.

ПОВРЕЖДЕНИЯ ХРОМОСОМ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ У ШАХТЕРОВ КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

В.И. Минина^{1,2}, Ю.Е. Кулемин^{1,2}, Я.А. Савченко¹, А.А. Тимофеева¹, Т.А. Головина^{1,2},
М.Л. Баканова¹, А.В. Рыжкова¹, В.П. Волобаев², В.Г. Дружинин^{1,2}, И.А. Вафин³

¹ Институт экологии человека Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово

² Кемеровский государственный университет, г. Кемерово

³ Кемеровский областной центр крови, г. Кемерово

Генотоксическая опасность условий труда в угольных шахтах является предметом эколого-генетических и гигиенических исследований во всем мире. Наиболее опасные токсиканты, связанные с добычей и переработкой угля, – это угольные пылевые части-

цы разного размера (преимущественно от 20 до 50 мкм), кварц, полициклические ароматические углеводороды, тяжелые металлы. Кроме того, уголь содержит природные радиоактивные вещества уранового, актиноуранового и ториевого рядов. Комплексное

действие этих радиационных и химических факторов способно вызывать различные виды повреждений ДНК, возможно появление эпигенетических аномалий, изменение экспрессии генов, а на уровне популяции – повышение онкологической заболеваемости населения [1, 2]. «Золотым стандартом» экогенетических исследований уже на протяжении многих лет является классический тест на хромосомные аберрации в лимфоцитах крови человека, позволяющий оценивать уровень и спектр структурных перестроек и разрывов хромосом [3]. В России крупнейшим угледобывающим регионом является Кемеровская область, на территории которой функционируют 58 шахт и 36 угольных разрезов. В связи с этим целью исследования стал анализ цитогенетических нарушений у шахтеров Кемеровской области.

Материалы и методы

Были обследованы 873 жителя Кемеровской области, в том числе: 520 мужчин, работающих на шахтах Кемеровской области (шахты Кемеровского, Ленинск-Кузнецкого, Новокузнецкого районов; средний «подземный» стаж составил 26 лет; средний возраст – 50 лет); и 353 мужчины, проживающие в той же местности и не работающие на промышленных предприятиях (средний возраст – 49,7 лет). Критерии исключения для всех изученных групп: психические, наследственные, инфекционные, аллергические, аутоиммунные, онкологические заболевания, рентгенологическое облучение и прием лекарственных препаратов до забора крови для анализа; повышенная температура, субъективно плохое самочувствие в момент исследования. План исследования был утвержден комитетом по этике Института экологии человека Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН. Участие людей в исследовании базировалось на принципах добровольности и информированности о целях, методах и результатах работы. Все обследованные индивиды подписывали форму информированного согласия на участие в исследовании.

Материалом для исследования хромосомных аберраций (ХА) служила цельная периферическая кровь, которая забиралась квалифицированным медицинским работником в асептических условиях в системы «Вакутейнер» с гепарином в качестве антикоагулянта. Культивирование клеток крови и регистрацию повреждений хромосом проводили в соответствии с общепринятыми рекомендациями [3–5]. Статистическая обработка материала осуществлялась с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Для анализа цитогенетических показателей рассчитывались медианы, размахи, нижняя / верхняя квартиль, средние величины, стандартные отклонения, стандартные ошибки, асимметрии, эксцессы. С использованием критерия Колмогорова–Смирнова проводили проверку соответствия распределения количественных показателей закону нормального распределения. Было установлено статистически значимое отклонение распределений от нормального всех изучаемых цитогенетических параметров ($p < 0,05$). Сравнение групп проводилось с помощью непараметрических критериев: теста Краскала–Уоллиса (для сравнения нескольких групп), U–критерия Манна–Уитни (для парных сравнений).

Результаты

В результате проведенного исследования установлено, что средняя частота ХА у шахтеров составила $4,42 \pm 0,11\%$, что значительно выше, чем у в группе сравнения у неработающих на производстве индивидов – $1,99 \pm 0,09\%$ ($p = 0,000001$), как по уровню аберраций хроматидного типа ($2,79 \pm 0,09\%$ против $1,58 \pm 0,08\%$; $p = 0,000001$), так и по уровню аберраций хромосомного типа ($1,83 \pm 0,06\%$ против $0,43 \pm 0,03\%$; $p = 0,000001$). Наибольшие различия между группами были отмечены для таких вариантов, как дицентрические хромосомы (с фрагментами и без, суммарно – в 4 раза), кольцевые хромосомы (в 10 раз), атипичные моноцентрики (в 26 раз).

Статистически значимой корреляции между стажем работы во вредных условиях и частотой ХА выявлено не было. Хотя в целом можно было отметить тенденцию к повышению частоты метафаз с ХА по мере возрастания стажа работы во вредных условиях.

Самые высокие значения ХА отмечались у шахтеров-проходчиков ($5,76 \pm 0,51\%$), машинистов горно-выемочных машин ($5,20 \pm 0,76\%$), электрослесарей ($5,26 \pm 1,15\%$), горнорабочих очистного забоя ($4,29 \pm 0,525\%$). Все данные профессии связаны с работой под землей в течение полной смены. Концентрация угольной пыли в воздухе рабочих мест у них достигала 180 мг/м^3 , что в 45 раз превышает ПДК. У двух рабочих горноочистного забоя помимо повышенной средней частоты клеток с ХА ($4,5\%$) были дополнительно выявлены гоше-клетки со множественными повреждениями хромосом обменного типа. Природа гоше-клеток пока вызывает дискуссии, но многие сходятся в том, что существует значимый вклад радиационного фактора в их формирование, в частности high LET-радиации с внутренним облучением организма α -частицами.

Таким образом, результаты изучения хромосом у шахтеров свидетельствуют о мутагенном характере воздействия факторов производственной среды на организм работающих индивидов и указывают на необходимость разработки мер комплексной профилактики заболеваний, обусловленных накоплением повреждений ДНК. Для формирования групп повышенного риска у всех обследованных шахтеров проводили забор крови в системы «Вакутейнер» с антикоагулянтом $0,25 \text{ мМ}$ ЭДТА-Na. ДНК выделяли из периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Собранная коллекция ДНК послужит основой для поиска молекулярно-генетических маркеров повышенной токсико-генетической чувствительности к факторам производственной среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-15-00034.

Литература

1. Rohr P., Kvitko K., da Silva F.R. et al. Genetic and oxidative damage of peripheral blood lymphocytes in workers with occupational exposure to coal // *Mutat. Res.* 2013. V. 758 (1–2). P. 23–31.
2. León-Mejía G., Quintana M., Debastiani R. et al. Genetic damage in coal miners evaluated by buccal micronucleus cytome assay // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2014. V. 107. P. 133–139.

3. Бочков Н.П. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Генетика. 2001. Т. 37, № 4. С. 549–557.
4. Hungerford P.A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // Stain Techn. 1965. V. 40. P. 333–338.
5. Bucton K.E. Methods for the analysis of human chromosome aberrations // WHO. Geneva, 1993. 66 p.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *BCL-2* У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

В.С. Никифоров

Уральский научно-практический центр радиационной медицины, г. Челябинск

Доказательства наличия связи между радиацией и развитием стохастических эффектов получены в исследованиях популяций, подвергшихся облучению в высоких дозах при значительных мощностях доз. Нормы радиационной безопасности разработаны на основе исследований эффектов у лиц, переживших атомную бомбардировку, а также у профессионалов, начинающих свою деятельность на заре становления атомной промышленности. Опасность воздействия на здоровье людей малых и средних доз широко обсуждается в научном мире.

Цель работы заключалась в исследовании экспрессии гена *BCL-2* у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию вследствие сбросов жидких радиоактивных отходов ПО «Маяк» в реку Теча.

Оценку экспрессии гена *BCL-2* провели у 80 облученных лиц (образцы крови получены через 60–70

лет после хронического воздействия). Средняя доза на красный костный мозг составила 84 ± 7 сГр. Контрольную группу составили лица, проживающие в сходных социально-экономических условиях на территории Южного Урала, накопленные дозы у которых не превышали 7 сГр.

Оценку уровней экспрессии проводили методом ПЦР в реальном времени. Данные анализировали с использованием метода порогового значения цикла сравнения с нормализацией по экспрессии гена «домашнего хозяйства» в каждом образце. Статистический анализ выполняли с использованием ПО SPSS.

Предварительные результаты: оценки экспрессии гена *BCL-2* в клетках периферической крови облученных лиц статистически не отличались от показателей, полученных в группе сравнения.

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ФОРМИРОВАНИИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО СТАТУСА ШАХТЕРОВ С ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМИ ЛЕГОЧНЫМИ ПАТОЛОГИЯМИ

Т.А. Толочко¹, А.В. Мейер¹, В.И. Минина^{1, 2}, О.А. Соболева², А.В. Литвин

¹ Кемеровский государственный университет, г. Кемерово

² Институт экологии человека Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово

Дисбаланс в системе антиоксидантной защиты у шахтеров развивается в связи с гипоксией и выделением свободных радикалов вследствие фагоцитоза частиц угольной пыли и является одной из важнейших причин развития воспаления, которое усугубляет нарушения редокс-потенциала и способствует развитию окислительного стресса. В связи с этим исследованию полиморфизма генов антиоксидантной защиты в развитии хронических профессиональных заболеваний легких (ХПЗЛ) у шахтеров следует уделять особое внимание. Параллельно с изучением частот распределения генотипов необходимо учитывать изменения в клетках тканей, непосредственно контактирующих с флогогенными факторами производственной среды.

Целью настоящего исследования стала оценка уровня цитогенетических, пролиферативных и деструктивных нарушений в буккальных эпителиоцитах шахтеров Кемеровской области с ХПЗЛ с включением в ассоциативное исследование полиморфных вариантов генов *SOD2* (rs4880), *GPX1* (rs1050450).

Материалы и методы

В группу шахтеров с ХПЗЛ вошли 88 мужчин, средний возраст обследованных составил ($54,54 \pm 0,49$) лет, стаж работы на вредном производстве – ($27,86 \pm 0,51$) лет; группа сравнения включила 119 шахтеров, средние значения соответствующих характеристик составили ($51,67 \pm 0,75$) лет и ($25,59 \pm 0,94$) лет. Материалом для исследования послужили образцы венозной крови и эпителия ротовой полости. Для тестирования цитогенетических и цитотоксических эффектов проведен развернутый микроядерный тест на буккальных эпителиоцитах с учетом цитогенетических (микроядро, протрузии «пузырек», «яйцо», «язык»), пролиферативных (двуядерность, сдвоенное ядро, ядерная насечка) и деструктивных (ядерная вакуолизация, перинуклеарная вакуоль, конденсация хроматина, кариопикноз, кариорексис, кариоплизис, лизис ядерной мембраны) показателей [1]. Молекулярно-генетическое типирование проводилось с использованием метода амплификации

специфических участков исследуемых генов с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени (real-time ПЦР). Статистическую обработку осуществляли с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Сравнение средних значений частот выявления кариологических нарушений проводилось с применением Mann–Whitney U-test. Расчет ассоциаций различных генотипов (отдельно и в сочетаниях) с кариологическими показателями буккального эпителия с использованием U-критерия Манна–Уитни проводился с учетом поправки Бонферрони (P_{cor}-Bf) на множественные сравнения.

Результаты

Сравнительный анализ средних значений частот выявления кариологических повреждений в анализируемых группах установил для группы с ХПЗЛ значимое превышение по всем показателям ($p < 0,01$), за исключением перинуклеарной вакуолизации. Полученные результаты свидетельствуют, что наличие ХПЗЛ, сопровождающееся образованием медиаторов воспаления, снижением жизненной емкости легких и гипоксией, оказывает негативное воздействие на цитогенетические, пролифератив-

ные и деструктивные показатели буккальных эпителиоцитов.

Анализ частот распределения генотипов по локусам *SOD2* (rs4880) и *GPX1* (rs1050450) установил соответствие равновесию Харди–Вайнберга для обеих анализируемых групп. Сопоставление распределений частот генотипов в группах сравнения по локусу *SOD2* (rs4880) не выявило значимых отличий ($\chi^2 = 1,7482$, $p = 0,4177$), так же как и по локусу *GPX1* (rs1050450) ($\chi^2 = 0,9389$, $p = 0,6253$).

Известно, что полиморфизм Ala16Val (Т/С) гена *SOD2* приводит к снижению эффективности переноса фермента в матрикс, что способствует накоплению супероксида. Ассоциативное исследование показало (таблица), что у гомозигот Ala/Ala в буккальных эпителиоцитах шахтеров с ХПЗЛ статистически значимо чаще выявляются протрузии «разбитое яйцо» ($p = 0,0488$), в контрольной группе – клетки с микроядрами ($p = 0,0396$). Тем не менее наличие в генотипе аллеля С оказалось сопряжено с повышенной частотой гибели клеток путем некроза. Так, для группы с ХПЗЛ буккальные эпителиоциты с лизированными ядрами встречаются значимо чаще ($p = 0,0348$) у гомозигот Val/Val по сравнению с гомозиготами Ala/Ala.

Значимые ассоциации кариологических повреждений буккальных эпителиоцитов с полиморфизмами генов *SOD2* Ala16Val и *GPX1* Pro198Leu

Показатель	Генотипы		
	Шахтеры с ХПЗЛ		
<i>SOD2</i> Ala16Val	Ala/Ala (N = 23)	Ala/Val (N = 48)	Val/Val (N = 17)
Протрузия «яйцо»	0,74 ± 0,17	0,48 ± 0,12	0,18 ± 0,09
Кариолизис	163,68 ± 16,51	193,8 ± 13,76	265,29 ± 44,96
<i>GPX1</i> Pro198Leu	Pro/Pro (N = 42)	Pro/Leu (N = 38)	Leu/Leu (N = 8)
Протрузия «язык»	0,31 ± 0,08	0,26 ± 0,08	0,75 ± 0,25
Кариолизис	172,46 ± 17,87	213,47 ± 18,48	283,75 ± 36,32
Кариопикноз	26,0 ± 2,08	26,03 ± 1,86	39,88 ± 5,82
Контроль			
<i>SOD2</i> Val16Ala	Ala/Ala (N = 29)	Ala/Val (N = 58)	Val/Val (N = 33)
Микроядро	1,79 ± 0,57	1,21 ± 0,20	0,82 ± 0,19
<i>GPX1</i> Pro198Leu	Pro/Pro (N = 61)	Pro/Leu (N = 51)	Leu/Leu (N = 7)
Двуядерность	6,52 ± 0,68	4,41 ± 0,48	7,71 ± 1,08
Лизис ядерной мембраны	7,52 ± 0,95	8,24 ± 1,19	13,71 ± 3,05

П р и м е ч а н и е. N – число индивидов с соответствующим генотипом.

Для полиморфизма Pro198Leu (С/Т) гена *GPX1* установлено, что наличие аллеля Leu в гомозиготном состоянии ассоциировано с повышенной частотой выявления ядерной протрузии «язык» ($p = 0,0376$) и деструктивных изменений ядра, таких как кариопикноз ($p = 0,0425$, $p = 0,0191$), кариолизис ($p = 0,0027$, $p = 0,0159$), у шахтеров с ХПЗЛ, а в группе сравнения – с частотой выявления двуядерных клеток ($p = 0,0394$, $p = 0,0110$) и с лизисом кариолеммы ($p = 0,0339$) относительно когорт с генотипом Pro/Pro или Pro/Leu (см. таблицу). Таким образом, наличие в генотипе аллеля Т, обуславливающего снижение каталитической активности фермента, связанной с детоксикацией H_2O_2 , усиливает развитие деструктивных процессов.

Анализ сочетанного влияния аллелей *SOD2* и *GPX1* для группы с ХПЗЛ показал, что у гетерозигот по обоим локусам чаще выявляются клетки с кариолизисом относительно сочетанной гомозиготности по локусам Ala/Ala и Pro/Pro, соответствующие зна-

чения составили $212,81 \pm 21,45$ и $125,15 \pm 11,79$ ($p = 0,0102$). В то же время частота выявления апоптотных тел, напротив, статистически значимо ниже в сопоставлении с гомозиготами Val/Val и Pro/Pro, соответствующие значения – $0,14 \pm 0,05$ и $0,67 \pm 0,33$ ($p = 0,0087$).

Таким образом, на данном этапе работы можно заключить, что полиморфизмы генов антиоксидантной защиты оказывают модифицирующее влияние на цитогенетический статус клеток буккального эпителия шахтеров как при наличии ХПЗЛ, так и у практически здоровых рабочих.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-44-420087 p_a, РНФ № 16-15-00034.

Литература

1. Thomas P., Hollad N., Bolognesi C. et al. Buccal micronucleus cytome assay // Nat. Protoc. 2009. V. 4. P. 825–837.