

Главный редактор
ГИНТЕР Е.К.
 академик РАН, д.б.н., профессор
Заместители главного редактора
ПУЗЫРЕВ В.П.
 академик РАН, д.м.н., профессор
БАРАНОВ В.С.
 чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
Ответственный секретарь
ИЖЕВСКАЯ В.Л.
 д.м.н.
Редакционная коллегия
АРЧАКОВ А.И.
 академик РАН, д.б.н., профессор
ВОЕВОДА М.И.
 чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
ДУРНЕВ А.Д.
 чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
ИВАНОВ В.П.
 д.б.н., профессор
ИЛЛАРИОШКИН С.Н.
 д.м.н., профессор
КОЗЛОВА С.И.
 д.м.н., профессор
КОПНИН Б.П.
 д.б.н., профессор
КУЦЕВ С.И.
 д.м.н.
КУЧИНСКАС В. (Kucinskas V.)
 академика Литовской АН, д.б.н., профессор
ЛИМБОРСКАЯ С.А.
 д.б.н., профессор
МАЦЕК М. (Macek M. Jr.)
 доктор медицины и педиатрии (MD),
 доктор философии по медицине
 и молекулярной генетике (PhD), профессор
МИХАЙЛОВА Л.К.
 д.м.н., профессор
НАЗАРЕНКО Л.П.
 д.м.н., профессор
НОВИКОВ П.В.
 д.м.н., профессор
НОСИКОВ В.В.
 д.б.н., профессор
РОГАЕВ Е.И.
 д.б.н., профессор
РУБЦОВ Н.Б.
 д.б.н., профессор
СВЕРДЛОВ Е.Д.
 академик РАН, д.б.н., профессор
СЕРЕДЕНИН С.Б.
 академик РАН, д.м.н., профессор
СМИРНОВ В.Н.
 академик РАН, д.м.н., профессор
СТЕПАНОВ В.А.
 д.б.н., профессор
ХУСНУТДИНОВА Э.К.
 д.б.н., профессор
ЧЕХОНИН В.П.
 академик РАН, д.б.н., профессор
ЧУЧАЛИН А.Г.
 академик РАН, д.м.н., профессор

Издатель: Иришкин Дмитрий
 E-mail: genius-media@mail.ru

Адреса редакции:
 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1,
 Федеральное государственное
 бюджетное учреждение
 Медико-генетический научный центр РАМН
 Тел. (499) 612-81-07, факс: 324-07-02
 E-mail: L_Tarlycheva@med-gen.ru

Вниманию авторов и читателей:
 Рукописи и иллюстрации не возвращаются.
 При перепечатке материалов согласование с редакцией журнала «Медицинская генетика» обязательно. За содержание рекламных публикаций ответственность несет рекламодатель.

© Российское общество медицинских генетиков
 © Российская академия медицинских наук
 © ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»
 © ИП Иришкин Дмитрий Андреевич

Тираж 200 экз.

Медицинская ГЕНЕТИКА

Ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал

2018 г. Том 17. №3 (189)

СОДЕРЖАНИЕ

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

Трофимова И.Л., Енукашвили Н.И., Кузнецова Т.В., Баранов В.С.
 Транскрипция сателлитной ДНК в эмбриогенезе человека:
 обзор литературы и собственные данные3

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Саженова Е.А., Никитина Т.В., Марков А.В., Скрябин Н.А., Васильев С.А., Толмачева Е.Н., Назаренко М.С., Лебедев И.Н.
 Индекс метилирования импринтированных генов *GRB10* и *GNAS*
 при нарушениях эмбрионального развития человека8

Марков А.В., Серебрякова В.В., Назаренко М.С., Голубенко М.В., Барбараш О.Л., Пузырев В.П.
 Оценка общего уровня метилирования ДНК
 по метилированию ретротранспозона LINE-1 при атеросклерозе у человека13

Спирина Л.В., Тарасенко Н.В., Горбунов А.К., Кондакова И.В., Слонимская Е.М., Усынин Е.А.
 Экспрессия молекулярных маркеров в ткани рака предстательной железы,
 связь с клинико-морфологическими особенностями заболелвания18

Слепухина А.А., Скрябин Н.А., Кашеварова А.А., Новикова М.А., Лифшиц Г.И., Лебедев И.Н.
 Arrau-CGH в диагностике геномных болезней у детей
 с врожденными пороками сердца и экстракардиальной патологией23

Слепцов А.А., Назаренко М.С., Скрябин Н.А., Казанцев А.Н., Барбараш О.Л., Пузырев В.П.
 Спектр структурных вариаций генома у больных с ишемической болезнью сердца30

Трифонова Е.А., Ганьжа О.А., Габидулина Т.В., Степанов В.А.
 Роль генов ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции в формировании структуры
 наследственной предрасположенности к привычному невынашиванию беременности34

Гончарова И.А., Тарасенко Н.В., Марков А.В., Назаренко М.С., Белобородова Е.В., Кондратьева Е.И., Пузырев В.П.
 Общность и специфичность генетической компоненты подверженности
 сахарному диабету первого типа и хроническому вирусному гепатиту С43

Савченко Р.Р., Кашеварова А.А., Скрябин Н.А., Жигалина Д.И., Лопаткина М.Е., Никитина Т.В., Васильев С.А., Лебедев И.Н.
 Анализ CNVs при анэмбрионии и неразвивающейся беременности49

КЛИНИЧЕСКИЕ СЛУЧАИ

Еремина Е.Р.
 Клинический случай редкой органической ацидурии55

ИНФОРМАЦИЯ

Правила оформления статей в журнале «Медицинская генетика»58

Editor-in-Chief
GINTER E.K.
Deputy Editors-in-chief
PUZYREV V.P.
BARANOV V.S.

Executive editor
IZHEVSKAYA V.L.

Editorial Board
ARCHAKOV A.I.
VOEVODA M.I.
DURNEV A.D.
IVANOV V.P.
ILLARIOSHKIN S.N.
KOZLOVA S.I.
KOPNIN B.P.
KUTZEV S.I.
KUCINSKAS V.
LIMBORSKAYA S.A.
MACEK M. Jr.
MIKHAYLOVA L.K.
NAZARENKO L.P.
NOVIKOV P.V.
NOSIKOV V.V.
ROGAEV E.I.
RUBTZOVA N.B.
SVERDLOV E.D.
SEREDENIN S.B.
SMIRNOV V.N.
STEPANOV V.A.
KHUSNUTDINOVA E.K.
CHEKHONIN V.P.
CHUCHALIN A.G.

Publisher: Irishkin Dmitry
E-mail: genius-media@mail.ru

Medical GENETICS

Monthly reviewed scientific and practical journal

2018. Volume 17. №3 (189)

Content

REVIEWS

Trofimova I.L., Enukashvily N.I., Kuznetzova T.V., Baranov V.S.
Transcription of satellite DNA in human embryogenesis: review of literature and own data3

ARTICLES

*Sazhenova E.A., Nikitina T.V., Markov A.V., Skryabin N.A.,
Vasilyev S.A., Tolmacheva E.N., Nazarenko M.S., Lebedev I.N.*
Methylation index of imprinted genes *GRB10* and *GNAS* in abnormal human embryo development8

*Markov A.V., Serebryakova V.V., Nazarenko M.S.,
Golubenko M.V., Barbarash O.L., Puzyrev V.P.*
Assessment of global DNA methylation in human atherosclerosis
using methylation of retrotransposable element LINE-113

*Spirina L.V., Tarasenko N.V., Gorbunov A.K.,
Kondakova I.V., Slonimskaya E.M., Usynin E.A.*
Molecular markers expression in prostate cancers:
association with clinical and morphological features of disease18

*Slepukhina A.A., Skryabin N.A., Kashevarova A.A.,
Novikova M.A., Lifshits G.I., Lebedev I.N.*
Array-CGH in diagnostics of genomic diseases
in children with congenital heart diseases and extracardiac pathology23

*Sleptsov A.A., Nazarenko M.S., Skryabin N.A.,
Kazantsev A.N., Barbarash O.L., Puzyrev V.P.*
Spectrum of structural variations in patients with coronary heart disease30

Trifonova E.A., Ganzha O.A., Gabidulina T.V., Stepanov V.A.
The role of angiogenesis and endothelial dysfunction genes
to recurrent miscarriage susceptibility34

*Goncharova I.A., Tarasenko N.V., Markov A.V., Nazarenko M.S.,
Beloborodova E.V., Kondratieva E.I., Puzyrev V.P.*
Similarity and specificity of the genetic predisposition
of the diabetes mellitus type 1 and chronic hepatitis C43

*Savchenko R.R., Kashevarova A.A., Skryabin N.A., Zhigalina D.I.,
Lopatkina M.E., Nikitina T.V., Vasilyev S.A., Lebedev I.N.*
Analysis of CNVs in anembryonic pregnancy and missed abortions49

CASE REPORT

Eremina E.R.
Clinical case of a rare organic aciduria55

INFORMATION

Guidelines for Authors58

Транскрипция сателлитной ДНК в эмбриогенезе человека: обзор литературы и собственные данные

Трофимова И.Л.^{1,2}, Енукашвили Н.И.³, Кузнецова Т.В.⁴, Баранов В.С.⁴

¹ ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург; il_trofimova@list.ru

² Международный центр репродуктивной медицины, г. Санкт-Петербург

³ ФГБУН Институт цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, natellae@gmail.com

⁴ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», г. Санкт-Петербург, tkuznetzova@mail.ru; baranov@vb2475.spb.edu

Сателлитная ДНК формирует протяженные области повторов внутри гетерохроматиновых районов хромосом, составляя значительную часть, так называемого, «некодирующего компонента» генома эукариот. Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что некодирующая РНК, транскрибируемая с последовательностей сателлитной ДНК, нить- и тканеспецифична, а её транскрипция зависит от типа клеток, стадии клеточного цикла или развития, клеточной дифференцировки, может быть индуцирована различными стрессовыми воздействиями и наблюдается при канцерогенезе. Особый интерес в связи с этим представляет изучение транскрипции сателлитной ДНК человека, РНК транскрипты которой, могут участвовать в процессах имплантации и раннего эмбрионального развития, а также в регуляции работы эмбрионального генома. В статье описывается общая характеристика сателлитной ДНК человека, приводятся данные литературы относительно транскрипционной активности сателлитных последовательностей ДНК, а также функций образующихся транскриптов. Приведены собственные данные относительно транскрипционной активности сателлита 3 хромосомы 1 в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях человека.

Ключевые слова: сателлитная ДНК, транскрипция, некодирующие РНК, эмбриональное развитие.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант 15-15-200026) и программой «Молекулярная и клеточная биология» РАН.

Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам ФГБНУ НИИАГиР им. Д.О. Отта Л.К. Цуладзе и Е.И. Русиной за предоставление материала для исследования, Вашуковой Е.С. за помощь в выделении РНК из образцов эмбриональных и экстраэмбриональных тканей. Горбуновой А.В. и Пономарцеву Н.В. за помощь в проведении экспериментов по ОТ-ПЦР.

Transcription of satellite DNA in human embryogenesis: review of literature and own data

Trofimova I.L.^{1,2}, Eukashvily N.I.³, Kuznetzova T.V.⁴, Baranov V.S.⁴

¹ Federal State Budgetary Institution V.A. Almazov Federal North-West Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg

² International centre of reproductive medicine, Saint-Petersburg

³ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg

⁴ Federal State Budgetary Scientific Institution «The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O.Ott», Saint-Petersburg

Satellite DNA forms large arrays within heterochromatic regions of chromosomes and constitutes an essential part of the «non-coding landscape» of eukaryotic genomes. Experimental data suggest that non-coding RNAs transcribed from satellite DNA, are strand- and tissue-specific, and its transcription depends on the cell type, cell cycle, cell differentiation and stage of development. It can be induced by various stress effect and cancerogenesis. Transcripts of satellite DNA which can be associated with the processes of implantation and regulation of the embryonic genome during early human development are of interest. The article covers general organization of the human satellite DNA, literature data on transcription of the satellite DNA and function of synthesized transcripts. Our own data on the transcriptional activity of satellite 3 of the chromosome 1 in the embryonic and extraembryonic human tissues are included.

Key words: satellite DNA, transcription, non-coding RNA, embryonic development.

Введение

Сателлитная ДНК (сатДНК) представляет собой тандемно организованные высокоповторяющиеся последовательности молекулы ДНК и является основным компонентом конститутивного гетерохроматина [1, 2]. Впервые сатДНК была выделена методом центрифугирования в градиентах плотности солей цезия в виде дополнительной, «сателлитной», фракции геномной ДНК

[3]. У человека сатДНК располагается преимущественно в центромерных и прицентромерных районах хромосом [1, 2, 4] и образована несколькими классами тандемных повторов с различным нуклеотидным составом, а также длиной составляющих их мономеров [4]. Длина мономеров сатДНК, как правило, колеблется от 150—180 п.н. до 300—360 п.н., мономеры формируют в геноме протяженные массивы из сотен или тысяч копий [3, 4]. Одна-

ко, встречаются и исключения, как сателлиты 1—3 класса, с гораздо меньшей длиной мономеров [4, 5].

Наиболее хорошо охарактеризованной является фракция α -сатДНК центромерных районов хромосом, которая составляет до 10% в геноме человека [6]. Основной единицей центромерной сатДНК является АТ богатая повторяющаяся последовательность длиной 171 п.н. [5, 7, 8], называемая также мономерной формой α -сатДНК [9]. АТ богатые мономеры α -сатДНК характеризуются образованием массивов высшего порядка, так называемых higher order repeat, или HORs [3, 5, 7, 8]. За исключением трех негомологичных пар хромосом (13/21, 14/22 и 5/19), для которых характерны очень схожие по организации HORs, массивы высшего порядка являются хромосом-специфичными, что позволяет использовать их в качестве маркеров каждой хромосомы [10, 11]. Для HORs характерны полиморфные варианты, которые определяются как общей длиной HOR, так и вариабельностью последовательности нуклеотидов внутри одного HOR — наличием однонуклеотидных замен [8]. Так, хромосома 17 человека — хороший пример полиморфизма HOR внутри центромерного массива [6, 8].

Следует отметить, что идентичность центромеры определяется не только нуклеотидным составом, но и эпигенетическими модификациями хроматина, а также рядом белков, связанных с образованием кинетохора [3, 12]. Так, например, конститутивными белками центромерных районов хромосом человека являются вариант гистона H3 CENP-A, а также белки CENP-B и CENP-C [9, 12, 13]. Помимо этого, в районе центромер выделяют более двух десятков других белков, ассоциированных с α -сатДНК и другими центромер-локализованными последовательностями непостоянно в течение клеточного цикла, и принимающих участие в различных процессах, таких, как когезия сестринских хроматид, сборка веретена деления и т.д. [9, 14].

Прицентромерные районы хромосом (ПЦРХ) образованы главным образом сатДНК 1, 2 и 3 классов, называемых также классическими сателлитами, а также β - и γ -сатДНК [15]. Классические сателлиты человека имеют различную обогащенность АТ- и СG-парами оснований: сателлиты первого класса (human satellite 1-HSAT 1) обогащены АТ-парами, второго (HSAT 2) и третьего (HSAT 3) классов содержат как АТ-, так и СG-пары. HSAT 2 и HSAT 3 состоят из пентамеров с последовательностью нуклеотидов GAATG_n или CATTC_n [5, 16], 5—15% которых на хромосоме 9 содержат CpG последовательности [17]. Для HSAT 1 и HSAT 2 характерно наличие субсемейств [16].

Сателлитные повторы специфично распределены по хромосомам. HSAT 1 представлен в ПЦРХ хромосом 3 и 4, а также хромосом групп D и G [18, 19]. HSAT 2 локализуется на хромосомах 2, 5, 7, 10, 17, а также на всех акроцентрических хромосомах, включая и Y, хотя и в меньшем количестве, чем в ПЦРХ хромосом 1 и 16,

где он образует блоки протяженностью примерно 5—6 млн п.н.н. [5, 20, 21]. HSAT 3 локализуется на хромосомах 1, 5, 10, 17 и 20 [19]. Распределение β - и γ -сатДНК также хромосомспецифично. Так, β -сателлит локализуется в ПЦРХ хромосом 3 и 9 и в длинном плече Y-хромосомы [22]; γ -сателлит — в центромерном районе хромосомы 8 и ПЦРХ половых хромосом [23, 24]. Район Yqh также содержит HSAT 1 и HSAT 3 [18, 19].

СатДНК принимает участие во многих клеточных процессах, таких как сегрегация и расхождение гомологичных хромосом во время деления [9], поддержание трехмерной пространственной архитектуры ядра [25], а также обеспечение структурной целостности генома за счет предотвращения незаконной рекомбинации между диспергированными повторяющимися элементами ДНК [26].

Транскрипционная активность сатДНК в эмбриогенезе человека

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 [27]. Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные свидетельствуют о том, что некодирующая РНК (нкРНК), транскрибируемая с последовательностей сатДНК, нить- и тканеспецифична, а её транскрипция зависит от типа клеток, стадии клеточного цикла или эмбрионального развития, клеточной дифференцировки. Ее можно индуцировать различными стрессовыми воздействиями и обнаружить при канцерогенезе [1, 2, 20, 28].

Особенно значительные и вариабельные по размерам блоки сатДНК в геноме человека локализованы в ПЦРХ хромосом 1, 9 и 16, а также в дистальном отделе длинного плеча Y-хромосомы. Этим областям издавна отводится особая роль в нарушениях репродукции у человека, и обсуждается участие этих районов в нормальном и патологическом эмбриогенезе человека [29—31]. В связи с этим, особый интерес представляет изучение транскрипции сатДНК, РНК-транскрипты которых могут участвовать в процессах имплантации и раннего эмбрионального развития, а также в регуляции работы эмбрионального генома.

Так, в частности, небольшой, по сравнению с малигнизированными клетками, уровень транскрипции HSAT 3 хромосомы 1 (HSAT 3-1) обнаружен в клетках зрелой плаценты [32]. По-видимому, низкий уровень транскриптов HSAT 3-1 связан с высокой конденсацией гетерохроматиновых районов и высоким уровнем метилирования ДНК ПЦРХ в клетках зрелой плаценты [32]. АТ-богатые транскрипты (считываются со смысловой цепи) α -сатДНК центромерного района хромосомы 7, и СG-богатые (антисмысловые) хромосомы 10 были обна-

ружены в эмбриональном яичнике и печени, а также в плаценте [33]. Специфические транскрипты HSAT 3 Y-хромосомы человека обнаружены в семенниках, как в эмбриогенезе, так и в постнатальном периоде [33, 34]. Транскрипты теломерных районов хромосом, также образованных массивом tandemно-повторяющейся ДНК, но относящиеся по классификации к отдельному классу tandemных повторов [4], обнаружены в клетках яичника плодов на стадии профазы I в женском гаметогенезе [35].

В нашем исследовании [36] методом ОТ-ПЦР (ПЦР с использованием обратной транскриптазы) проанализирована транскрипционная активность HSAT 3-1, который образует один из крупных хромосомспецифичных массивов сатДНК в геноме человека. Были проанализированы образцы ворсинчатого хориона и органов от 14 эмбрионов с нормальным кариотипом, полученных в результате прерывания беременности в срок развития 6—14 недель беременности (н.б.), а также плацент после родоразрешения (36—38 недель).

Транскрибируемая со смысловой цепи (АТ-богатой цепи сатДНК) нкРНК HSAT 3-1 была выявлена в тканях ворсинчатого хориона, начиная с наиболее ранней из проанализированных стадий — 6 н.б. и детектировалась вплоть до 10/11 н.б. (таблица). В образцах хориона после 14 н.б. были обнаружены антисмысловые транскрипты HSAT 3-1. В образцах плацент нкРНК HSAT 3-1 не обнаружилась, что не согласуется с данными других исследований [32] и может быть обусловлено как лучшей сохранностью РНК в образцах, так и внутри- и межиндивидуальной вариабельностью транскрипционной активности HSAT 3-1 в клетках зрелой плаценты.

В эмбриональных органах транскрипция сатДНК, по-видимому, начинается немного позднее. Так, в продолговатом мозге развивающегося эмбриона АТ-богатые транскрипты HSAT 3-1 выявляются в 7 н.б., в сердце, надпочечниках и печени — на 8/9 н.б. (таблица). В почках транскрипты выявлялись в 10/11 н.б. В сердце и почках обнаружена нкРНК HSAT 3-1, транскрибируе-

мая только с антисмысловой цепи. Напротив, на 9—10 н.б. АТ-богатая (смысловая) нкРНК HSAT 3-1 выявляется в легких и кишечнике. С антисмысловой цепи транскрипция проходила и на более поздних сроках (до 14 н.б.) в образцах кишечника, продолговатого мозга, легкого (таблица). Таким образом, предположительно в 9—10 н.б. у эмбриона человека происходит переключение транскрипции HSAT 3-1 со смысловой цепи на антисмысловую.

Обнаружено несколько вариантов транскриптов HSAT3-1, наиболее частые из которых имеют длину около 250 и 600 п.н. Короткие транскрипты длиной около 100 п.н. обнаружены в сердце. Все выявленные транскрипты HSAT 3-1 полиаденилированы.

Таким образом, транскрипционная активность HSAT 3-1 в эмбриогенезе человека, обнаруживает выраженный стадио-, ткане- и нить- специфичный характер.

Роль транскриптов сателлитной ДНК в эмбриогенезе человека

Современный анализ путём полногеномного секвенирования показал, что значительная часть транскриптомов у различных организмов представлена нкРНК. Так, например, при анализе транскриптома клеток человека на до- и постимплантационных стадиях развития выявлено более 400 длинных нкРНК, которые вовлечены в созревание и деление половых клеток, активацию генома зародыша и регуляцию работы митохондриального генома [37]. В исследовании транскриптома при органогенезе у эмбрионов человека, было показано, что более 90% всех транскриптов представлены длинными нкРНК [38]. Показано, что нкРНК, принимают активное участие во многих процессах, происходящих в течение эмбрионального развития, в том числе и человека, включая созревание половых клеток, гастрюляцию, инактивацию X хромосомы, половую и клеточную дифференцировку [39, 40].

Таблица

Транскрипция HSAT3-1 в клетках различных тканей в первом и во втором триместрах беременности

Ткань / срок беременности	6 н.б.	7 н.б.	8/9 н.б.	10/11 н.б.	11/12 н.б.	14/15 н.б.
Хорион	+ (S)	+ (S)	+/- (S)	+ (S)	—	+ (AS)
Кишечник	н/а		+ (S)	н/а	—	+ (AS)
Продолговатый мозг	н/а	+ (S)	+ (S)	н/а	+ (AS)	+ (AS)
Сердце	н/а	н/а	+ (AS)	+ (AS)	+/- (AS)	+ (AS)
Легкое	н/а	н/а	+ (S)	+ (S)	—	+ (AS)
Почки	н/а	—		+ (AS)	—	н/а
Надпочечник	н/а	н/а	+/- (S)	+ (S)	н/а	н/а
Печень	н/а	н/а	+ (S)	н/а	н/а	н/а

Примечание. Символом «+» отмечено наличие транскриптов; «—» — отсутствие. Символ «+/-» означает, что в части проанализированных образцов транскрипты были детектированы, а в части — нет. В скобках символами «S» и «AS» обозначены транскрипты смысловой и антисмысловой цепи ДНК соответственно («смысловые» — по аналогии с кодирующими участками). Символ «н/а» означает, что ткань не была проанализирована на данном сроке.

Что же касается функций транскриптов сатДНК у человека, то такие работы практически отсутствуют. Предполагают, что нкРНК HSAT 3 Y-хромосомы человека, подвергается транс-сплайсингу и образует изоформную форму с мРНК CDC2L2, и в такой конфигурации частично связывается с циклинами и каспазами, участвуя, по-видимому, в регуляции клеточного цикла и апоптоза в семенниках [34]. Показано, что TERRA РНК (транскрипт теломерного tandemного повтора) остается ассоциированной с каталитической субъединицей теломеразы во время профазы I мейотического деления у плодов женского пола [35]. Интересно, что подобный процесс происходит и постнатально при созревании мужских гамет [41]. Образование такого комплекса способствует стабилизации теломерных районов хромосом во время гаметогенеза, и правильному расхождению хромосом во время деления [35, 41].

В настоящее время высказана гипотеза о локализации в перцентромерном гетерохроматине так называемых «специфических генерационных ключей развития» — последовательностей ДНК, представляющих комплекс ретровирусных элементов и фрагментов кДНК первичных транскриптов геномных генов. РНК-транскрипты, считываясь с этих последовательностей, регулируют функции клеточного генома, определяют включение/выключение различных клеточных программ в ходе эмбрионального развития [42]. Нарушения транскрипции таких гипотетических «ключей развития» могут пагубно отражаться на функциях генома и проявляться в виде тех или иных синдромов, остановке развития и даже гибели. Так, данные клинической генетики указывают на то, что причиной ряда синдромов и наследственных болезней могут быть мутации, затрагивающие ПЦРХ и области повторяющихся последовательностей ДНК. В частности, к таким болезням можно отнести синдромы Townes-Brocks (16q12.1), ICF (1q12), ДиДжорджа (22q11.2), Прадера-Вилли и Ангельмана (15q11-15q13), микроделеции (16p11.2-16p12.12.2) [43]. Однако остается невыясненным, насколько реальны гипотетические ключи развития, входят ли в их состав транскрипты сатДНК и какова их возможная функция на разных этапах переключения клеточных программ.

Между тем, роль транскриптов повторяющихся последовательностей ДНК, и, в частности, ретротранспозонов в регуляции транскрипции генов домашнего хозяйства показана для доимплантационных зародышей мыши [44]. Также установлено, что на стадии формирования хромосом (2-4 клеточная стадия у мыши) необходима нить-специфичная транскрипция мажорного сателлита, при инактивации данной транскрипции происходит нарушение организации ядра и гибель эмбриона [45, 46]. В наших исследованиях показана ткане-, стадио- и нить-специфичная транскрипция HSAT 3-1 в эмбриогенезе человека [36]. Однако, цитологическое подтверждение транскриптов HSAT 3-1, изучение их распределения в клетке и в ходе клеточного цикла, взаи-

мосвязь с внутриядерными и внутриклеточными белками, а также подтверждение функциональной значимости требуют дальнейших исследований.

Список литературы

1. Erukashvily NI, Ponomartsev NV. Mammalian satellite DNA: a speaking dumb. In: Donev R, eds. Organisation of chromosomes. Adv Protein Chem Struct Biol 90 Academic Press. 2013;31-65.
2. Biscotti MA, Canapa A, Forconi M, et al. Transcription of tandemly repetitive DNA: functional roles. Chromosome Res. 2015 Sep;23:463-477.
3. Plohl M, Luchetti A, Mestrovic N, Mantovani B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. Gene. 2008 Feb 15;409:72-82.
4. Lopez-Flores I, Garrido-Ramos MA. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. In: Garrido-Ramos MA (ed) Genome dynamics. Karger, Basel. 2012;1-28.
5. Warburton PE, Hasson D, Guillem F, et al. Analysis of the largest tandemly repeated DNA families in the human genome. BMC Genomics. 2008 Nov 7;9(533):1-18.
6. Sullivan LL, Chew K, Sullivan BA. α satellite DNA variation and function of the human centromere. Nucleus. 2017 Apr 13;1-9.
7. Хемлебен В, Беридзе ТГ, Бахман Л, и др. Сателлитные ДНК. Успехи биологической химии. 2003;43:267-306.
8. Aldrup-MacDonald ME, Sullivan BA. The past, present, and future of human centromere genomics. Genes (Basel). 2014 Jan 24;5(1):33-50.
9. Schueler MG, Sullivan BA. Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2006;7:301-313.
10. Wayne JS, Willard HF. Nucleotide sequence heterogeneity of alpha satellite repetitive DNA: a survey of alphoid sequences from different human chromosomes. Nucleic Acids Res. 1987 Sep 25;15(18):7549-69.
11. Shepelev VA, Uralsky LI, Alexandrov AA, et al. Annotation of suprachromosomal families reveals uncommon types of alpha satellite organization in pericentromeric regions of hg38 human genome assembly. Genom Data. 2015 Sep 1;5:139-146.
12. Lam AL, Boivin CD, Bonney CF, et al. Human centromeric chromatin is a dynamic chromosomal domain that can spread over noncentromeric DNA. Proc Natl Acad Sci USA. 2006 Mar 14;103(11):4186-4191.
13. Muller S, Almouzni G. Chromatin dynamics during the cell cycle at centromeres. Nat Rev Genet. 2017 Mar;18(3):192-208.
14. Saffery R, Irvine DV, Griffiths B, et al. Human centromeres and neocentromeres show identical distribution patterns of >20 functionally important kinetochore-associated proteins. Hum Mol Genet. 2000 Jan 22;9(2):175-185.
15. Lee C, Wevrick R, Fisher RB, et al. Human centromeric DNAs. Hum. Genet. 1997 Sep;100(3-4):291-304.
16. Altemose N, Miga KH, Maggioni M, Willard HF. Genomic characterization of large heterochromatic gaps in the human genome assembly. PLoS Comput Biol. 2014 May 15;10(5):e1003628.
17. Jeanpierre M. Human satellites 2 and 3. Ann Genet. 1994;37(4):163-171.
18. Mattei MG, Luciani J. Heterochromatin, from chromosome to protein. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2003;7(2):135-143.
19. Vourc'h C, Biamonti G. Transcription of satellite DNAs in mammals. In: Ugarkovic D. (ed) Long non-coding RNAs, progress

in molecular and subcellular biology. Springer-Verlag, New York. 2011;95-118.

20. Bersani F, Lee E, Kharchenko PV, et al. Pericentromeric satellite repeat expansions through RNA-derived DNA intermediates in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Dec 8;112(49):15148-1553.

21. Hall LL, Byron M, Carone DM. Demethylated HSATII DNA and HSATII RNA foci sequester PRC1 and MeCP2 into cancer-specific nuclear bodies. *Cell Rep*. 2017 Mar 21;18(12):2943-2956.

22. Meneveri R, Agresti A, Marozzi A, Saccone S. Molecular organization and chromosomal location of human GC-rich heterochromatic blocks. *Gene*. 1993 Jan 30;123(2):227-234.

23. Lee C, Li X, Jabs EW, et al. Human gamma X satellite DNA: an X chromosome specific centromeric DNA sequence. *Chromosoma*. 1995 Nov;104(2):103-112.

24. Lee C, Critcher R, Zhang J-G, et al. Distribution of gamma satellite DNA on the human X and Y chromosomes suggests that it is not required for mitotic centromere function. *Chromosoma*. 2000 Sep;109(6):381-389.

25. Усов KE, Вассерлауф ИЭ, Стегний ВН. Молекулярно-цитогенетический анализ прицентромерного гетерохроматина хромосом трофоцитов яичников у видов подгруппы *Drosophila melanogaster*. *Цитология*. 2008;50(12):1044-1049.

26. Hall IM, Grewal SI. A guide to gene silencing. In Hanon GJ, ed. Cold Spring Harbor Press. 2003;205-232.

27. Trofimova I, Krasikova A. Transcription of highly repetitive tandemly organized DNA in amphibians and birds: a historical overview and modern concepts. *RNA Biol*. 2016 Dec;13(12):1246-1257.

28. Saksouk N, Simboeck E, Dejardin J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin*. 2015 Jan 15;8:13.

29. Прокофьева-Бельговская АА. Гетерохроматиновые районы хромосом. *Наука*. 1986;432с.

30. Подугольникова ОА, Солониченко ВГ. Цитогенетическое исследование функций варибельных районов С-гетерохроматина у человека. Влияние С-гетерохроматина на экспрессию генов. *Цитология* 1994;36(11):1035-1040.

31. Баранов ВС, Кузнецова ТВ. Цитогенетика эмбрионального развития человека. СПб.:Изд-во Н-Л. 2007;439с.

32. Erukashvily NI, Donev R, Waisertreiger IS, Podgornaya OI. Human chromosome 1 satellite 3 DNA is decondensed, demethylated and transcribed in senescent cells and in A431 epithelial carcinoma cells. *Cytogenet Genome Res*. 2007;118(1):42-54.

33. Eymery A, Horard B, Atifi-Borel M, et al. A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res*. 2009 Oct;37(19):6340-6354.

34. Jehan Z, Vallinayagam S, Tiwari S, et al. Novel noncoding RNA from human Y distal heterochromatic block (Yq12) generates testis specific chimeric CDC2L2. *Genome Res*. 2007 Apr;17(4):433-440.

35. Reig-Viader R, Brieno-Enríquez MA, Khouriauli L, et al. Telomeric repeat-containing RNA and telomerase in human fetal oocytes. *Hum Reprod*. 2013; 28(2):414-422.

36. Кузнецова ТВ, Енукашвили НИ, Трофимова ИЛ, и др. Локализация и транскрипция прицентромерного гетерохроматина хромосомы 1 в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях человека. *Медицинская генетика*. 2012;11(4)(118):19-24.

37. Qiu J-j, Ren Z-r, Yan J-b. Identification and functional analysis of long non-coding RNAs in human and mouse early embryos based on single-cell transcriptome data. *Oncotarget*. 2016 Sep 20;7(38):61215-61228.

38. Gerrard DT, Berry AA, Jennings RE, et al. An integrative transcriptomic atlas of organogenesis in human embryos. *Elife*. 2016 Aug 24;5.pii:e15657.

39. Pauli A, Rinn JL, Schier AF. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. *Nat Rev Genet*. 2011 Feb;12(2):136-149.

40. Garcia-Lopez J, Alonso L, Cardenas DB. Diversity and functional convergence of small noncoding RNAs in male germ cell differentiation and fertilization. *RNA*. 2015 May;21(5):946-962.

41. Reig-Viader R, Vila-Cejudo M, Vitelli V, et al. Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) and telomerase are components of telomeres during mammalian gametogenesis. *Biol Reprod*. 2014 May;90(5-103):1-13.

42. Parris GE. A hypothetical Master Development Program for multi-cellular organisms: Ontogeny and phylogeny. *Biosci Hypotheses*. 2009;2:3-12.

43. Parris GE. Developmental diseases and the hypothetical Master Development Program. *Medical Hypotheses*. 2010;74:564-573.

44. Peaston AE, Evsikov AV, Graber JH, et al. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell*. 2004 Oct;7(4):597-606.

45. Probst AV, Okamoto I, Casanova M, et al. A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromosome formation and early mouse development. *Dev Cell*. 2010 Oct 19;19(4):625-38.

46. Probst AV, Almouzni G. Heterochromatin establishment in the context of genome-wide epigenetic reprogramming. *Trends in Genetics*. 2011 May;27(5):177-185.

Индекс метилирования импринтированных генов *GRB10* и *GNAS* при нарушениях эмбрионального развития человека

Саженова Е.А.¹, Никитина Т.В.¹, Марков А.В.¹, Скрябин Н.А.¹,
Васильев С.А.¹, Толмачева Е.Н.¹, Назаренко М.С.^{1,2}, Лебедев И.Н.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, 634050, e-mail: elena.sazhenova@mail.ru

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, 634050

В настоящем исследовании в группе спонтанных абортусов I триместра беременности с нормальным кариотипом проведён анализ индекса метилирования импринтированных генов *GNAS* (*NESP55*) и *GRB10*. Исследование выполнено с использованием образцов экстраэмбриональной мезодермы 47 спонтанных абортусов и 45 индуцированных абортусов, составивших контрольную группу. Показано статистически значимое увеличение индекса метилирования импринтированного гена *NESP55* и снижение индекса метилирования гена *GRB10* у спонтанных абортусов. Исходя из функции исследуемых импринтированных генов можно предположить, что увеличение индекса метилирования гена *NESP55* и его снижение в *GRB10* могли усиливать подавление роста эмбриона и привести к остановке его развития.

Ключевые слова: геномный импринтинг, *GRB10*, *NESP55*, индекс метилирования, невынашивание беременности, спонтанные абортусы, эпимутации.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФАНО РФ по теме «Эпигенетический компонент соматической вариабельности генома при патологии ранних этапов онтогенеза человека» (№ госрегистрации: 0550-2014-0302) на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ) с использованием материалов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Methylation index of imprinted genes *GRB10* and *GNAS* in abnormal human embryo development

Sazhenova E.A.^{1*}, Nikitina T.V.¹, Markov A.V.¹, Skryabin N.A.¹,
Vasilyev S.A.¹, Tolmacheva E.N.¹, Nazarenko M.S.^{1,2}, Lebedev I.N.^{1,2}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050, Russia, *e-mail: elena.sazhenova@mail.ru

² Siberian State Medical University, Tomsk, 634050, Russia

Present study analyzes the methylation index of the imprinted genes *GNAS* (*NESP55*) and *GRB10* in the group of first trimester spontaneous abortions with normal karyotype. The DNA samples derived from extraembryonic mesoderm of 47 spontaneous abortions and 45 induced abortions were examined. A significant increase in the methylation index of the imprinted gene *NESP55* and a decrease in *GRB10* in the spontaneous abortions were observed. Based on the function of this imprinted genes, it can be assumed that an increase in the methylation index of the *NESP55* gene and its decrease in *GRB10* could enhance the suppression of embryo growth and lead to a possible disturbance of embryo development.

Keywords: genomic imprinting, *GRB10*, *NESP55*, methylation index, pregnancy loss, spontaneous abortion, epimutations.

Введение

Невынашивание беременности — одна из актуальных проблем современного акушерства, которая, по некоторым оценкам, охватывает примерно 25% супружеских пар репродуктивного возраста, при этом в структуре самопроизвольного прерывания неуклонно растёт доля неразвивающейся беременности первого триместра [1]. Показано, что в 40–50% случаев причины спонтанного аборта у женщин (анатомические, иммунологические, гормональные, цитогенетические нарушения и инфекционные заболевания) не обнаруживаются.

Репродукцию человека контролируют как генетические механизмы, так и эпигенетические факторы регуляции генов, одним из которых является геномный импринтинг — особый вид регуляции активности генов в зависимости от пола их передавшего. Геномный импринтинг играет ключевую роль в обеспечении нормального эмбрионального развития и может оказывать влияние на степень экспрессии генов, контролирующих рост эмбриона, процессы пролиферации и дифференцировки клеток и другие процессы внутриутробного развития плода [2]. Меха-

низмы импринтинга преимущественно связаны с дифференциальным метилированием промоторных регионов импринтированных генов и регуляторных последовательностей (центров импринтинга), устанавливаемым строго специфичным образом в гаметогенезе и поддерживаемым в соматических клетках на протяжении всего онтогенеза [3].

Нарушение дифференциального метилирования импринтированных генов приводит к эпимутациям, которые могут быть представлены как aberrантным гиперметилированием экспрессируемого аллеля, так и, напротив, гипометилированием инактивированного аллеля. В первом случае происходит полная потеря продукта импринтированного гена в клетке, тогда как во втором — наблюдается увеличение дозы гена вследствие установления его биаллельной экспрессии [4].

Ранее нами был проведен широкогеномный анализ статуса метилирования импринтированных локусов при нарушении эмбрионального развития человека с использованием милочипа «GoldenGate Cancer Panel I» (Illumina). В результате установлены спектр и частота эпимутаций импринтированных генов и их вклад в нарушение ранних этапов онтогенеза, определены импринтированные гены, затронутые множественными эпимутациями. Это гены *DLK1*, *PEG10*, *PLAGL1*, *KCNQ1OT1*, *PEG3*, *GRB10*, *PEG1/MEST*, *PHLDA2*, *WT1*, *ZNF215*, *HTR2A*, *INS*, *H19*, *TRPM5*, *GNAS*, *SNURF-SNRPN*, *GRB10*, *ATP10A* и *CPA4* [5]. Репликативное исследование статуса метилирования 7 импринтированных генов (*DLK1*, *PEG10*, *PLAGL1*, *KCNQ1OT1*, *PEG3*, *GRB10* и *PEG1/MEST*) в расширенных выборках эмбрионов подтвердило результаты микрочипового анализа [6]. Эпимутации в генах *GNAS* и *GRB10* были идентифицированы как в широкогеномном исследовании с использованием милочипа, так и на расширенной выборке (в отношении гена *GRB10*).

Ген *GRB10* (OMIM: 601523) расположен на хромосоме 7 в регионе p12.2. Продукт гена принадлежит к адаптерным белкам, которые взаимодействуют с рядом рецепторов тирозинкиназ и сигнальных молекул, с рецепторами инсулина и инсулиноподобного фактора роста. Избыточная экспрессия некоторых изоформ кодируемого белка ингибирует активность тирозинкиназы и, таким образом, подавляет рост клеток.

Ген *GNAS* (OMIM: 139320, 20q13.3) — сложный locus с точки зрения эпигенетической регуляции, который кодирует один биаллельный (*Gsα*) и четыре моноаллельных (*NESP55*, *GNAS-AS1*, *XLsα* и *A/B*) транскрипта. С отцовского аллеля экспрессируется исключительно *XLAS*, с материнского — *NESP55*, в то время как биаллельно экспрессируется *Gsα*. Промоторы данных транскриптов разделены 11 т.п.н.. В зависимости от ткани осуществляется либо биаллельная, либо моноаллельная экспрессия. Так, например, в большинстве тканей транскрибируются оба аллеля с образованием *Gsα*.

В нейроэндокринных тканях головного и спинного мозга, сердце, почках, легких, мышцах экспрессируется материнский аллель локуса *GNAS*, продуктом которого является *NESP55* [7]. Промотор *NESP55* имеет специфический дифференциально метилированный регион (ДМР), который подвергается метилированию на отцовском аллеле, поэтому экспрессия идет только с материнской хромосомы. *NESP55* участвует в регуляции процессов метилирования ДМР *GNAS*, что влияет на экспрессию данного локуса [8].

Цель настоящего исследования — анализ индекса метилирования одного из импринтированных локусов гена *GNAS* (*NESP55*) и *GRB10* в выборке спонтанных абортусов (СА) I триместра беременности с нормальным кариотипом.

Экспериментальная часть

Проведение настоящего исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИМГ ТНИМЦ (протокол №2 от 22 апреля 2010 г.). От всех супружеских пар было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Работа проведена с использованием образцов внезародышевой (экстраэмбриональной) мезодермы 47 СА I триместра с нормальным кариотипом. В качестве контроля исследована внезародышевая мезодерма 45 медицинских абортусов (МА) I триместра беременности. Внезародышевая мезодерма является производной эпибласта, дающего начало наружному зародышевому листку, поэтому данная ткань ближе по происхождению к эмбриональным структурам, чем другие плацентарные ткани. Продолжительность внутриутробного периода развития определялась по дате последней менструации и составила для СА — $7,64 \pm 1,24$ недель и для МА — $7,69 \pm 1,27$ недель, и статистически значимо не различалась ($p = 0,8$).

Цитогенетический анализ проводили путём культивирования внезародышевой мезодермы с последующим стандартным кариотипированием метафазных хромосом. Для образцов, не пролиферирующих в культуре, использовали сравнительную геномную гибридизацию (CGH) для установления кариотипа эмбриона с последующей флуоресцентной *in situ* гибридизацией (FISH) для исключения полиплоидии.

Геномную ДНК выделяли из некультивированных клеток внезародышевой мезодермы после стандартной обработки протеиназой К при 37°C и экстракции фенол/хлороформом. Для бисульфитной конверсии ДНК использовали набор EZ DNA methylation Direct Kit («Zymo Research», США), согласно протоколу производителя.

Индекс метилирования определяли путем пиросеквенирования пяти CpG-динуклеотидов для гена *NESP55* и восьми для *GRB10*, расположенных в ДМР, на пиросеквенаторе PyroMark Q24 («Qiagen», Германия).

Значение индекса метилирования гена *NESP55* в группах индуцированных и спонтанных абортусов

CpG-динуклеотиды	Индекс метилирования, МА			Индекс метилирования, СА			p
	Значение			Значение			
	Мин.	Макс.	Среднее	Мин.	Макс.	Среднее	
CpG1	29,6	66,5	43,5 ± 8,3	36,2	75,3	49,9 ± 7,1	<0,01
CpG2	29,5	65,5	43,2 ± 8,6	35,8	79,8	50,0 ± 8,1	<0,01
CpG3	29,9	62,1	41,7 ± 7,7	39,9	76,4	49,7 ± 7,6	<0,01
CpG4	29,4	64,6	43,0 ± 8,3	35,7	84,4	49,5 ± 8,0	<0,01
CpG5	26,6	70,9	42,3 ± 11,3	32,7	73,5	47,7 ± 9,8	<0,05
CpGср	29,3	65,1	42,7 ± 9,6	37,7	77,9	49,4 ± 7,8	<0,01

Примечание. Мин. — минимальное значение индекса метилирования, Макс. — максимальное значение индекса метилирования, CpGср — среднее значение индекса метилирования по пяти CpG.

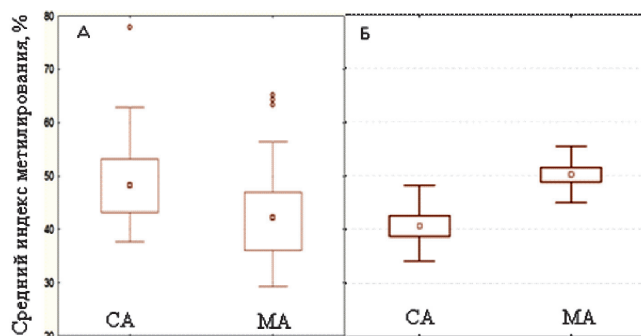
Последовательность праймеров для гена *NESP55*: биотин-5'-AGAGTTTATAGGGAAGGGGAGGA-3' (прямой), 5'-АСТААССТАААТССАТАААААСААА-3' (обратный), 5'-GTTGTAAGTTAAAGAAGTT-3' (секвенирующий праймер).

Последовательность праймеров для гена *GRB10*: 5'-AAGATТАААААТGGTTATATAАТАТТGTTTТATGGTTGG-3' (прямой), 5'-CCCCCCCTCTCCAAАТАCTCAAAT-3'- биотин (обратный), 5'-GGTAGGGGTTTTGTAGTT-3' (секвенирующий праймер).

Индекс метилирования определяли как отношение метилированного цитозина к сумме метилированных и неметилированных цитозинов с использованием пакета программ PyMeth Q24. Сравнение уровней метилирования в группах исследования проводилось с использованием t-критерия Стьюдента и анализа главных компонент в программе «Statistica».

Результаты

Индекс метилирования был определен в пяти CpG-динуклеотидах гена *NESP55* и в восьми CpG-сайтах



Распределение индексов метилирования локуса *NESP55* (А) и *GRB10* (Б) в группах спонтанных (СА) и медицинских (МА) абортусов.

гена *GRB10* внутри групп МА и СА (табл. 1, 2). Для гена *NESP55* в контрольной выборке минимальный и максимальный индекс метилирования составил 26,6% и 70,9%, и был обнаружен в пятом CpG. Среди СА данные показатели составили 32,7% в пятом CpG и 84,4% в четвертом CpG соответственно. Сравнение среднего показателя индекса метилирования CpG в анализируемых группах показало, что в контрольной группе его минимальное значение соответствовало 41,7 ± 7,7% в третьем CpG, максимальное 43,5 ± 8,3% в первом, со средним значением по всем CpG сайтам — 42,7 ± 9,6%. Для группы СА данные показатели находились в пределах 47,7 ± 9,8% в пятом CpG и 50,0 ± 8,1% во втором CpG, со средним значением — 49,4 ± 7,8% соответственно (табл. 1).

В целом, анализ индекса метилирования гена *NESP55* показал его статистически значимое увеличение в группе СА как по отдельным анализируемым CpG-сайтам, так и в целом по пяти CpG динуклеотидам (p<0,05, табл. 1, рисунок). Увеличение индекса метилирования может приводить к снижению экспрессии гена, а значит к уменьшению количества продуцируемого белка.

Индекс метилирования гена *GRB10* в контрольной группе варьировал в пределах от 29,5% в четвертом CpG до 71,0% в пятом CpG. В выборке СА минимальное значение этого показателя соответствовало 20,0% в четвертом, максимальное — 59,5% в восьмом CpG. Среднее значение индекса метилирования в контрольной группе находилось в пределах от 49,3 ± 9,2% в третьем CpG до 51,3 ± 6,1% в первом CpG, со средним показателем по всем CpG 50,2 ± 4,4%. В выборке СА данные значения составили 37,9 ± 7,7% в первом CpG, 41,8 ± 7,6% во втором, со средним уровнем в этой группе 40,6 ± 6,5% соответственно (табл. 2, рисунок). В целом индекс метилирования у СА по сравнению с МА для *GRB10* был статистически значимо ниже как по отдельным CpG, так и в среднем по группам (p<0,01). Снижение индекса метилирования гена *GRB10* могло привести к увеличению экспрессии данного гена, а значит к увеличению количества белка.

Значение индекса метилирования гена *GRB10* в группах индуцированных и спонтанных абортусов

СрG-динуклеотиды	Индекс метилирования, МА			Индекс метилирования, СА			p
	Значение			Значение			
	Мин.	Макс.	Среднее	Мин.	Макс.	Среднее	
СрG1	42,0	64,5	51,3 ± 6,1	21,9	49,3	37,9 ± 7,7	<0,01
СрG2	42,7	64,9	49,8 ± 5,2	29,2	55,0	41,8 ± 7,6	<0,01
СрG3	42,1	60,6	49,3 ± 9,2	27,2	54,3	41,7 ± 8,1	<0,01
СрG4	29,5	65,4	49,5 ± 6,9	20,0	55,5	41,1 ± 9,1	<0,01
СрG5	38,9	71,0	50,5 ± 6,5	25,8	58,4	39,9 ± 9,4	<0,01
СрG6	41,3	63,1	50,4 ± 5,0	24,3	57,2	41,3 ± 8,4	<0,01
СрG7	36,0	67,0	50,4 ± 6,2	23,9	57,5	40,7 ± 7,8	<0,01
СрG8	34,4	60,4	50,3 ± 5,8	20,4	59,5	41,0 ± 8,5	<0,01
СрGср	49,3	51,3	50,2 ± 4,4	36,9	41,9	40,6 ± 6,5	<0,01

Примечание. Мин. — минимальное значение индекса метилирования, Макс. — максимальное значение индекса метилирования, СрGср — среднее значение индекса метилирования по восьми СрG.

Методом анализа главных компонент показано, что уровень метилирования гена *NESP55* одного СА отличался от остальных СА и МА в сторону увеличения процента метилирования его СрG-сайтов. Для гена *GRB10* выявлено два СА с отличным уровнем метилирования в сторону гипометилирования.

Обсуждение

В геноме человека в настоящее время идентифицировано около 100 импринтированных генов, что составляет не более 1% генома [9], из них 50% локусов вовлечены в регуляцию эмбрионального и постнатального роста, 20% — в нейробиологические процессы, для остальных 30% генов биологическая роль неизвестна.

Изучение геномного импринтинга у животных показало, что отцовский генетический вклад важен для развития плаценты, а материнский необходим для развития самого эмбриона [10]. В настоящем исследовании двух импринтированных генов показано значимое увеличение индекса метилирования *NESP55* и снижение *GRB10* у СА I триместра эмбрионального развития, что могло привести к снижению экспрессии гена *NESP55* и увеличению экспрессии *GRB10*. Эти гены экспрессируются в норме только с материнского гомолога и важны в первую очередь, для развития самого эмбриона.

Нейроэндокринный секреторный белок 55 (*NESP55*) состоит из 241 аминокислотного остатка и принадлежит к семейству гранинов, которые участвуют в эндокринных и нейроэндокринных сигнальных путях. Гранины контролируют доставку пептидов, гормонов, нейротрансммиттеров и факторов роста. *NESP55* является биомаркером эндокринных и нейроэндокринных опухолей, а также принимает участие в клеточном росте. Наибольшая его экспрессия наблюдается в нервных тканях (головной и спинной мозг, надпочечники, различные адре-

налопродуцирующие клетки). Показано, что сверхэкспрессия этого гена приводит к увеличению роста клеток [11]. В настоящем исследовании мы наблюдали увеличение индекса метилирования, что могло стать причиной подавления пролиферации клеток и, как следствие, привести к остановке эмбрионального развития.

GRB10 — белок, связывающий рецептор фактора роста. Белковый продукт *GRB10* взаимодействует с рецепторами инсулина и инсулиноподобного фактора роста через SH2-домен, подавляя активность тирозинкиназы, которая участвует в стимуляции ростовой активности инсулина и инсулиноподобных факторов роста I и II, воздействуя на эндокринную, аутокринную и паракринную регуляцию процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма. Таким образом, *GRB10* оказывает супрессирующее влияние на рост, увеличенная доза этого гена может способствовать подавлению роста клеток [12]. В настоящем исследовании показано снижение индекса метилирования данного гена, что могло негативно действовать на рост эмбриона.

Таким образом, исходя из функции исследуемых импринтированных генов, можно предположить, что увеличение индекса метилирования *NESP55* и его снижение в *GRB10* могло усиливать подавление роста эмбриона и привести к остановке его развития.

В литературе увеличение индекса метилирования или гиперметилирование гена *NESP55* было показано в составе множественных эпимутаций импринтированных генов, как в группе СА II триместра беременности и мертворождений, так и при биродительском полном пупочном заносе (БППЗ). Так, при анализе плодных тканей было обнаружено статистически значимое увеличение индекса метилирования импринтированных генов у 4% (2 из 55) СА II триместра эмбрионального развития и в 18% (10 из 57) случаев мертворождений [13]. Кроме гена *NESP55*, авторы анализировали ген *MEG3*, который

так же, как и изучаемый в данном исследовании ген экспрессируется с отцовского аллеля, и гены *H19*, *LIT1*, *PEG3* и *SNRPN*, экспрессирующиеся в норме с материнского гомолога. Хэйворд с соавторами, обследуя 11 семей с БППЗ, кроме гиперметилирования гена *NESP55*, показали гипометилирование *ZAC* и *LIT1* [14].

Биаллельная экспрессия гена *GRB10* является одной из причин синдрома Рассела-Сильвера (СРС), который характеризуется в том числе и выраженной пре- и постнатальной задержкой роста [15]. Гиперметилирование гена *NESP55* является одной из причин псевдогипопаратиреоза, сопровождающегося задержкой умственного и физического развития [16]. Частота этих синдромов в разных популяциях составляет 1:10 000—30 000 для СРС и 1:150 000 для псевдогипопаратиреоза. Гипометилирование гена *GRB10* наблюдается примерно 10—20% случаев СРС и связано с однородительским наследованием или дубликацией участка хромосомы 7 материнского происхождения. Таким образом, в редких случаях подобное нарушение метилирования анализируемых в данном исследовании генов *NESP55* и *GRB10* встречается и у живорожденных индивидов. В настоящем исследовании мы обнаружили одного из 47 СА с гиперметилированием гена *NESP55*, что составило 2,13% от обследуемой выборки и двух из 47 СА с гипометилированием *GRB10* (4,26%). Обнаруженные в настоящем исследовании статистически значимые отличия по индексу метилирования импринтированных генов между СА и МА свидетельствует о том, что в пренатальном периоде происходит отбор против эмбрионов с подобными нарушениями.

Список литературы

1. Радзинский ВЕ. Неразвивающаяся беременность. Методические рекомендации МАРС / ВЕ Радзинский. М.: Редакция журнала StatusPraesens. 2015; 48 с.
2. Elhamamsy A.R. Role of DNA methylation in imprinting disorders: an updated review. *J Assist Reprod Genet.* 2017; 34(5): 549-562.
3. Adalsteinsson BT, Ferguson-Smith AC. Epigenetic control of the genome—lessons from genomic imprinting. *Genes.* 2014; 5(3): 635-655.
4. Лебедев ИН, Саженова ЕА. Эпимутации импринтированных генов в геноме человека: классификация, причины возникновения, связь с наследственной патологией. *Генетика.* 2008; 44(10): 1356-1373.
5. Саженова ЕА, Скрыбин НА, Суханова НН, Лебедев ИН. Мультилокусные эпимутации импринтома при патологии эмбрионального развития человека. *Молекулярная биология.* 2012; 46(2): 204-213.
6. Саженова ЕА, Никитина ТВ, Скрыбин НА и др. Эпигенетический статус импринтированных генов в плаценте при привычном невынашивании беременности. *Генетика.* 2017; 53 (3): 364-377.
7. Turan S, Bastepe M. The *GNAS* complex locus and human diseases associated with loss-of-function mutations or epimutations within this imprinted gene. *Horm Res Paediatr.* 2013; 80(4): 229-241.
8. Chotalia M, Smallwood SA, Ruf N et al. Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes. *Genes Dev.* 2009; 23(1): 105-17.
9. Каталог импринтированных генов и родительских эффектов у человека и животных. университет Отаго — Режим доступа: <http://igc.otago.ac.nz>.
10. Babak T, DeVeale B, Tsang EK et al. Genetic conflict reflected in tissue-specific maps of genomic imprinting in human and mouse. *Nat Genet.* 2015; 47 (5): 544-549.
11. Bartolomucci A, Possenti R, Mahata SK et al. The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. *Endocr Rev.* 2011; 32: 755-797.
12. Yu Y, Yoon SO, Poulgiannis G et al. Phosphoproteomic analysis identifies *Grb10* as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science.* 2011; 332: 1322-1326.
13. Pliushch G, Schneider E, Weise D et al. Extreme methylation values of imprinted genes in human abortions and stillbirths. *Am. J. Pathol.* 2010; 176(3): 1084-1090.
14. Hayward BE, De Vos M, Talati N et al. Genetic and epigenetic analysis of recurrent hydatidiform mole. *Hum. Mutat.* 2009; 30(5): 629-639.
15. Grafodatskaya D, Choufani S, Basran R et al. An update on molecular diagnostic testing of human imprinting disorders. *J. Pediatr. Genet.* 2017; 6(1): 3-17.
16. Kelsey G. Imprinting on chromosome 20: tissue-specific imprinting and imprinting mutations in the *GNAS* locus. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 2010; 154(3): 377-386.

Оценка общего уровня метилирования ДНК по метилированию ретротранспозона LINE-1 при атеросклерозе у человека

Марков А.В.^{1*}, Серебрякова В.В.², Назаренко М.С.^{1,2,3},
Голубенко М.В.^{1,3}, Барбараш О.Л.³, Пузырев В.П.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

* e-mail: anton.markov@medgenetics.ru

Атеросклероз — многофакторное возрастзависимое заболевание с определенным вкладом эпигенетических факторов. Снижение общего уровня метилирования ДНК, оцененного по метилированию ретротранспозона LINE-1, в лейкоцитах крови ассоциировано с риском осложнений атеросклероза, но недостаточно изучен эпигенетический статус LINE-1 в очаге поражения — стенке артерии. Цель — анализ вариабельности общего уровня метилирования ДНК (оцененного по метилированию ретротранспозона LINE-1) в клетках крови и сонных артерий при атеросклерозе у человека. Оценка метилирования LINE-1 в клетках сонных артерий, пораженных атеросклерозом, и лейкоцитах крови тех же пациентов (n = 92), а также лейкоцитах крови здоровых индивидов сопоставимого возраста (n = 60) выполнена методом бисульфитного пиросеквенирования. Общий уровень метилирования ДНК по элементу LINE-1 в лейкоцитах крови был ниже у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий (66,2%) по сравнению со здоровыми индивидами (68,2%; p<0,05). В клетках сонных артерий, пораженных атеросклерозом, наблюдалось более выраженное снижение уровня метилирования LINE-1 относительно того же показателя в лейкоцитах крови (64,8% против 66,2% соответственно, p<0,05). Уровень метилирования LINE-1 обратно коррелировал с хронологическим возрастом в группе здоровых индивидов, а также с индексом массы тела и коэффициентом атерогенности у здоровых лиц и пациентов с выраженным атеросклерозом сонных артерий. Снижение общего уровня метилирования ДНК, оцененного по метилированию ретротранспозона LINE-1, в лейкоцитах крови и клетках артерий связано с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий и его факторами риска.

Ключевые слова: атеросклероз, метилирование ДНК, мобильный генетический элемент, ретротранспозон, LINE-1.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№ 16-04-01481 А); биологический материал для исследования взят из коллекции НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России (проект № 0550-2017-0019).

Assessment of global DNA methylation in human atherosclerosis using methylation of retrotransposable element LINE-1

Markov A.V.^{1*}, Serebryakova V.V.², Nazarenko M.S.^{1,2,3},
Golubenko M.V.^{1,3}, Barbarash O.L.³, Puzyrev V.P.^{1,2}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk

² Siberian State Medical University, Tomsk

³ Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular diseases, Kemerovo

* e-mail: anton.markov@medgenetics.ru

Rationale. Atherosclerosis is a complex age-dependent disease developed under contribution of epigenetic factors. Decreasing of global DNA methylation, estimated by methylation level of retrotransposon LINE-1 in blood leukocytes is associated with a risk of complications of atherosclerosis, but epigenetic status of LINE-1 in the lesion of artery wall is under-investigated. **Aim.** Analysis of the global DNA methylation variability (using methylation level of LINE-1) in human blood cells and carotid arteries in atherosclerosis. **Materials and methods.** Quantification of LINE-1 methylation level in match pairs of carotid arteries affected by atherosclerosis and blood leukocytes collected from patients (n = 92), as well as in white blood cells of the same-aged healthy individuals (n = 60) was performed using bisulfite pyrosequencing. **Results.** Global DNA methylation estimated as LINE-1 methylation level was lower in blood leukocytes of patients with advanced carotid atherosclerosis (66.2%) in comparison with healthy individuals (68.2%; p<0.05). Further decrease of LINE-1 methylation level was observed in cells of carotid atherosclerotic lesions compared to matched samples of blood leukocytes (64.8% vs. 66.2%, respectively, p<0.05). LINE-1 methylation level was negatively correlated with the chronological age of healthy individuals, as well as with the body mass index and the atherogenic index of both healthy individuals and patients with advanced carotid atherosclerosis. **Conclusion.** The decrease of global DNA methylation estimated as hypomethylation of LINE-1 in blood leukocytes and arterial cells was associated with advanced carotid atherosclerosis and its risk factors.

Key words: atherosclerosis, DNA methylation, transposable element, retrotransposon, LINE-1.

Актуальность

Сердечно-сосудистые заболевания, связанные с атеросклеротическим поражением артерий, остаются ведущей причиной смертности и заболеваемости населения во всем мире последние 50 лет [1]. В настоящее время сложилось представление об атеросклерозе как многофакторном заболевании, в основе которого лежит непрерывная череда молекулярных и клеточных событий в течение всей жизни человека. Несмотря на большие успехи в изучении атеросклероза, общепринятые теории (дисфункции эндотелия, липидной инфильтрации, аутоиммунной реактивности и др.) не могут в полной мере описать сложную картину развития атеросклеротической бляшки, а также её осложнений. Исследование эпигенетических модификаций генома клеток, составляющих пораженную стенку артерии, является одним из перспективных, но недостаточно изученных механизмов в развитии атеросклероза [2].

Одним из механизмов эпигенетической регуляции активности генов является метилирование ДНК, которое в соматических клетках взрослого человека представлено, в основном, ковалентной модификацией остатков цитозина в CpG-сайтах [3]. Метилирование ДНК у млекопитающих обнаруживается в области перичентромерных и гетерохроматиновых районов хромосом, и, особенно, в повторяющихся генетических элементах, таких, как транспозоны и ретровирусы [4]. Транспозоны представлены длинными и короткими диспергированными повторами (LINE и SINE), занимающими почти половину (до 45%) генома человека. Поэтому высококопийные элементы генома обычно используются для оценки так называемого общего уровня метилирования ДНК. Одними из наиболее часто используемых с данной целью последовательностей являются представители семейства ретротранспозонов LINE-1, которые равномерно распределены по геному человека (составляя около 17% от него) и в норме гиперметилированы в разных тканях организма [5]. До недавнего времени было принято рассматривать ретротранспозоны как бесполезные или вредные паразитные последовательности, однако в последние годы накапливаются сведения о роли данных элементов генома в регуляции экспрессии генов, особенно на ранних этапах онтогенеза человека [6]. Дисрегуляция на эпигенетическом уровне элементов LINE-1 может приводить к геномной нестабильности, внося вклад в развитие различных заболеваний человека, связанных с изменениями клеточного фенотипа, в том числе, и при атеросклеротическом поражении артерий. Гипометилирование LINE-1 в лейкоцитах крови связано с риском развития и ранним неблагоприятным исходом ишемической болезни сердца (ИБС) и ишемического инсульта [7–9]. Однако неясно, как данное явление соотносится с изменениями, наблюдаемыми в пораженных атеросклерозом артериях.

Поэтому целью настоящей работы являлся анализ варибельности общего уровня метилирования ДНК (по метилированию ретротранспозона LINE-1) в клетках крови и сонных артерий при атеросклерозе у человека. В задачи исследования входило сопоставление уровней метилирования ретротранспозона LINE-1 в клетках крови и пораженных сонных артерий пациентов с атеросклерозом, а также лейкоцитов относительно здоровых индивидов; оценка связи уровня метилирования LINE-1 с факторами риска и клиническими проявлениями атеросклероза.

Материалы и методы

Выборка пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий была сформирована на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» и состояла из 92 мужчин (возраст 63 ± 8 лет). Проведение исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике института. Все индивиды подписали добровольное согласие на участие в исследовании. У всех пациентов в анамнезе имелась артериальная гипертензия, эпизоды острого нарушения мозгового кровоснабжения — у 37 (40%) обследованных, причем 89 (97%) пациентов дополнительно страдали ИБС, а 39 (42%) перенесли инфаркт миокарда. Избыточную массу тела или ожирение имели 79 (85%), сахарный диабет 2 типа — 26 (29%) пациентов. Факт курения отмечался у 78 (85%) обследованных. В результате каротидной эндартерэктомии от пациентов с атеросклерозом сонных артерий получены атеросклеротические бляшки, представляющие собой область неоинтимы с подлежащим слоем меди и вплоть до наружной эластической мембраны. Образцы атеросклеротических бляшек тщательно очищены от масс кальцификации, отложений липидов и тромбов, отмыты в стерильном физиологическом растворе и, вместе с образцами периферической венозной крови, полученной от тех же пациентов, заморожены в жидком азоте для транспортировки.

Набор образцов лейкоцитарной ДНК относительно здоровых лиц, служащих контролем, а также основные этапы исследования выполнены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Контрольная выборка состояла из 60 мужчин (возраст 58 ± 13 лет) и была сформирована на основании отсутствия клинической симптоматики заболевания, а также результатов ультразвукового исследования сонных артерий (комплекс интима-медиа в пределах нормальных значений). При этом 21 индивид (35%) имел избыточную массу тела, факт курения отмечался у 53 (88%) человек. Весь биологический материал хранился при температуре -80°C до момента проведения молекулярно-генетического исследования.

Выделение ДНК из лейкоцитов крови было проведено стандартным фенол-хлороформным микрометодом. Для выделения ДНК из клеток артериальной стенки замороженные образцы были гомогенизированы на приборе Minilys (Bertin Tech, США). Гомогенат инкубировали 2 часа при 55°C в 350 мкл буфера (100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА pH 8,0, 10 mM Tris-HCl pH 8,0) с добавлением 10 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и 40 мкл 10% SDS. После инкубации охлаждали микропробирку до комнатной температуры, далее действовали по протоколу выделения ДНК из лейкоцитов крови.

Анализ метилирования LINE-1 методом бисульфитного пиросеквенирования выполнен на приборе PyroMark Q24 System (Qiagen, США). После бисульфитной модификации ДНК с использованием набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США) проводилась амплификация одной из цепей ДНК с применением специфических для LINE-1 праймеров (прямого 5'-TTTTGAGTTAGGTGTGGGATATA-3' и обратного 5'-[Биотин]-CAAAAAATCAAAAAATCCSTTTCC-3') [10]. Для этого в 25 мкл смеси, содержащей 40–50 нг модифицированной ДНК, 0,2 мкМ каждого праймера и 12,5 мкл мастер-микса «БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color» (Биолабмикс, Россия), была проведена ПЦР по программе: 95°C — 7 мин, 45 циклов (94°C, 56,3°C и 72°C — по 30 с), 72°C — 5 мин. Пиросеквенирование со специфическим праймером (5'-AGTTAGGTGTGGGATATAGT-3') было выполнено по протоколу производителя прибора [11]. Уровень метилирования отдельных CpG-сайтов, представляющий собой долю метилированных остатков цитозина в данных позициях генома, определен с использованием программы PyroMark Q24 Software 2.0.7 (Qiagen, США).

Статистическая обработка результатов проведена в программном пакете SPSS Statistics 17.0 (IBM, США). Сравнение уровней метилирования в группах исследований проводилось с использованием критериев Вилкоксона для связанных выборок и Вилкоксона—Манна—Уитни на уровне значимости 0,05. Результаты, полученные при множественных сравнениях данных, были скорректированы по методу Бонферрони. Для оцен-

ки корреляционных отношений между количественными показателями использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования был оценен уровень метилирования трёх CpG-сайтов в 5'-нетранслируемой области ретротранспозона LINE-1 (L1Hs), соответствующих позициям 318 (CpG₁), 321 (CpG₂) и 328 (CpG₃) в последовательности X58075 базы данных GenBank. Кроме того, был рассчитан усреднённый уровень метилирования по анализируемому региону ДНК (табл. 1).

Между уровнями метилирования трех CpG-сайтов и усреднённым по региону значением во всех анализируемых тканях наблюдалась сильная положительная корреляция (коэффициент корреляции ρ варьировал от 0,85 до 0,97; $p < 0,05$). При сравнении метилирования отдельных CpG-сайтов между собой и со средним уровнем метилирования по анализируемому региону LINE-1 значимые различия в метилировании были получены только для крайних CpG-сайтов. В частности, уровень метилирования CpG₃ был ниже по сравнению с CpG₁ в атеросклеротических бляшках сонных артерий ($p = 0,006$) и лейкоцитах ($p = 0,036$) больных, а также клетках крови относительно здоровых индивидов ($p = 0,012$). Учитывая гетерогенность метилирования ДНК по отдельным CpG-сайтам и сильную корреляцию между ними в ряду биологических образцов, усредненный уровень метилирования LINE-1 можно использовать в качестве показателя вариабельности между разными тканями и состояниями, но не для ориентира при оценке абсолютной величины общего уровня метилирования ДНК.

При сопоставлении уровней метилирования отдельных CpG-сайтов в исследуемых тканях пациентов с клинически выраженным атеросклерозом выявлено снижение уровня метилирования CpG₁ и CpG₃ по сравнению с образцами периферической крови ($p < 0,001$ в обоих случаях; табл. 1). Средний по региону уровень метилирования ДНК был также достоверно ниже в клетках ате-

Таблица 1

Уровень метилирования LINE-1 (%) в атеросклеротических бляшках и лейкоцитах крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом и здоровых индивидов

Материал исследования	n	CpG ₁	CpG ₂	CpG ₃	Усредненный уровень
Лейкоциты здоровых индивидов	60	72,3 (65,8–75,6)	64,3 (53,7–76,6)	68,6 (61,1–73,5)	68,2 (60,7–75,7)
Лейкоциты пациентов с атеросклерозом	92	68,6 (62,3–73,2)	67,5 (54,7–74,7)	65,9 (57,7–70,7)	66,2 (59,1–72,9)
Атеросклеротические бляшки сонных артерий	92	63,9 (59,4–69,8)	68,2 (48,5–73,4)	61,9 (51,7–66,8)	64,8 (53,5–70,1)

Примечание. Результаты представлены в формате «Me(Q1-Q3)», где Me — медиана, Q1-Q3 — первый и третий квартили; n — число образцов в группе исследования.

росклеротических бляшек по сравнению с клетками крови ($p < 0,001$). Вместе с тем, была выявлена статистически значимая корреляционная зависимость между уровнем метилирования LINE-1 в атеросклеротических бляшках сонных артерий и клетках крови (ρ варьировал от 0,41 до 0,66 для разных CpG-сайтов; $p < 0,01$). Следовательно, уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 в клетках крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий изменяется наряду с изменением уровня метилирования в патологическом очаге — атеросклеротической бляшке. Данный результат не удивителен, если учитывать ведущую роль хронического воспаления в развитии атеросклеротической бляшки, включая инфильтрацию интимы артерии мононуклеарными лейкоцитами.

Метилирование LINE-1 в клетках крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий отличалось от того же показателя у здоровых индивидов. Статистически значимое снижение уровня метилирования было обнаружено по CpG-сайту CpG₁ ($p = 0,002$), тогда как CpG₃ и усредненный по региону уровень метилирования имели тенденцию к гипометилированию в клетках крови при атеросклерозе сонных артерий ($p = 0,060$ и $0,068$ соответственно; табл. 1). Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, которые также показали снижение уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 при атеросклерозе и связали с риском развития его осложнений, причем значимые ассоциации с такими осложнениями атеросклероза, как инфаркт миокарда и инсульт, были найдены только у мужчин [7, 8, 12].

Для оценки связи клинической картины атеросклероза с общим уровнем метилирования ДНК был проведен корреляционный анализ статуса метилирования ретротранспозона LINE-1 в клетках пациентов и здоровых индивидов с клинико-анамнестическими (возраст, индекс массы тела, курение, инфаркт миокарда, эпизоды острого нарушения мозгового кровообращения в анамнезе) и биохимическими показателями (уровень глюкозы, липидный профиль). Обнаружена статистиче-

ски значимая слабая отрицательная корреляция уровня метилирования LINE-1 в клетках крови и атеросклеротических бляшек с индексом массы тела пациентов ($p < 0,05$; табл. 2). Кроме того, у пациентов обнаружена связь метилирования CpG₁, а также усредненного по региону уровня метилирования LINE-1 в клетках пораженных сонных артерий с коэффициентом атерогенности. Связь между метилированием LINE-1 в клетках крови и липидным профилем, включающим коэффициент атерогенности, была показана ранее в нескольких работах, однако не выявлена по результатам настоящего исследования [13, 14]. Интересно, что устойчивые корреляционные отношения уровня метилирования LINE-1 с индексом массы тела и коэффициентом атерогенности были установлены также у фенотипически здоровых индивидов (табл. 2). В другой работе уже была обнаружена отрицательная зависимость между метилированием LINE-1 и массой подкожного жира (который в немалой степени вносит вклад в значения ИМТ) у мужчин и женщин молодого возраста [15]. Таким образом, по результатам настоящего исследования не выявлено уникальных ассоциаций общего уровня метилирования ДНК с эндофенотипами, которые были бы характерны только для пациентов с атеросклерозом сонных артерий, но следует учитывать существующую ковариацию между метилированием LINE-1 и клиническими показателями, приведенными в табл. 2.

В выборке здоровых лиц наблюдалась слабая отрицательная корреляция уровня метилирования LINE-1 в лейкоцитах с возрастом (табл. 2), но среди пациентов с клинически выраженным атеросклерозом подобной зависимости не обнаружено. Ассоциация снижения уровня метилирования LINE-1 с возрастом была обнаружена ранее [9, 16]. Отсутствие связи общего уровня метилирования с хронологическим возрастом в выборке больных по результатам настоящего исследования отчасти можно объяснить меньшим разбросом по возрасту в данной группе. Кроме того, в изменчивость уровня метилирования LINE-1 при развитии клинически выраженного атеросклероза больший вклад могут вносить

Таблица 2

Корреляционные отношения между уровнем метилирования LINE-1 и количественными клиническими признаками

Материал исследования	Клинический показатель	CpG ₁	CpG ₂	CpG ₃	Усредненный уровень
Лейкоциты здоровых индивидов	Возраст	-0,324*	-0,445**	-0,369**	-0,391**
	ИМТ	-0,393**	-0,431**	-0,356*	-0,421**
	КА	-0,293*	-0,274*	-0,266	-0,299*
Лейкоциты пациентов с атеросклерозом	ИМТ	-0,289**	-0,272**	-0,263*	-0,259*
Атеросклеротические бляшки сонных артерий	ИМТ	-0,166	-0,255*	-0,209*	-0,209*
	КА	-0,355**	-0,259	-0,195	-0,297*
Примечание. ИМТ — индекс массы тела, КА — коэффициент атерогенности. Звездочками отмечен уровень значимости неравенства коэффициента корреляции нулю: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.					

другие факторы риска данного заболевания и его осложнений (генетические, средовые, рацион питания и образ жизни пациента), определяющие индивидуальные фенотипы пациентов [16].

Выводы

В настоящем исследовании установлена тенденция к снижению общего уровня метилирования ДНК, оцененного по метилированию ретротранспозона LINE-1, в лейкоцитах крови при наличии клинически выраженного атеросклероза сонных артерий. Получены новые сведения в отношении общего уровня метилирования в клетках сонных артерий, пораженных атеросклерозом, который оказался ниже по сравнению с лейкоцитами крови тех же пациентов, но коррелировал с ним при оценке межиндивидуальной вариабельности данных показателей. Обнаружена обратная корреляция уровня метилирования LINE-1 с возрастом в группе здоровых индивидов, а с индексом массы тела и коэффициентом атерогенности — у здоровых лиц и пациентов с атеросклерозом сонных артерий.

Список литературы

- Hai Z, Zuo W. Aberrant DNA methylation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2016 May 1;456:69-74.
- Feinberg AP. Epigenomics reveals a functional genome anatomy and a new approach to common disease. *Nat Biotechnol*. 2010 Oct;28(10):1049-52.
- Ванюшин БФ. Эпигенетика сегодня и завтра. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):805-32.
- Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;310:211-50.
- Zhong J, Agha G, Baccarelli AA. The Role of DNA Methylation in Cardiovascular Risk and Disease: Methodological Aspects, Study Design, and Data Analysis for Epidemiological Studies. *Circ Res*. 2016 Jan 8;118(1):119-31.
- Васильев СА, Толмачёва ЕН, Кашеварова АА и др. Статус метилирования ретротранспозона LINE-1 при хромосомном мозаицизме на ранних стадиях эмбрионального развития человека. *Молекулярная биология*. 2015;49(1):165-74.
- Baccarelli A, Wright R, Bollati V et al. Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation. *Epidemiology*. 2010 Nov;21(6):819-28.
- Lin RT, Hsi E, Lin HF et al. LINE-1 methylation is associated with an increased risk of ischemic stroke in men. *Curr Neurovasc Res*. 2014 Feb;11(1):4-9.
- Wei L, Liu S, Su Z et al. LINE-1 hypomethylation is associated with the risk of coronary heart disease in Chinese population. *Arq Bras Cardiol*. 2014 May;102(5):481-8.
- Aoki Y, Nojima M, Suzuki H et al. Genomic vulnerability to LINE-1 hypomethylation is a potential determinant of the clinicogenetic features of multiple myeloma. *Genome Med*. 2012 Dec 22;4(12):101.
- Tabish AM, Baccarelli AA, Godderis L et al. Assessment of Changes in Global DNA Methylation Levels by Pyrosequencing® of Repetitive Elements. *Methods Mol Biol*. 2015;1315:201-7.
- Guarrera S, Fiorito G, Onland-Moret NC et al. Gene-specific DNA methylation profiles and LINE-1 hypomethylation are associated with myocardial infarction risk. *Clin Epigenetics*. 2015 Dec 24;7:133.
- Cash HL, McGarvey ST, Houseman EA et al. Cardiovascular disease risk factors and DNA methylation at the LINE-1 repeat region in peripheral blood from Samoan Islanders. *Epigenetics*. 2011 Oct 1;6(10):1257-64.
- Pearce MS, McConnell JC, Potter C, Barrett LM, Parker L, Mathers JC, Relton CL. Global LINE-1 DNA methylation is associated with blood glycaemic and lipid profiles. *Int J Epidemiol*. 2012 Feb;41(1):210-7.
- Marques-Rocha JL, Milagro FI, Mansego ML, Mourro DM, Martnez JA, Bressan J. LINE-1 methylation is positively associated with healthier lifestyle but inversely related to body fat mass in healthy young individuals. *Epigenetics*. 2016;11(1):49-60.
- Bollati V, Schwartz J, Wright R, Litonjua A, Tarantini L, Suh H, Sparrow D, Vokonas P, Baccarelli A. Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech Ageing Dev*. 2009 Apr;130(4):234-9.

Экспрессия молекулярных маркеров в ткани рака предстательной железы, связь с клинико-морфологическими особенностями заболевания

Спирина Л.В.^{1,2}, Тарасенко Н.В.^{2,3}, Горбунов А.К.¹,
Кондакова И.В.¹, Слонимская Е.М.^{1,2}, Усынин Е.А.¹

¹ НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Томск

² Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

³ НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск

Рак предстательной железы (РПЖ) является одной из самых распространенных опухолей среди мужчин. Цель проведенного исследования заключалась в изучении экспрессии транскрипционного фактора *Brn-3α*, AR, ERα в процессах развития РПЖ в связи с уровнем активации сигнального пути АКТ/m-TOR, наличием инвазии в семенные пузырьки и степенью дифференцировки опухоли. В исследование было включено 50 больных местно-распространенным РПЖ, прошедших стандартное лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ. Определение уровня экспрессии генов *Brn-3α*, AR, ERα, и компонентов сигнального пути АКТ/m-TOR проводили методом ПЦР в реальном времени. Показана ассоциация увеличения экспрессии ядерного белка *Brn-3α* с развитием РПЖ, что связано с возрастанием уровня ERα и активацией сигнального каскада АКТ/m-TOR. При этом инвазия опухоли происходит при высоких уровнях мРНК стероидных рецепторов и PTEN, а также низкой экспрессии m-TOR. Выявлены связи между индексом Глисона и уровнем мРНК изучаемых молекулярных маркеров. Снижение экспрессии АКТ, GSK-3β на фоне возрастания уровня мРНК 4E-BP1 наблюдалось по мере снижения степени дифференцировки опухоли. Такие измерения происходили на фоне гиперэкспрессии фосфатазы PTEN. Представленные факты, отражающие особенности изменений биологических свойств опухоли, вероятно, могут составлять основу создания молекулярной панели для оценки развития и прогрессирования заболевания

Ключевые слова: транскрипционный фактор *Brn-3α*, рак предстательной железы, AR, ER, сигнальный путь АКТ/m-TOR, кастрационно-рефрактерная форма, коэффициент Глисона, инвазия.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Molecular markers expression in prostate cancers: association with clinical and morphological features of disease

Spirina L.V.^{1,2}, Tarasenko N.V.^{2,3}, Gorbunov A.K.¹,
Kondakova I.V.¹, Slonimskaya E.M.^{1,2}, Usynin E.A.¹

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Russia

² Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

³ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Russia

Introduction. Prostate cancers belong to the high-spread tumors among men. **Objectives:** The purpose of the study was to investigate *Brn-3α*, AR, ERα expression in prostate cancer tissues in association with АКТ/mTOR signaling pathway activation, cancer invasion and grade. **Materials and methods:** 50 patients with locally advanced cancer of the prostate were included in the study. Expression of *Brn-3α*, AR, ERα, components of АКТ/m-TOR signaling pathway was determined by RT-PCR. **Results.** Overexpression of *Brn-3α* was found in prostate cancer tissues, which was accompanied by high level of ERα mRNA. Activation of АКТ/m-TOR signaling pathway was revealed in cancers. It was noted that the invasion of tumor was associated with high expression of ER, AR, PTEN as well as decreased mRNA level of m-TOR. The low activity of АКТ/m-TOR signaling pathway was revealed in least-differentiated tumors. Decrease of АКТ, GSK-3β expression and increase of 4E-BP1 happened in least-differentiated tumors compared to well-differentiated tumors (Gleason score 6-7). The altered protein kinase expression was associated with overexpression of PTEN. **Conclusion.** These data, reflecting the biological features of cancers, are the molecular pattern of prostate tumors progression.

Key words: transcription factor *Brn-3α*, prostate cancer, AR, ER, АКТ/m-TOR signaling pathway, castrate-refractory cancer, Gleason score, invasion.

Рак предстательной железы (РПЖ) является распространенной опухолью у мужчин. Известно, что ответ опухоли на проводимое комбинированное лечение регистрируется более чем у 90% пациентов с метастатическим РПЖ. Однако длительность ответа составляет в среднем от 12 до 36 мес, что в конечном итоге приводит к прогрессированию опухолевого процесса с развитием кастрационно-резистентной формы заболевания [1, 2]. Неуклонный прирост заболеваемости, отсутствие 100% эффективности классической депривационной терапии являются факторами, способствующими поиску молекулярных маркеров развития РПЖ [3].

Прогнозирование риска прогрессирования РПЖ в настоящее время основано на оценке исходного уровня простатспецифического антигена, суммы баллов по Глиссону, клинической стадии с использованием номограмм Kattan, классификации рисков D.Amico [3] и таблицы Partin [4]. Основным недостатком предложенных моделей является недостаточное количество хорошо изученных и апробированных переменных, что определяет их невысокую диагностическую точность. Эффективность номограмм с включением в прогностическую модель молекулярно-генетических параметров опухоли является предметом изучения в настоящее время [5, 6].

В развитии гормонозависимых опухолей человека большое значение имеют транскрипционные факторы POU4F1, также известные как нейрогенные факторы *Brn-3 α* [7]. Diss J.K. с соавторами полагают, что транскрипционный фактор *Brn-3 α* участвует в различных процессах онкогенеза, определяя интенсивность пролиферации опухолевых клеток и участвуя в регуляции апоптоза [8]. Кроме того, выявлены ассоциации данного показателя с рецепторами половых гормонов: эстрогенов (ER) и андрогенов (AR) [9].

Рецепторы стероидных гормонов входят в большое семейство внутриклеточных рецепторов, которые активируются под действием соответствующих лигандов. ER и AR являются их основными представителями. ER имеют 2 подтипа: ER α и ER β . Каждый из них кодируется отдельным геном, при этом имеются сведения о преимущественной экспрессии того или иного подтипа рецептора в разных тканях [10]. Известна роль ER α в качестве важного регулятора интенсивности процессов ангиогенеза гормонозависимых опухолей [11]. Изменение уровня и экспрессии стероидных гормонов найдены в злокачественных новообразованиях различных локализаций [12]. Ключевым сигнальным каскадом, обеспечивающим регуляцию процессов пролиферации и апоптоза при действии AR и ER, является АКТ/м-TOR [13, 14, 15]. К его значимым компонентам относят протеинкиназы АКТ, м-TOR, PTEN и др.

Цель проведенного исследования заключалась в изучении экспрессии транскрипционного фактора *Brn-3 α* , AR, ER α , компонентов сигнального пути АКТ/м-TOR в ткани РПЖ в связи с клинико-морфологическими особенностями, в частности наличием инвазии в семенные пузырьки и уровнем гистологической организации опухоли

Материал и методы

В исследование было включено 50 больных местно-распространенным РПЖ T2-3N0M0, проходивших лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ. 10 пациентов РПЖ имели признаки инвазии в семенные пузырьки. Индекс Глиссона от 6 до 7 имели 8 пациентов, а более 7 — 13 человек. Объемы диагностики и лечения больных соответствовали рекомендуемым алгоритмам по диагностике и лечению злокачественных новообразований, утвержденным Министерством здравоохранения РФ. Проведение данной работы одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Материалом исследования являлись образцы опухолевой ткани, полученные при диагностической биопсии. Нормальная ткань простаты для изучения экспрессии молекулярных показателей была получена при оперативном вмешательстве у больных раком мочевого пузыря, которым была проведена цистпростатэктомия.

Для исследования экспрессии молекулярных показателей и выделения мРНК образцы тканей помещали в раствор RNAlater (Ambion, USA) и сохраняли при температуре -80°C (после 24-часовой инкубации при $+4^{\circ}\text{C}$).

*Определение уровня экспрессии генов *Brn-3 α* , AR, ER α , а также компонентов АКТ/м-TOR сигнального пути*

РНК выделяли с использованием набора RNeasy mini Kit, содержащего ДНКазу I (Qiagen, Germany). На спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) оценивали концентрацию и чистоту выделения РНК. Концентрация РНК составила от 80 до 250 нг/мкл, A260/A280 = 1,95—2,05; A260/A230 = 1,90—2,31. Целостность РНК оценивалась с использованием капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, USA). RIN составил 5,6—7,8.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени

Уровень экспрессии генов оценивали методом количественной обратной-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) с использованием красителя SYBR Green на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, USA). Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора ОТ m-MuLV-RN (БиоЛабмикс, Россия) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору. ПЦР ставили в трех репликах в объеме 25 мкл, содержащем 12,5 мкл БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (БиоЛабмикс, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров и 50 нг кДНК. Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл — 94°C , 10 мин — предварительная денатурация; 40 циклов — 1 шаг 94°C , 10 с и 2 шаг 20°C — при температуре 60°C . Праймеры были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) (табл. 1).

В качестве референсного гена использовали ген «домашнего хозяйства» фермента GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), и уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовали по отношению к экспрессии гена GAPDH.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 8.0. Результаты определения экспрессии генов представлены как среднее значение \pm ошибка среднего. Значимость различий оценивали по критерию Манна—Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Существование связи между показателями определяли с использованием корреляционного анализа, силу связи между переменными оценивали, рассчитывая коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r).

Результаты и их обсуждение

В ранее проведенных работах показана роль ядерного белка $\text{Wp-3}\alpha$ в развитии РПЖ, что связано с возрастанием уровня ER α . Выявлена активация сигнального каскада АКТ/m-TOR: отмечены высокие уровни экспрессии АКТ, m-TOR, а также повышение уровня фосфатазы PTEN [16]. Эти сведения позволили провести работу по изучению связи изучаемых показателей у больных РПЖ и клинико-морфологическими пара-

метрами заболевания. К наиболее значимым параметрам относят инвазию в семенные пузырьки и показатель Глисона, отражающий уровень гистологической организации опухоли.

У больных с наличием инвазивного роста отмечено увеличение экспрессии AR и ER в 1,78 и 3,9 раза соответственно по сравнению с пациентами без инвазии (табл. 2).

Распространение опухоли и наличие инвазии в семенные пузырьки приводило к снижению уровня активации сигнального пути АКТ/m-TOR 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. В настоящее время имеются немногочисленные сведения, позволяющие оценить связь молекулярных показателей с клиническими параметрами заболевания. Было показано, что маркер Ki-67, отражающий интенсивность процессов пролиферации, может быть связан с наличием инвазии у больных РПЖ [17], однако в дальнейшем этот факт не был подтвержден.

Особый интерес представляют связи изучаемых молекулярных параметров с индексом Глисона, который отражает степень дифференцировки опухоли. В табл. 3 показаны уровни их экспрессии в двух группах больных с уровнем Глисона 6—7 и более 7. Выявлено падение ак-

Таблица 1

Последовательность праймеров проб исследованных генов

	Ампликон	Последовательность
<i>POU4F1</i> NM_006237	294 п.н.	F 5- CACGCTCTCGACAACAA-3 R 5- ATCCGCTTCTGCTTCTGTCT-3
<i>AR</i> NM_000044	190 п.н.	F 5- GAGGGACAGCAGGCAGA-3 R 5- GCTATCAGAACACACACACACT-3
<i>ER</i> NM_000125	386 п.н.	F 5- TCCTGATGATTGGTCTCGTCT-3 R 5- GATGTGGGAGGATGAGGA-3
<i>4E-BP1</i> NM_004095.3	244 п.н.	F 5- CAGCCCTTCTCCCTCACT -3 R 5- TTCCCAAGCACATCAACCT -3
<i>AKT1</i> NM_001014431.1	181 п.н.	F 5- CGAGGACGCCAAGGAGA -3 R 5- GTCATCTTGGTCAGGTGGTGT -3
<i>C-RAF</i> NM_002880.3	152 п.н.	F 5- TGGTGTGTCCTGCTCCCT -3 R 5- ACTGCCTGCTACCTTACTTCCT -3
<i>GSK3b</i> NM_001146156.1	267 п.н.	F 5- AGACAAGGACGGCAGCAA -3 R 5- TGGAGTAGAAGAAATAACGCAAT -3
<i>70S kinase alpha</i> NM_001272042.1	244 п.н.	F 5- CAGCACAGCAAATCCTCAGA -3 R 5- ACACATCTCCCTCTCCACCTT -3
<i>M-TOR</i> NM_004958.3	160 п.н.	F 5- CCAAAGGCAACAAGCGAT-3 R 5- TTCACCAAACCGTCTCCAA -3
<i>PDK1</i> NM_001278549.1	187 п.н.	F 5- TCACCAGGACAGCCAATACA -3 R 5- CTCCTCGGTCACTCATCTTCA -3
<i>GAPDH</i> NM_001256799.2	138 п.н.	F 5- GGAAGTCAGGTGGAGCGA-3 R 5 -GCAACAATATCCACTTTACCAGA-3
Примечание. NM — номер последовательности ПНК в NCBI Nucleotide Database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide); F — прямой праймер; R — обратный праймер		

тивности сигнального пути АКТ/m-TOR по мере снижения дифференцировки опухоли. Так, у больных с показателем Глисона более 7 отмечено снижение экспрессии АКТ, GSK-3 β и рост уровня мРНК 4E-BP1 в 9,1, 56,6 и 2,36 раза соответственно, по сравнению с более дифференцированными опухолями с индексом Глисона 6–7. При этом экспрессии PTEN увеличивалась в 1,39 раза.

При проведении корреляционного анализа выявлены зависимости между уровнем экспрессии АКТ

($r = -0,48$; $p = 0,01$), GSK-3 β ($r = -0,49$; $p = 0,001$), PTEN ($r = 0,34$; $p = 0,01$) и индексом Глисона. Эти факты являются дополнительным доказательством связи молекулярных параметров с уровнем гистологической организации опухоли. В ранее проведенных исследованиях не удалось доказать связь молекулярных параметров с уровнем гистологической организации опухоли, при этом была доказана их прогностическая значимость [18].

Таблица 2

Экспрессия генов при РПЖ в зависимости от наличия инвазии опухоли в семенные пузырьки

Показатель, Усл. Ед.	Рак предстательной железы	
	Без инвазии	С инвазией
Vrn-3 α	40,5 \pm 9,75	45,85 \pm 13,85
AR	140,78 \pm 22,32	250,8 \pm 36,99*
ER	70,36 \pm 19,50	275,43 \pm 36,39*
Компоненты АКТ/m-TOR сигнального пути		
PTEN	225,99 \pm 25,04	494,87 \pm 17,13*
АКТ	10,50 \pm 3,40	11,73 \pm 4,27
GSK-3-beta	13,04 \pm 5,86	0,73 \pm 0,26
PDK1	14,80 \pm 4,49	2,93 \pm 1,06
c-RAF	25,38 \pm 8,53	18,93 \pm 10,93
Протеинкиназа m-TOR и ее субстраты		
m-TOR	31,93 \pm 14,21	0,68 \pm 0,20*
70 S6	18,55 \pm 11,45	11,97 \pm 9,14
4E-BP1	3,89 \pm 2,00	4,93 \pm 3,06
Примечание. * — значимость различий по сравнению с пациентами без инвазии в семенные пузырьки, $p < 0,05$		

Таблица 3

Экспрессия генов при РПЖ в зависимости от индекса Глисона

Показатель, Усл. Ед.	Рак предстательной железы	
	Индекс Глисона 6-7	Индекс Глисона более 7
Vrn-3 α	24,85 \pm 11,16	49,11 \pm 23,6
AR	143,29 \pm 53,86	142,86 \pm 36,99
ER	188,56 \pm 58,22	38,87 \pm 36,39
Компоненты АКТ/m-TOR сигнального пути		
PTEN	213,10 \pm 53,60	297,17 \pm 54,31*
АКТ	22,4 \pm 11,2	2,46 \pm 0,57*
GSK-3-beta	39,38 \pm 23,08	0,60 \pm 0,16*
PDK1	29,07 \pm 14,6	2,83 \pm 1,13
c-RAF	20,5 \pm 8,7	9,53 \pm 2,77
Протеинкиназа m-TOR и ее субстраты		
m-TOR	49,1 \pm 24,0	18,01 \pm 12,7
70 S6	3,07 \pm 1,03	5,83 \pm 3,12
4E-BP1	3,76 \pm 2,08	1,6 \pm 0,51*
Примечание. * — значимость различий по сравнению с пациентами с индексом Глисона от 6 до 7, $p < 0,05$		

Стоит отметить, что изучаемые клинико-морфологические особенности заболевания отражают биологические характеристики опухоли и связаны с ее агрессивностью. Снижение экспрессии компонентов сигнального пути АКТ/m-TOR при росте уровня мРНК PTEN встречаются в более запущенных и клинически неблагоприятных случаях. При этом развитие заболевания с признаками инвазии определяется возрастанием экспрессии AR и ER.

Таким образом, развитие РПЖ связано с ростом экспрессии ядерного фактора Bcl-2 и рецепторов стероидных гормонов, а также активацией сигнального пути АКТ/m-TOR. Инвазия опухоли происходит при высоких уровнях мРНК стероидных рецепторов, низкой экспрессии m-TOR и высокой экспрессии PTEN. Выявлены связи между индексом Глисона и уровнем мРНК изучаемых молекулярных маркеров, что характеризует значимость данных показателей в процессах онкогенеза. Так, снижение экспрессии АКТ, GSK-3 β и повышение экспрессии PTEN происходит при повышении индекса Глисона и сопровождается развитием низкодифференцированных раков. Резюмируя полученные сведения, надо отметить важную роль молекулярных показателей в процессе развития данного заболевания. Связи, показанные в данной работе, имеют значение для развития молекулярных подходов в клинической онкологии, что, несомненно, требует дальнейшего изучения.

Список литературы

1. Amiya Y, Yamada Y, Sugiura M, Sasaki M, Shima T, Suzuki N, Nakatsu H, Murakami S, Shimazaki J. Treatment of locally advanced prostate cancer (Stage T3). *Jpn J Clin Oncol*. 2017 Jan 17. doi: 10.1093/jco/hyw186.
2. Маркова АС, Поликарпова СБ, Камолов БШ, Гриднева ЯВ, Калинин СА, Петерс МВ, Матвеев ВБ. Факторы прогноза общей выживаемости больных метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы. *Онкоурология*. 2015;11(2):77-84.
3. D'Amico AV, Moul J, Carroll PR, Sun L, Lubeck D, Chen MH. Prostate specific antigen doubling time as a surrogate end point for prostate cancer specific mortality following radical prostatectomy or radiation therapy. *J Urol*. 2004 Nov;172(5 Pt 2):42-46.
4. Makarov DV1, Partin AW. Prostate-Cancer Risk Stratification via Early PSA Testing. *Rev Urol*. 2007;9(2):91-92.
5. Strand SH, Hoyer S, Lynnerup AS, Haldrup C, Storebjerg TM, Borre M, Orntoft TF, Sorensen KD. High levels of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) is an adverse predictor of biochemical recurrence after prostatectomy in ERG-negative prostate cancer. *Clin Epigenetics*. 2015;7:111. doi: 10.1186/s13148-015-0146-5.
6. Niedworok C1, Tschirdewahn S1, Reis H2, Lehmann N3, Szucs M4, Nyirady P4, Romics I4, Rubben H1, Szarvas T5. Serum Chromogranin A as a Complementary Marker for the Prediction of Prostate Cancer-Specific Survival. *Pathol Oncol Res*. 2016. doi: 10.1007/s12253-016-0171-5.
7. Budhram-Mahadeo V, Fujita I R, Bitsil S, Sicard P, Heads R. Co-expression of POU4F2/Brn-3b with p53 may be important for controlling expression of pro-apoptotic genes in cardiomyocytes following ischaemic/hypoxic insults. *Cell Death and Disease*. 2014;5:1503. doi:10.1038/cddis.2014.452
8. Diss JK, Faulkes DJ, Walker MM, Patel A, Foster CS, Budhram-Mahadeo V, Djamgoz MB, Latchman DS, Berwick DC. A simple technique for the prediction of interacting proteins reveals a direct Brn-3a-androgen receptor interaction. *J. Biol. Chem*. 2010;285:15286-15295.
9. Berwick DC, Diss JK, Budhram-Mahadeo VS, Latchman DS. A simple technique for the prediction of interacting proteins reveals a direct Brn-3a-androgen receptor interaction. *J Biol Chem*. 2010;285(20):15286-15295. doi: 10.1074/jbc.M109.071456. Epub 2010 Mar 12.
10. Stoica J, Franke FT, Wellstein A, Szubaiko F, List H-J, Reiter R, Morgan E, Martin MB, Stoica A. Estradiol Rapidly Activates Akt via the ErbB2 Signaling Pathway. *Molecular Endocrinology*. 2003;17:818-830.
11. Vamesu S. Angiogenesis and ER/PR status in primary breast cancer patients: an analysis of 158 needle core biopsies. *Rom. J. Morphol. Embryol*. 2007;48:25-31.
12. Ahmad N, Kumar R. Steroid hormone receptors in cancer development: A target for cancer therapeutics. *Cancer Letters*. 2011;300:1-9.
13. Wang Y, Romigh T, He X, Orloff MS, Silverman RH, Heston WD, Eng C. Resveratrol regulates the PTEN/AKT pathway through androgen receptor-dependent and -independent mechanisms in prostate cancer cell lines. *Hum. Mol. Genet*. 2010;19:4319-4329.
14. Spirina LV, Usynin YA, Kondakova IV, Yurmazov ZA, Slonimskaya EM, Kolegova ES. The AKT-mTOR Signalling Pathway in Kidney Cancer Tissues. *AIP Conf Proc*. 2015;1688: 080004-1-5.
15. Спирина ЛВ, Усынин ЕА, Кондакова ИВ, Юрмазов ЗА, Слонимская ЕМ. Влияние таргетной терапии на содержание транскрипционных, ростовых факторов, протеинкиназы TOR и активности внутриклеточных протеиназ у больных диссеминированным раком почки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015;60(6):768-772.
16. Spirina LV, Usynin EA, Kondakova IV, Yurmazov ZA, Slonimskaya EM. Effect of Target Therapy on the Content of Transcription and Growth Factors, Protein Kinase TOR, and Activity of Intracellular Proteases in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Bull Exp Biol Med*. 2016. 60(6):798-801.
17. Горбунов АК, Спирина ЛВ, Усынин ЕА, Слонимская ЕМ, Кондакова ИВ. Роль транскрипционного фактора в развитии рака предстательной железы, связь с особенностями гормональной рецепции и уровнем активации АКТ/m-TOR-сигнального пути. *Успехи молекулярной онкологии*. 2016;3:54.
18. Zellweger T1, Gunther S, Zlobec I, Savic S, Sauter G, Moch H, Mattarelli G, Eichenberger T, Curschellas E, Rufnacht H, Bachmann A, Gasser TC, Mihatsch MJ, Bubendorf L. Tumour growth fraction measured by immunohistochemical staining of Ki67 is an independent prognostic factor in preoperative prostate biopsies with small-volume or low-grade prostate cancer. *Int J Cancer*. 2009;124(9):2116-23.
19. Dunsmuir WD1, Gillett CE, Meyer LC, Young MP, Corbishley C, Eeles RA, Kirby RS. Molecular markers for predicting prostate cancer stage and survival. *BJU Int*. 2000 Nov;86(7):869-78.

Array-CGH в диагностике геномных болезней у детей с врожденными пороками сердца и экстракардиальной патологией

Слепухина А.А.^{1,2}, Скрыбин Н.А.¹, Кашеварова А.А.¹,
Новикова М.А.³, Лифшиц Г.И.², Лебедев И.Н.¹

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия; a.slepukhina@medgenetics.ru

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

Каждый сотый новорожденный имеет порок сердца, и в 10% случаев они являются причиной младенческой смертности. Генетические изменения могут стать основой возникновения сердечно-сосудистых аномалий. У части пациентов с врожденными пороками сердца, сопровождающимися экстракардиальной патологией, могут быть выявлены патогенные вариации числа копий ДНК. В настоящем исследовании 15 пациентам в возрасте от 1 месяца до 4 лет, перенесшим оперативное лечение по поводу врожденного порока сердца, был проведен полногеномный анализ с использованием ДНК-микрочипов высокого разрешения SurePrint G3 Human Genome CGH Microarray Kit, 8x60K. Все пациенты имели экстракардиальную патологию. У 7 из 15 (46%) детей выявлены патогенные и вероятно патогенные вариации числа копий ДНК: у 4 пациентов диагностирован синдром микроделеции 22q11.2, по одному пациенту имели синдромы микроделеции 7q11.23 и микроделеции 1p36, еще один пациент имел микродупликацию в регионе 20p13. Полученные данные свидетельствуют о том, что aCGH отличается высокой диагностической ценностью при выявлении геномного дисбаланса у детей с врожденными пороками сердца и экстракардиальной патологией.

Ключевые слова: вариации числа копий ДНК, врожденные пороки сердца, микроделеции, микродупликации, ДНК-микрочипы.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Array-CGH in diagnostics of genomic diseases in children with congenital heart diseases and extracardiac pathology

Slepukhina A.A.^{1,2}, Skryabin N.A.¹, Kashevarova A.A.¹,
Novikova M.A.³, Lifshits G.I.², Lebedev I.N.¹

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia; e-mail: a.slepukhina@medgenetics.ru

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Meshalkin Siberian Federal Biomedical Research Center, Novosibirsk, Russia

Each hundredth newborn has a heart defect, and it is the cause of infant mortality in 10% of cases. Genetic changes can become the basis for the occurrence of cardiovascular anomalies. The part of patients with congenital heart defects (CHD) and extracardiac pathology have pathogenic copy number variations. In the present study 15 patients aged 1 month to 4 years, who underwent operative treatment for CHD, were examined using high-resolution DNA microarrays SurePrint G3 Human Genome CGH Microarray Kit, 8x60K. All patients had an extracardiac pathology. Seven out of 15 (46%) children had pathogenic and probably pathogenic copy number variations: 4 patients – microdeletion syndrome 22q11.2, one – microdeletion syndromes 7q11.23, microdeletion 1p36, microduplication at the 20p13. Thus, aCGH has a high diagnostic power in detecting genomic imbalance in children with CHD and extracardiac pathology.

Key words: Copy number variations, congenital heart defects, microdeletion, microduplication, microarray.

Введение

Сравнительная геномная гибридизация на ДНК-чипах (array-CGH, aCGH) — метод молекулярного кариотипирования, нашедший свое применение и получивший признание в области нейрокогнитивных заболеваний, в 2011 году рекомендованный для диагностики геномного дисбаланса у лиц с расстройствами аутистического спектра (РАС), задержкой развития, интеллектуальной недостаточностью, когнитивными расстройства-

ми и множественными пороками развития [1]. Его широкое применение послужило установлению доли генетической патологии, обусловленной вариациями числа копий ДНК (Copy Number Variations, CNVs), под которыми понимают наличие фрагментов ДНК размером более одной тысячи пар нуклеотидов, по числу копий отличающихся от референсного генома [1]. Возникающие системные изменения связывают с увеличением или уменьшением дозы множества генов, расположен-

ных в участке, подверженном изменению числа копий ДНК и с расстройством координации экспрессии генов [2], что приводит к развитию микроделеционных и микродупликационных синдромов (ММС). В англоязычной литературе CNVs изначально были отнесены к геномным заболеваниям, т.к. выявлялись в ходе полногеномного анализа, как правило, с использованием микрочипов, с отсутствием данных по их структурному положению [3]. В классификации, применяемой клиническими генетиками, CNVs скорее были бы отнесены к хромосомным заболеваниям в результате структурных хромосомных перестроек. Доля выявляемых патогенных CNVs варьирует в разных нозологических группах. При умственной отсталости неясной этиологии она составляет 14—18% случаев [4]; при аутизме и РАС — от 6 до 10% случаев [5]; при спонтанных прерываниях беременности — 1—13% случаев, причем доля CNVs с неизвестной клинической значимостью в этой группе может достигать до 40% [6].

Активное использование аCGH в диагностике у детей с врожденными пороками сердца (ВПС) пока является сравнительно новым направлением и активно внедряется с 2014—2015 гг. Это связано с накоплением информации о клинической значимости CNVs, а также о присутствии генов, участвующих в кардиогенезе, в составе микроструктурных перестроек хромосом. При ВПС доля патогенных CNVs может колебаться от 3 до 26% [7, 8]. Ключевыми в формировании такого разброса являются критерии формирования групп сравнения: синдромальный или несиндромальный порок сердца; изолированный или сочетанный порок; CNV выявлена пренатально или постнатально; CNV унаследована или возникла *de novo*; установление доли патогенных CNVs в определенных нозологических группах.

Среди выявляемых вариаций можно выделить «рекуррентные» и редкие CNVs. И те, и другие, могут лежать в основе ВПС. К числу рекуррентных CNVs в основном относятся известные микроделеции регионов 22q11, 7q11.23, 17p13, соответствующие синдромам Ди Джорджи, Вильямса, Миллера—Дикера. Как правило, это достаточно хорошо воспроизводимые хромосомные перестройки одинакового размера, с повторяющимися точками разрывов, возникающие из-за ограничений региона низкокопийными повторами ДНК (или другими повторяющимися элементами генома), что способствует неаллельной гомологичной рекомбинации — основному молекулярно-генетическому механизму, лежащему в основе формирования повторяющихся CNVs. Существует ряд других молекулярных механизмов, которые приводят к формированию редких CNVs [9]. Абсолютное большинство микроделеционных синдромов, в том числе затрагивающих области 22q11, 8p23.1, 7q11.23, 16p13, 17p11, 17p13, приводя к множественному повреждению органов и систем, сопровождаются ВПС. ВПС при микроделециях или микродупликациях хромосом являются столь же высо-

копенетрантным признаком, как и для хромосомных аномалий. Например, при трисомии 21 ВПС характерны для 60—80% больных, а при микроделеции 22q11 — для 60—85% пациентов.

Более того, почти все выявляемые ВПС: дефект межжелудочковой или межпредсердной перегородок, стеноз выносящих отделов, уменьшение камер сердца, транспозиция сосудов — являются общими как для фенотипического проявления анеуплоидий, так и для патогенных CNVs. Особенностью пороков сердца для большинства ММС является отсутствие строгой специфичности повреждения, что становится одной из ключевых проблем дифференциальной диагностики заболеваний в пренатальном периоде. Клинический полиморфизм вызывает серьезные затруднения как при выявлении специфики встречаемости определенных морфологических изменений, так и при продумывании дизайна научного исследования, что напрямую отражается в разбросе оценочных значений частоты CNVs в нозологической структуре ВПС. Ввиду сложности генетической организации CNVs, систематизация данных затруднена, тем не менее, невозможно переоценить вклад микрочиповых исследований в диагностику геномного дисбаланса. При интерпретации получаемых результатов врач лабораторной диагностики сталкивается с тремя пока не нашедшими свое однозначное и логическое объяснение проблемами: неполная пенетрантность CNVs; клинический полиморфизм пороков сердца, что осложняет формирование группы риска для проведения исследования; неясное клиническое значение, что особенно характерно для впервые выявленных или редких CNVs.

В обзоре Лалани с соавторами у пациентов с пороками сердца описано около 40 CNVs, в клиническую картину которых входит более 20 типов кардиоваскулярных аномалий, причем при одном и том же синдроме обязательно встречаются различные варианты пороков и их сочетания [8]. Особенности морфологического повреждения сердца пока недостаточно изучены в силу редко проводимой на практике диагностики геномного дисбаланса у пациентов с ВПС. Для микроделеций, известных достаточно давно, такая специфичность установлена. Например, для синдрома микроделеции 22q11 характерны конотрункальные пороки, для микроделеции 7q11.23 — сужение восходящего отдела аорты (надклапанный стеноз аорты) [2]. Как правило, микроделеции в регионах 22q11 и 7q11.23 не встречаются у условно здоровых лиц, что не всегда характерно для некоторых других CNVs.

Таким образом, изучение характеристик выявленной структурной перестройки, ее размера, захватываемых генов и регуляторных областей, вероятно, поможет объяснить клинический полиморфизм и тяжесть проявлений ММС. Тем не менее, ведущим в понимании формирования пороков сердца остается ген-кандидатный подход.

Материал и методы

Обследовано 15 детей, перенесших оперативное лечение по поводу ВПС. Средний возраст больных ($M \pm s$) составил $20,7 \pm 13$ месяцев (от 1 месяца до 4 лет). Среди обследованных пациентов было 10 мальчиков и 5 девочек. Все пациенты имели ВПС и экстракардиальную патологию. Диагноз ВПС устанавливался на основании эхокардиографических данных, согласно рекомендациям РКО, а также клинических, электрокардиографических, биохимических и патологических характеристик заболевания с оценкой физиологических изменений кровотока и гемодинамики порока [10]. Согласно протоколу исследования, критерием включения являлось сочетание ВПС с экстракардиальной патологией. К экстракардиальной патологии были отнесены: врожденные пороки развития других органов и систем, лицевые дизморфии, установленные заболевания и/или глобальное отставание в развитии, задержка психического, психоречевого, речевого, психомоторного, интеллектуального и физического развития. Исследование одобрено локальным этическим комитетом организации и проводилось после получения письменного согласия законных представителей детей.

ДНК для молекулярно-цитогенетического анализа выделяли с использованием стандартного протокола фенол-хлороформной экстракции из лимфоцитов периферической крови. Мечение 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 высокого разрешения SurePrint G3 Human Genome CGH Microarray Kit, 8x60K в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (Agilent Technologies, США). Данные получали с использованием программ 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 [11] и DECIPHER [12]. Описания функций генов, локализованных в областях CNV, были получены из баз данных NCBI Gene [13], GeneCards [14] и OMIM [15].

Верификацию выявленных патогенных и условно патогенных CNVs проводили с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР) по ранее опубликованному подробному описанию технологии [16]. В качестве контроля использовали праймеры на последовательность гена *HEXB*:

HEXB F 5'-CCGGGCACAATAGTTGAAGT-3'

HEXB R 5'-TCCTCCAATCTTGCCATAGC-3'

Подбор оптимальных праймеров для проведения реакции проводили с использованием программ Primer3 [17]. Проверку специфичности последовательности выбранных праймеров проводили с помощью программы Primer-BLAST [18].

Результаты и обсуждение

Среди 15 пациентов с ВПС и множественными аномалиями развития методом a-CGH у 7 (46%) были выявлены патогенные и условно патогенные CNVs. Подробная фенотипическая картина пациентов представлена в таблице.

Большой цилиндрический нос с узким основанием крыльев у пациентов № 1 и № 2, в сочетании со специфическими пороками сердца стали основанием в подозрении микроделеции 22q11. Пороки развития сосудов, формирующихся в ходе редукции аортальных дуг, являются частыми для этой микроделеции, составляя около 35% [8]. У пациентов с перерывом дуги аорты типа В микроделеция 22q11 встречается в 56% случаев [19]. Пациент № 11 также имел порок, схожий по формированию (перерыв дуги аорты тип А), но иные лицевые аномалии (широкая выступающая переносица, треугольная форма лица, микрогнатия). У пациентов № 1 и № 2 выявлены микроделеции $arr[hg18] \ 22q11.21(17299942_19770514) \times 1$ размером 2,47 млн п.н. и $arr[hg18] \ 22q11.21(17299942_18691763) \times 1$ размером 1,39 млн п.н. соответственно. У пациента № 11 не выявлено патогенных CNVs. У пациента № 3 была выявлена идентичная пациенту № 1 делеция $arr[hg18] \ 22q11.21(17299942_19770514) \times 1$, размером 2,47 млн п.н., а у пациента № 4 — делеция $arr[hg18] \ 22q11.21(17299942_19709958) \times 1$, размером 2,41 млн п.н. CNVs пациентов № 1 — № 4 захватывали ген *TBX1*, гаплонедостаточность которого приводит к развитию пороков сердца. Фенотипически пациенты имели множественные и более разнообразные проявления, по сравнению с типичной картиной микроделеции 22q11, а также нехарактерные признаки, такие как полимикрогирию (пациент № 3) и поведенческие отклонения (пациенты № 3 и 4). Ни один из четырех пациентов с делецией 22q11.21 на момент обследования не имел указаний в анамнезе на патологию тимуса, частые заболевания или иные признаки иммунодефицита. Ни у одного из них не было расщелины неба, в том числе подслизистой, хотя расщелина губы и/или неба является патогномичным признаком для этой микроделеции и наблюдается у 30—65% пациентов [15]. Пороки сердца у пациентов с микроделецией 22q11 были выявлены с рождения. В пренатальном периоде УЗ-маркеры ВПС и других аномалий не обнаружены. Пациент № 3 был проконсультирован генетиком, после получения результата стандартного цитогенетического исследования о нормальном кариотипе, у генетика больше не наблюдался.

Пациент № 5 с микроделецией $arr[hg18] \ 7q11.23(72364514_73777326) \times 1$, размером 1,41 млн п.н., имел классический фенотип синдрома Вильямса. Делеция включала ген *ELN*, мутации в котором лежат в основе развития надклапанного стеноза аорты.

Клинико-фенотипическая характеристика пациентов и результаты а-CGH анализа (патогенные и условно патогенные CNVs)

№	Возраст (мес.)	CNV	ВПС	Лицевые аномалии	Экстракардиальная патология и микроаномалии развития
1	2	3	4	5	6
1	1	arr[hg18] 22q11.21 (17299942_19770514)x1 dn	Аберрантная левая подключичная артерия. ДМЖП. Двустворчатый аортальный клапан.	Большой цилиндрический нос с узким основанием крыльев.	Врожденная гидронефротическая трансформация обеих почек 3 степени, двусторонний гидроуретер. Двусторонний крипторхизм. Церебральная ишемия 1 ст., острый период, синдром гиперактивности.
2	26	arr[hg18] 22q11.21 (17299942_18691763)x1 dn	Атрезия легочной артерии, тип В. ДМЖП, ДМПП. Трикуспидальная недостаточность 2 ст., Множественные большие аортолегочные коллатерали. МАРС: ложная хорда в полости левого желудочка.	Большой цилиндрический нос с узким основанием крыльев.	Синдром двигательных нарушений, нарушение сна. ППЦНС, СДВГ. Хроническая венозная и артериальная гипоксемия. Дистрофия 1-2 ст.
3	31	arr[hg18] 22q11.21 (17299942_19770514)x1	Тетрада Фалло	Большой цилиндрический нос с узким основанием крыльев.	Аномалия развития головного мозга, полимикрогирия левой теменной доли. Задержка темпов психического развития сочетанного генеза, когнитивные особенности. ЗППР. СДВГ.
4	25	arr[hg18] 22q11.21 (17299942_19709958)x1	Тетрада Фалло	Лобные бугры, широкое основание носа, маленькие ноздри, эпикант, приоткрытый рот, пухлая нижняя губа	Глобальная задержка развития, СДВГ, отсутствие речи, поведенческие отклонения — детская мастурбация.
5	15	arr[hg18] 7q11.23 (72364514_73777326)x1 dn	Надклапанный аортальный стеноз	Короткий нос с вздернутым кончиком и развернутыми ноздрями, большие пухлые губы, звездчатая радужка	ЗППР, добавочные соски.
6	15	arr[hg18] 1p36.33-p36.32 (749625_3987303)x1	ДМЖП	Лобные бугры, широкая впавшая переносица, миндалевидный разрез глаз, эпикант.	ЗМР и ЗППР. Долихоцефалия. Низкорасположенные уши. Удлинение средней и концевой фаланг 4 пальца ноги. Беременность наступила в результате ЭКО.
7	4	arr[hg18] 20p13 (2412867_3824216)x3 mat	ДМЖП, ООО, ОАП, Недостаточность кровообращения 2 ст. Частичный аномальный дренаж легочных вен в верхнюю полую вену. Высокая легочная гипертензия.	Припухлость век, большие щеки, нос грушевидный, квадратная форма головы	Недоношенность 33 нед. Бронхолегочная дисплазия. Умеренная наружная гидроцефалия. Аномалия строения бронхиального дерева правого легкого. Дыхательная недостаточность 2 ст.; УЗИ 20 нед.: ВПС, ЗВУР тяж. ст.
8	2	Не выявлено патогенных и условно патогенных вариантов.	Коарктация аорты. ДМЖП. ОАП. ООО. Трикуспидальная недостаточность 1 ст. Легочная гипертензия 1 ст.	Телекант, гипертелоризм.	ППЦНС, синдром мышечной дистонии, синдром вегето-висцеральных нарушений. Гидронефротическая трансформация правой почки. Уретерогидронефроз справа III-IV ст. Дистрофия 2 ст. УЗИ 22 нед.: Spina bifida, ВПС, гиперэхогенный кишечник, врожденный порок мочеполовой системы.
9	20	Не выявлено патогенных и условно патогенных вариантов.	ДМПП. Митральная недостаточность 1-2 ст. Легочная гипертензия 2 ст. Общий семейный анамнез ВПС.	Лобные бугры. Гипертелоризм, эпикант, антимонголоидный разрез глаз, впавшая широкая переносица, открытый рот с пухлой вывернутой нижней губой, микрогнатия, низко посаженные уши	ППЦНС, дистрофия. ЗМР и ЗППР, СДВГ, частые ОРВИ. Макроцефалия, брахидактилия. Задержка роста.

Таблица (окончание)

1	2	3	4	5	6
10	25	Не выявлено патогенных и условно патогенных вариантов.	ДМЖП. Аневризма межжелудочковой перегородки. Ложная хорда в полости ЛЖ. ООО. Подклапанный аортальный стеноз. Митральная недостаточность 1 ст. Трикуспидальная недостаточность 1 ст, Легочная гипертензия 1 ст.	Широкое основание носа.	ЗПРР. ППЦНС. Дистрофия 1-2 ст. Осложненный семейный анамнез: синдром аутизма и интеллектуальной недостаточностью.
11	48	Не выявлено патогенных и условно патогенных вариантов.	Аорто-легочное окно (II тип). Перерыв дуги аорты (типа А). ДМЖП. ДМПП. ОАП. Трикуспидальная недостаточность 2 ст.	Треугольное лицо, широкая выступающая переносица, прямые брови, короткий нос, короткий фильтр, ретро-, микрогнатия, острый подбородок, треугольные зубы, дефекты ушей.	Рецидивирующий бронхит. ДН 1-2 ст. по обструктивному типу. Асимметричная воронкообразная деформация грудной клетки. Пупочная грыжа, крипторхизм. Варусная деформация стоп. ЗПРР. Изменения формы головы по типу долихоцефалии (выступающий затылок). Смещение макушки.
12	15	Не выявлено патогенных и условно патогенных вариантов.	Единственный желудочек сердца, левый, одноприточный. Трикуспидальная атрезия тип 1В. ДМПП. ОАП. Абберрантная правая подключичная артерия. Вторичная легочная гипертензия.	Низкий лоб, лобные бугры, широкая впавшая переносица, ноздри прижаты, круглый мясистый кончик носа, короткий фильтр крупный рот, одутловатые щеки, готическое небо. Деформация ушных раковин.	ППЦНС, синдром внутричерепной гипертензии. ЗВУР 2 ст. Язвенно-некротический энтероколит. Брахицефалия, незаращение большого родничка. Кожная синдактилия 2, 3 пальцев стоп, сандалевидная щель. ЗРР. Задержка роста.
13	17	Не выявлено патогенных и условно патогенных вариантов.	ДМЖП, ДМПП. Аневризма межпредсердной перегородки Трикуспидальная недостаточность 1 ст. Легочная гипертензия 2 ст. Добавочные хорды в полости ЛЖ	Эпикант, назальный мост, нос вздернут, ноздри развернуты, фильтр длинный сглаженный, уменьшение средней трети лица, большие уши.	Атрезия пищевода, нижний трахеопищеводный свищ. Бронхолегочная дисплазия новая форма. ППЦНС, синдром вегето-висцеральных дисфункций, СДВГ, ЗМР и ЗПРР. Деформация стоп. Хроническая белково-энергетическая недостаточность 2 ст. Задержка роста.
14	32	Не выявлено патогенных и условно патогенных вариантов.	Тетрада Фалло	Лобные бугры. Гипертелоризм незначительный, эпикант, впалая переносица, микрогнатия, рот приоткрыт, зубы неровные — неправильное прорезывание	Долихоцефалия (выступающий затылок), смещение макушки. Врожденная аномалия развития верхней левой конечности: укорочение, отсутствие локтевой кости, костей кисти, один трехфаланговый палец. Множественные пятна цвета кофе с молоком. Гипотрофия, гипотиреоз, пиелозктазия, миопия -2/-3, ангиопатия сетчатки, УЗИ 32 нед. — пиелозктазия, ЗВУР 1 ст., ЗМР, ЗРР. Множественные очаги в глубоких отделах височной доли справа, в мосте, в передних долях и средних ножках мозжечка с обеих сторон неясного генеза.
15	35	Не выявлено патогенных и условно патогенных вариантов.	Общий артериальный ствол 1 тип. ДМЖП. ООО. Высокая легочная гипертензия	Миндалевидный разрез глаз, удлинённый фильтр, ноздри прижаты. Аномалия уха (двойной противозавиток).	Врожденная аномалия развития костной системы: аномалия крестцово-копчикового отдела, двусторонняя пяточно-варусная косолапость, гипоспадия венечная форма. Пахово-мошоночная грыжа (оперирован), крипторхизм (оперирован). Стеноз левого главного бронха. Поперечная складка ладони. Деформация желчного пузыря. Гипотонус мышц. Выраженная ЗПРР. СДВГ. Поведенческие отклонения.

Примечание. ДМЖП — дефект межжелудочковой перегородки; ДМПП — дефект межпредсердной перегородки; ЗВУР — задержка внутриутробного развития; ЗМР — задержка моторного развития; ЗПРР — задержка психоречевого развития; ОАП — открытый артериальный проток; ООО — открытое овальное окно; ППЦНС — перинатальное поражение центральной нервной системы; СДВГ — синдром дефицита внимания и гиперактивности

У пациента № 6 выявлена микроделеция $arr[hg18]1p36.33-p36.32(749625_3987303) \times 1$, размером 3,24 млн п.н., включающая критический регион для развития аномалий сердца, содержащий два гена, участвующих в патогенезе пороков развития данного органа — *SKI* и *PRDM16* [20, 21]. Данная аберрация обуславливает синдром микроделеции 1p36. Из особенностей анамнеза: беременность наступила с использованием вспомогательных репродуктивных технологий после четырех лет бесплодия. Делеция 1p36 является весьма распространенной (1:5000), наряду с микроделцией 22q11, имеет фенотипически разнообразные проявления с преимущественным поражением нервной системы, пациенты могут иметь как отставание в развитии или порок сердца, так и сочетанное поражение нескольких систем одновременно [21].

Пациент № 7 преждевременно рожден на 33 неделе беременности. Помимо бронхолегочной дисплазии недоношенных детей, у него отмечалась аномалия строения бронхиального дерева. Микроудупликация $arr[hg18]20p13(2412867_3824216) \times 3$ размером 1411 т.п.н. была расценена как потенциально патогенная, так как отсутствует в таком виде в DGV, содержит 5 генов, кодирующих энзимы, ген транскрипционного фактора *EBF4*, влияющий на миграцию клеток нервного гребня, гены, ответственные за половое созревание, деторождение (гены гонадотропин релизинг гормона (ГРнГ) и окситоцина). Ген *ADAM33*, также включенный в регион дупликации, связан с межклеточными взаимодействиями, ассоциирован с ранней детской астмой и участвует в регуляции функционирования легких [22]. Ген *CENPB* кодирует высококонсервативный белок, являющийся компонентом центромеры, в том числе экспрессируется в гладкомышечных клетках сосудов и связан с перекрестной активацией MAP-киназного пути [23]. Известны описания пациентов с делецией региона 20p13, который частично пересекается с найденным в генах ГРнГ и окситоцина. У двух пациенток описаны отклонения в наступлении полового созревания, предположительно возникшие из-за изменения доз указанных генов [24]. Для дальнейшего прогноза репродуктивного здоровья пациентки педиатру и родителям следует внимательно отслеживать клинические изменения в пубертатном периоде. У другой пациентки с делецией региона 20p13, перекрывающейся с выявленной дупликацией описаны сердечно-сосудистые мальформации [12]. Микроудупликация унаследована от матери, соответственно, возможно влияние данной микроудупликации на экспрессию гена окситоцина, который запускает процесс родов, и может приводить к преждевременным родам. В любом случае феномен требует дальнейшего более детального изучения. Сходные микроудупликации в регионе 20p13 в базе DECIPHER отмечены как CNVs с неясным клиническим значением.

У пациентов № 8—15 не было выявлено патологических CNVs, подробные фенотипы приведены с целью формирования у читателя представления об экстракардиальной

патологии в группе пациентов с риском генетических заболеваний и понимания, что на данном этапе нет четких клинических критериев разделения таких пациентов.

Все выявленные CNVs подтверждены методом РТ-ПЦР. У пациентов № 1, 2, 5 микроделеции возникли *de novo*, у пациентов № 3, 6 проверено наследование только от матерей — делеции не унаследованы, пациент № 4 — усыновлен, материал родителей не доступен. У пациента № 7 подтвержденная микроудупликация в регионе 20p13 оказалась материнского происхождения.

Таким образом, молекулярная диагностика геномного дисбаланса на ДНК-чипах у пациентов с пороками сердца является достаточно эффективным методом выявления заболеваний. Вероятно, дальнейшим шагом, по диагностике генетических дефектов у пациентов с сочетанной патологией должно быть полноэкзомное или полногеномное секвенирование, которое дает хорошие результаты: так, среди 1213 пациентов с ВПС, сочетающимися с нейрокогнитивными заболеваниями, у 20% были найдены точковые мутации [25].

Учитывая, что ВПС является первой нозологией, по поводу которой ребенок получает медицинскую помощь, ранняя диагностика генетического заболевания будет способствовать более критичной и внимательной оценке состояния пациента до и после оперативного вмешательства, а также может повлиять на срок назначения операции. Наличие патогенной CNV влияет на прогноз заболевания, его течение, развитие послеоперационных осложнений, что отражено в публикациях по наиболее изученному по своему клиническому течению синдрому микроделеции 22q11 [26, 27]. Сочетание сопутствующей дисфункции органов и систем является фактором операционного риска и влияет на прогноз для дальнейшей жизнедеятельности, даже при качественной своевременной хирургической коррекции ВПС. Как правило, ВПС диагностируется у пациента сразу после рождения и, в зависимости от его тяжести, подвергается оперативному лечению. Если достигнута компенсация состояния, основным лечащим врачом пациента является кардиолог, ребенок значительное время находится на стационарном лечении, как правило, у генетика не обследуется и не наблюдается. Таким образом, обследование у генетика на этапе кардиологического лечения или перед кардиохирургическим вмешательством и проведение молекулярно-цитогенетической диагностики является наиболее рациональным.

Так как успешность хирургического лечения ВПС является определяющим и критичным фактором для снижения детской смертности, многие специалисты подтверждают особую важность пренатальной, неонатальной, предоперационной диагностики наследственных заболеваний, и её влияние на восстановительный послеоперационный период [28, 29]. Поэтому выявление геномных заболеваний является первоочередной задачей при формировании групп риска, профилактируемых и усиленно контролируемых пациентов с пороками сердца по развитию каких-либо послеоперационных осложнений. Ранняя по-

становка диагноза генетического заболевания является имманентной частью нехирургического риска, т.к. не может быть модифицирована, в отличие, например, от инфекции. Существуют и некоторые отдаленные прогностические факторы, которые могут повлиять на здоровье ребенка в целом, например, риск развития шизофрении и шизотипического спектра заболеваний. Шизофрения развивается у 25% пациентов с микроделецией 22q11, риск развития шизотипических состояний у них в 8 раз выше среднепопуляционного [30, 31].

Выявление наследственных заболеваний в пренатальный период, период новорожденности, у детей раннего 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.

Список литературы

- Kearney HM, Thorland EC, Brown KK et al. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011;13(7):680-5. doi:10.1097/GIM.0b013e3182217a3a.
- Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res.* 2013;112(4):707-20. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300853.
- Simmons AD, Carvalho CMB, Lupski JR. What Have Studies of Genomic Disorders Taught Us About Our Genome? B: Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). Vol 838.; 2012:1-27. doi:10.1007/978-1-61779-507-7_1.
- Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JAS, Ophoff RA. Genome Arrays for the Detection of Copy Number Variations in Idiopathic Mental Retardation, Idiopathic Generalized Epilepsy and Neuropsychiatric Disorders: Lessons for Diagnostic Workflow and Research. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135(3-4):174-202. doi:10.1159/000332928.
- Persico AM, Napolioni V. Autism genetics. *Behav Brain Res.* 2013;251:95-112. doi:10.1016/j.bbr.2013.06.012.
- Bagheri H, Mercier E, Qiao Y et al. Genomic characteristics of miscarriage copy number variants. *Mol Hum Reprod.* 2015;21(8):655-661. doi:10.1093/molehr/gav030.
- 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;28(22):2778-84. doi:10.1093/eurheartj/ehl560.
- Lalani SR, Belmont JW. Genetic basis of congenital cardiovascular malformations. *Eur J Med Genet.* 2014;57(8):402-13. doi:10.1016/j.ejmg.2014.04.010.
- Кашеварова АА, Лебедев ИИ. Геномная архитектура хромосомных болезней человека. *Генетика.* 2016;52(5):511-528.
- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Рекомендации по количественной оценке структуры и функции камер сердца. *Российский кардиологический журнал.* 2012;3(95):3-28.
- DGV. Available at: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>.
- Firth HV. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet.* 2009;84:524-533.
- NCBI Gene. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.
- GeneCards. Available at: <http://www.genecards.org/>.
- OMIM. Available at: <http://www.omim.org/>.
- Слепухина АА, Кашеварова АА, Скрыбин НА и др. Алгоритм молекулярно-цитогенетической диагностики микроделеционных синдромов врожденных пороков развития. В сборнике: Методические рекомендации по медицинским технологиям диагностики и лечения хромосомных, орфанных и многофакторных заболеваний человека/ под редакцией проф. В.А. Степанова. Академиздат. Новосибирск; 2016:175-194.
- Primer3. Available at: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>.
- primer-blast. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
- Peyvandi S, Lupo PJ, Garbarini J, и др. 22q11.2 deletions in patients with conotruncal defects: data from 1,610 consecutive cases. *Pediatr Cardiol.* 2013;34(7):1687-94. doi:10.1007/s00246-013-0694-4.
- Zaveri HP, Beck TF, Hernandez-Garcia A et al. Identification of critical regions and candidate genes for cardiovascular malformations and cardiomyopathy associated with deletions of chromosome 1p36. *PLoS One.* 2014;9(1):e85600. doi:10.1371/journal.pone.0085600.
- Jordan VK, Zaveri HP, Scott DA. 1p36 deletion syndrome: an update. *Appl Clin Genet.* 2015;8:189-200. doi:10.2147/TACG.S65698.
- Wang X, Li W, Huang K et al. Genetic variants in ADAM33 are associated with airway inflammation and lung function in COPD. *BMC Pulm Med.* 2014;14:173. doi:10.1186/1471-2466-14-173.
- Robitaille G, Christin M-S, Clement I et al. Nuclear autoantigen CENP-B transactivation of the epidermal growth factor receptor via chemokine receptor 3 in vascular smooth muscle cells. *Arthritis Rheum.* 2009;60(9):2805-16. doi:10.1002/art.24765.
- Martin MM, Vanzo RJ, Sdano MR et al. Mosaic deletion of 20pter due to rescue by somatic recombination. *Am J Med Genet Part A.* 2016;170(1):243-248. doi:10.1002/ajmg.a.37407.
- Homsy J, Zaidi S, Shen Y et al. De novo mutations in congenital heart disease with neurodevelopmental and other congenital anomalies. *Science (80-).* 2015;350(6265):1262-1266. doi:10.1126/science.aac9396.
- O'Byrne ML, Yang W, Mercer-Rosa L et al. 22q11.2 Deletion syndrome is associated with increased perioperative events and more complicated postoperative course in infants undergoing infant operative correction of truncus arteriosus communis or interrupted aortic arch. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;148(4):1597-1605. doi:10.1016/j.jtcvs.2014.02.011.
- Landis BJ, Cooper DS, Hinton RB. CHD associated with syndromic diagnoses: peri-operative risk factors and early outcomes. *Cardiol Young.* 2016;26(1):30-52. doi:10.1017/S1047951115001389.
- Трунина ИИ. Факторы риска хирургического лечения врожденных пороков сердца в группе новорожденных: авт.-реф. на соискание учёной степени докт. мед. наук 14.01.05. М.; 2012.
- Токмакова КА. Экстракардиальная патология, как фактор, определяющий прогноз хирургической коррекции при врожденном пороке сердца у детей раннего возраста: авт.-реф. на соискание учёной степени канд. мед. наук 14.01.05. М.; 2013.
- Vangkilde A, Olsen L, Hoeffding LK et al. Schizophrenia Spectrum Disorders in a Danish 22q11.2 Deletion Syndrome Cohort Compared to the Total Danish Population — A Nationwide Register Study. *Schizophr Bull.* 2016;42(3):824-831. doi:10.1093/schbul/sbv195.
- Van L, Boot E, Bassett AS. Update on the 22q11.2 deletion syndrome and its relevance to schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry.* 2017;1. doi:10.1097/YCO.0000000000000324.

Спектр структурных вариаций генома у больных с ишемической болезнью сердца

Слепцов А.А.¹, Назаренко М.С.^{1,2,3}, Скрыбин Н.А.¹, Казанцев А.Н.², Барбараш О.Л.², Пузырев В.П.^{1,3}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия
e-mail: alexei.sleptcov@medgenetics.ru

Предполагается, что вариации числа копий участков ДНК (copy number variation, CNV) могут вносить вклад в формирование генетической структуры многофакторных заболеваний, тем самым объясняя определенную долю их наследуемости. Вместе с тем, поиск CNV у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) с использованием матричной сравнительной геномной гибридизации (array comparative genome hybridization, aCGH) ранее не проводился. Цель исследования заключалась в оценке спектра и характеристике CNV у больных с ИБС с использованием технологии aCGH. Скрининг CNV выполнен с применением высококоразрешающих микрочипов SurePrint G3 Human CGH+SNP 2x400 K (Agilent Technologies). Тестируемые образцы ДНК получены из лейкоцитов периферической крови мужчин с ИБС (n = 10). В качестве референсной использовалась ДНК мужчины европейского происхождения (Agilent Euro Male, Agilent Technologies). Всего в лейкоцитах идентифицировано 90 CNV, среди них — 72 (80%) содержат гены, белковые продукты которых участвуют в иммунновоспалительном ответе, обеспечивают функционирование обонятельных рецепторов, а также ферментов метаболизма. Гены, картированные в области CNV в хромосомных сегментах 1p22.2 (*GBP3*), 1p21.1 (*AMY2B*) и 22q11.23 (*GSTT1*, *LOC391322*), ранее были связаны с атеросклерозом и его факторами риска.

Ключевые слова: вариации числа копий участков ДНК, ишемическая болезнь сердца.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование было проведено при поддержке гранта Российского научного фонда №14-15-00305.

Spectrum of structural variations in patients with coronary heart disease

Sleptsov A.A.¹, Nazarenko M.S.^{1,2,3}, Skryabin N.A.¹, Kazantsev A.N.², Barbarash O.L.², Puzyrev V.P.^{1,3}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

² Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation
e-mail: alexei.sleptcov@medgenetics.ru

It is expected that copy number variation (CNV) potentially contribute to the formation of a genetic structure of complex diseases thus they would explain a part of the missing heritability. However, a search for CNV in patients with coronary heart disease (CHD) using high-resolution technique of array comparative genome hybridization (aCGH) has not previously been conducted. The goal of our study was to evaluate CNV spectrum and characteristics in patients with CHD using aCGH. The CNV screening was performed using high-resolution microarrays SurePrint G3 Human CGH + SNP 2x400 K (Agilent Technologies). The DNA samples were obtained from peripheral blood leukocytes of men with CHD (n = 10). Agilent Euro male DNA was used as a reference. We identified 90 CNV, among them 72 (80%) contained genes encode proteins related to the immune and inflammatory response, activity of olfactory receptors and metabolic enzymes. Genes mapped in the CNV region in the 1p22.2 (*GBP3*), 1p21.1 (*AMY2B*) and 22q11.23 (*GSTT1*, *LOC391322*), were previously reported as associated with atherosclerosis and its risk factors.

Key words: copy number variation, coronary heart disease.

Введение

Определение вклада генетической компоненты в риск развития ишемической болезни сердца (ИБС) является одной из приоритетных задач предиктивной и прецизионной медицины. Проведение широкогеномных ассоциативных исследований (Genome-Wide Association Study, GWAS) позволило идентифицировать более 150 локусов, ассоциированных с ИБС, 46 из которых

подтверждались в нескольких работах [1]. В то же время, анализируя только один тип генетической изменчивости, в частности однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism, SNP), можно объяснить лишь малую долю наследуемости патологии [2]. Предполагается, что определенный вклад в риск развития и течение ИБС вносят вариации числа копий участков ДНК (copy number variation, CNV).

Данный тип структурных вариаций характеризуется вариабельностью участков ДНК по количеству их копий в геноме [3]. Такие вариации могут быть описаны с позиции референсного генома как CNV-амплификации или увеличение числа копий участков ДНК и CNV-делеции — уменьшение числа их копий. В зависимости от своего размера и локализации, данные варианты могут изменять структуру нуклеотидной последовательности регуляторных элементов и генов, влияя на функциональную активность генов, изменяя функцию белков. Предполагается, что редкие и крупные CNV обладают большим эффектом на фенотип, тогда как малые и частые вносят меньший вклад в его развитие [4].

Существует небольшое количество работ, связывающих CNV с ИБС или её факторами риска. Факторами риска развития ИБС является изменение числа копий нуклеотидной последовательности в гене *LPA*, что детерминирует уровень его белкового продукта в сыворотке крови индивидов, а CNV в гене *LDLR* приводит к развитию семейной гиперхолестеринемии [3]. У мужчин из когорты Northwick Park Heart Study II (Великобритания) идентифицированы CNV в генах *TLR4*, *SREBP1* и *IL-6ST*, которые показали ассоциацию с концентрацией аполипопротеинов AI и B [6]. Семь CNV, картированных в локусах 1p21.3, 1q31.2 (*CDC73*), 1q42.2 (*DISC1*), 3p21.31 (*CDCP1*), 10q11.21 (*RET*) 12p12.3 (*PIK3C2G*) и 16q23.3 (*CDH13*), связаны с ИБС в сочетании с гиперлипидемией у населения о. Тайвань [5]. В то же время, в работе другого исследовательского коллектива не установлено вклада CNV в риск развития атеросклероза коронарных артерий и инфаркта миокарда с ранней манифестацией [7]. Различные результаты данных работ могут быть связаны с популяционными особенностями выборок, а также различиями в отношении изучаемых клинических форм данного заболевания. Кроме того, в данных работах для анализа CNV использовались микрочипы к однонуклеотидному полиморфизму.

В настоящее время широкое распространение получила матричная сравнительная геномная гибридизация (array comparative genome hybridization, aCGH) с использованием которой можно в ходе одного эксперимента осуществить полногеномный скрининг CNV. Микрочипы SurePrint G3 Human CGH+SNP 2x400 K (Agilent Technologies) позволяют идентифицировать относительно небольшие по размеру вариации числа копий участков ДНК со средним разрешением около 7,2 т.п.н. Не исключено, что использование технологии aCGH выявит структурные вариации в тех регионах генома, которые ранее не были проанализированы с использованием микрочипов к однонуклеотидным вариантам.

Цель настоящего исследования заключалась в оценке спектра и характеристике CNV у больных с ИБС с использованием технологии aCGH.

Материалы и методы

В исследуемую группу вошли 10 мужчин с ИБС, славянского происхождения. Средний возраст индивидов составил $60,7 \pm 7,9$ года. Все мужчины имели выраженное атеросклеротическое поражение коронарных артерий, артериальную гипертензию, гиперхолестеринемию, сахарный диабет 2 типа и инфаркт миокарда в анамнезе. Формирование выборок и клиническая характеристика больных проходили на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (г. Кемерово). Все индивиды подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Проведение данного исследования одобрено этическим комитетом НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводилось с применением наборов QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen), согласно протоколу производителя. Оценка качества и концентрации выделенных образцов ДНК проведена на спектрофотометре NanoDrop (Thermo Scientific) и путём электрофореза в 1% агарозном геле.

Скрининг CNV в образцах ДНК 10 пациентов выполнен методом aCGH на микрочипах SurePrint G3 Human CGH+SNP 2x400K (G4842A, Agilent Technologies), согласно протоколу производителя. В качестве референсной ДНК использовалась «ДНК мужчины европейского происхождения» (Agilent Euro Male, # 5190, Agilent Technologies). Сканирование микрочипов проводилось на приборе Agilent SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies). Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Первичная обработка изображений микрочипов выполнялась в программе Feature Extraction v.11. Для увеличения надежности получаемых результатов использовался принцип конкордантности результатов с применением двух методов: ADM-2, реализованного в программной оболочке Agilent Genomic Workbench v.7 (Agilent Technologies), и метода циркулярной бинарной сегментации (CBS, circular binary segmentation), реализованного в программном пакете DNACopy (Bioconductor) статистической среды R [9,10]. CNV, выявленные у каждого пациента с использованием этих двух алгоритмов, были объединены по границам внешних проб, фланкирующих перестройку. За CNV принимались отклонения от общего централизованного геномного профиля с порогом $\log_2 \pm 0,25$ для ADM-2 и $\log_2 \pm 1,0$ для CBS алгоритмов. CNV имели размер не менее 1 т.п.н. и не менее 3-х последовательных CGH-проб.

Для аннотации выявленных CNV и генов, локализованных в их области, использовались базы данных: Database of Genomic Variants (DGV, сборка NCBI37, hg19), NCBI RefSeq, HuGE Navigator Database, DECIPHER и

ENCODE. Анализ наибольшей представленности генов, локализованных в области CNV, проводился с использованием программы Web-based GENE SeT AnaLysis Toolkit [11]. Категории KEGG установлены методом гипергеометрического статистического анализа, где уровни значимости скорректированы с использованием поправки Беньямини—Хохберга.

Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании при проведении скрининга CNV методом aCGH в лейкоцитах у пациентов с ИБС идентифицировано 90 вариаций. На одного пациента в среднем приходилось $38,4 \pm 7,5$ CNV. Размер CNV варьировал от 4,4 т.п.н. до 2 млн п.н. (в среднем 217 т.п.н.). Большинство CNV представляло собой уменьшение числа копий участков ДНК — 57 (63%). Пятьдесят пять (61%) из 90 CNV выявлены более чем у одного больного. Среди идентифицированных вариаций числа копий участков ДНК 72 (80%) содержали гены, согласно базе данных NCBI RefSeq.

При функциональной аннотации генов, картированных в областях CNV, выявлено, что их белковые продукты участвуют в иммунновоспалительном ответе (*GBP3*, *IGSF3*, *PRKRA*, *BTNL3*, *APOBEC3B*, *APOBEC3A*, *LOC391322*, а также семейство генов *DEFB*, $p_{FDR} < 0,05$), обеспечивают функционирование обонятельных рецепторов (*OR2*, *OR4* и *OR11*, $p_{FDR} < 0,05$). Кроме того, белковые продукты генов, подверженных вариациям числа копий участков ДНК, вовлечены в метаболизм различных субстратов (*AMY2B*, *CELA2A*, *CELA2B*, *UGT2B17*, *UGT2B28*, *GSTT1*, $p_{FDR} < 0,05$). Этот результат согласуется с тем, что наиболее часто CNV встречаются в регионах генома, содержащих гены, белковые продукты которых отвечают за взаимодействие с факторами внешней среды [11,12].

Согласно литературным данным, связаны с атеросклерозом и его факторами риска были гены *GBP3*, *GSTT1*, *LOC391322* и *AMY2B*. В лейкоцитах у 7 пациентов с ИБС в локусе 1p22.2 идентифицировано увеличение числа копий размером 4,4 т.п.н., захватывающее ген *GBP3*. Его продукт принадлежит семейству гуанилат-связывающих белков. Их функция заключается в защите против вирусных и бактериальных инфекций. Экспрессия данных генов происходит в ответ на выделение интерферонов. Белки, включая *GBP3*, могут участвовать в активации макрофагов при атеросклерозе. Увеличение экспрессии гена *Gbp3* выявлено в пенистых клетках атеросклеротических бляшек синуса аорты на поздних стадиях патологического процесса у мышей *ApoE*^{-/-}, находящихся на «западной диете» в течение 14 недель [13, 14].

Обнаруженное в лейкоцитах у одного пациента с ИБС уменьшение числа копий участков ДНК в хромосомном сегменте 22q11.23, размером 28,3 т.п.н., затрагивает два гена — *GSTT1* и *LOC391322*. Уменьшение числа копий участков ДНК в гене *GSTT1* приводит к от-

сутствию активности фермента глутатион-S-трансферазы, ослаблению защиты клетки от влияния окислительного стресса и формированию предрасположенности к артериальной гипертензии и атеросклерозу [15, 16]. В то же время, ген *LOC391322* или *DDTL* (D-dopachrome tautomerase-like) кодирует белок из семейства MIF (ингибирующий фактор миграции макрофагов). Данные белки являются провоспалительными цитокинами, которые обеспечивают продукцию и освобождение различных воспалительных молекул в Т-клетках, моноцитах, в том числе и в клетках атеросклеротических бляшек. Причем увеличение экспрессии гена *MIF* происходит в клетках атеросклеротических бляшек при нарастании степени тяжести патологического процесса и его нестабильности [17, 18]. Показано, что уровень MIF в сыворотке может быть прогностическим маркером в отношении течения острого ишемического инсульта и положительно коррелирует с размером области поражения головного мозга и неблагоприятным исходом [19]. В связи с этим уменьшение числа копий участков ДНК в двух генах (*GSTT1* и *LOC391322*) может с одной стороны, через снижение защиты клеток от окислительного стресса предрасполагать к заболеванию, а с другой, уменьшая продукцию и освобождение провоспалительных цитокинов, обеспечивать его более благоприятный исход. Согласно базе данных DGV, в локусе 22q11.23 часто встречаются микроструктурные перестройки в виде увеличения и уменьшения числа копий участков ДНК. По-видимому, противоречивые ассоциации между делецией в гене *GSTT1* и риском гипертензии, а также атеросклеротическим поражением коронарных и сонных артерий могут быть связаны с типом и размером хромосомной перестройки в данном локусе.

Также в настоящем исследовании у 7 пациентов в лейкоцитах выявлена делеция в регионе 1p21.1, которая затрагивает ген *AMY2B*, полиморфизм которого ассоциирован с сахарным диабетом 2 типа [20]. Белковый продукт данного гена — альфа-амилаза поджелудочной железы катализирует начальный этап расщепления крахмала и гликогена пищи. Изменение числа копий участков ДНК в гене *AMY2B* коррелирует с уровнем амилазы в сыворотке, причем высокая активность амилазы улучшает гомеостаз глюкозы и снижает риск развития метаболического синдрома, как фактора риска ИБС [21].

Выводы

В результате настоящего исследования впервые в лейкоцитах у пациентов с ИБС картированы регионы генома с CNV с использованием aCGH. Существенная часть идентифицированных CNV — редкие по частоте и небольшие по размеру. Белковые продукты генов, расположенных в области CNV, участвуют в иммунновоспалительном ответе, обеспечивают функционирование обонятельных рецепторов, а также ферментов метабо-

лизма. Гены, картированные в области CNV в хромосомных субсегментах 1p22.2 (*GBP3*), 1p21.1 (*AMY2B*) и 22q11.23 (*GSTT1*, *LOC391322*) связаны с атеросклерозом и его факторами риска. Однако большая часть идентифицированных CNV не была ранее ассоциирована с атеросклерозом и его факторами риска, в связи с этим она имеет потенциал для раскрытия доли «недостающей наследуемости» ИБС, а также молекулярных мишеней для профилактики, диагностики и лечения данной патологии.

Список литературы

1. Björkegren JLM, Kovacic JC, Dudley JT, Schadt EE. Genome-Wide Significant Loci: How Important Are They? *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(8):830-845. doi:10.1016/j.jacc.2014.12.033.
2. Eichler EE, Flint J, Gibson G, et al. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet*. 2010;11(6):446-450. doi:10.1038/nrg2809.
3. Pollex RL, Hegele RA. Copy Number Variation in the Human Genome and Its Implications for Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2007;115(24):3130-3138. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.677591.
4. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009;461(7265):747-753. doi:10.1038/nature08494.
5. Shia W-C, Ku T-H, Tsao Y-M, et al. Genetic copy number variants in myocardial infarction patients with hyperlipidemia. *BMC Genomics*. 2011;12(Suppl 3):S23. doi:10.1186/1471-2164-12-S3-S23.
6. Costelloe SJ, El-Sayed Moustafa JS, Drenos F, et al. Gene-targeted analysis of copy number variants identifies 3 novel associations with coronary heart disease traits. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5(5):555-560. doi:10.1161/CIRCGENETICS.111.961037.
7. Kathiresan S., Voight B.F. et al., Myocardial Infarction Genetics Consortium, Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants // *Nat. Genet*. 2009. V. 41. № 3. P. 334-341. doi: 10.1038/ng.327.
8. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Found Stat Comput Vienna Austria. 2016;0:{ISBN} 3-900051-07-0. doi:10.1038/sj.hdy.6800737.
9. Olshen AB, Venkatraman ES, Lucito R, Wigler M. Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics*. 2004;5(4):557-572. doi:10.1093/biostatistics/kxh008.
10. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Web Server issue):W77-83. doi:10.1093/nar/gkt439.
11. Ionita-Laza I, Rogers AJ, Lange C, Raby BA, Lee C. Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis. *Genomics*. 2009;93(1):22-26. doi:10.1016/j.ygeno.2008.08.012.
12. Girirajan S, Campbell CD, Eichler EE. Human Copy Number Variation and Complex Genetic Disease. *Annu Rev Genet*. 2011;45(1):203-226. doi:10.1146/annurev-genet-102209-163544.
13. Han BH. Interferon-gamma and lipopolysaccharide induce mouse guanylate-binding protein 3 (mGBP3) expression in the murine macrophage cell line RAW264.7. *Arch Pharm Res*. 1999;22(2):130-136. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10230502.
14. Goo YH, Son SH, Yechoor VK, Paul A. Transcriptional profiling of foam cells reveals induction of guanylate-binding proteins following western diet acceleration of atherosclerosis in the absence of global changes in inflammation. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(4). doi:10.1161/JAHA.115.002663.
15. Eslami S, Sahebkar A. Glutathione-S-transferase M1 and T1 null genotypes are associated with hypertension risk: A systematic review and meta-analysis of 12 studies. *Curr Hypertens Rep*. 2014;16(6). doi:10.1007/s11906-014-0432-1.
16. Song Y, Shan Z, Luo C, et al. Glutathione S-Transferase T1 (GSTT1) Null Polymorphism, Smoking, and Their Interaction in Coronary Heart Disease: A Comprehensive Meta-Analysis. *Hear Lung Circ*. 2017;26(4):362-370. doi:10.1016/j.hlc.2016.07.005.
17. Schmeisser A, Marquetant R, Illmer T, et al. The expression of macrophage migration inhibitory factor 1alpha (MIF 1alpha) in human atherosclerotic plaques is induced by different proatherogenic stimuli and associated with plaque instability. *Atherosclerosis*. 2005;178(1):83-94. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.08.038.
18. Prencipe G, Auriti C, Inglese R, Gallusi G, Dotta A, De Benedetti F. The macrophage migration inhibitory factor -173G/C polymorphism is not significantly associated with necrotizing enterocolitis in preterm infants. *J Pediatr Surg*. 2013;48(7):1499-1502. doi:10.1016/j.jpedsurg.2013.01.004.
19. Li Y-S, Chen W, Liu S, Zhang Y-Y, Li X-H. Serum macrophage migration inhibitory factor levels are associated with infarct volumes and long-term outcomes in patients with acute ischemic stroke. *Int J Neurosci*. 2017;127(6):539-546. doi:10.1080/00207454.2016.1211648.
20. Bailey JNC, Lu L, Chou JW, et al. The Role of Copy Number Variation in African Americans with Type 2 Diabetes-Associated End Stage Renal Disease. *J Mol Genet Med*. 2013;7(2013):61. doi:10.4172/1747-0862.1000061.
21. Nakajima K. Low serum amylase and obesity, diabetes and metabolic syndrome: A novel interpretation. *World J Diabetes*. 2016;7(6):112. doi:10.4239/wjcd.v7.i6.112.

Роль генов ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции в формировании структуры наследственной предрасположенности к привычному невынашиванию беременности

Трифонова Е.А.^{1,2}, Ганьжа О.А.², Габидулина Т.В.², Степанов В.А.¹

¹ НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск, ekaterina.trifonova@medgenetics.ru

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск

В настоящее время продолжается активный поиск генетических предикторов привычного невынашивания беременности (ПНБ), являющегося одной из наиболее важных проблем, оказывающих отрицательное воздействие на репродуктивное здоровье женщины и обуславливающих высокие показатели перинатальной заболеваемости и смертности. Поскольку невынашивание беременности рассматривается большинством авторов как многофакторное состояние, то ген-генные взаимодействия могут играть важную роль в этиологии данного заболевания, являясь одним из источников его «недостающей наследуемости» («missing heritability»). В связи с этим, целью представленной работы являлся анализ ассоциации с ПНБ полиморфных вариантов генов ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции, а также поиск межгенных взаимодействий, играющих значимую роль в формировании генетической предрасположенности к данной патологии. Показано, что в качестве генетических факторов, ассоциированных с предрасположенностью к данной патологии в русской этнической группе можно выделить аллели 677T гена *MTHFR* и 894T гена *NOS3*, а также генотипы 936CT и 936TT гена *VEGF*. Продемонстрирована значимая роль аддитивного и эпистатического эффектов межгенных взаимодействий изученных полиморфных вариантов генов *SERPINE-1*, *ACE*, *NOS3*, *MTHFR* и *VEGF* в формировании генетической архитектуры ПНБ. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой информативности оценки риска развития невынашивания беременности при анализе комбинации генотипов нескольких аллельных вариантов по сравнению с данными, полученными на уровне отдельных полиморфных маркеров.

Ключевые слова: привычное невынашивание беременности, однонуклеотидный полиморфный вариант, межгенные взаимодействия, эндотелиальная дисфункция.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

The role of angiogenesis and endothelial dysfunction genes to recurrent miscarriage susceptibility

Trifonova E.A.^{1,2*}, Ganzha O.A.², Gabidulina T.V.², Stepanov V.A.¹

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

² Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

The roles of genetic polymorphisms in the pathogenesis of recurrent miscarriage (RM) have been intensively studied. The main problems of active search for genetic predictors RM has become the phenomenon of «missing heritability». Complex diseases, including miscarriage are believed to have a polygenic basis and gene-gene interactions can play a significant role in the etiology of the disease. Gene-gene interactions can be a source of RM «missing heritability». This study was conducted to investigate the association of gene-gene interaction of angiogenesis and endothelial dysfunction genes polymorphisms and RM. It is shown that alleles of the 677T gene of the *MTHFR* gene, 894T of the *NOS3* gene, genotypes of the 936CT and 936TT of the *VEGF* gene are associated with a predisposition to this pathology in the Russian ethnic group. The significant role of additive and epistatic effects in the intergenic interactions of the polymorphic variants of the *SERPINE-1*, *ACE*, *NOS3*, *MTHFR*, and *VEGF* genes to recurrent miscarriage susceptibility has been demonstrated. It has been shown that the analysis of a combination of genotypes of several allelic variants is more informative in assessing the risk of developing miscarriage than an association analysis at the level of single polymorphic markers.

Keywords: recurrent miscarriage, single nucleotide polymorphism, gene-gene interactions, endothelial dysfunction.

Введение

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) остается одной из наиболее значимых проблем акушерства, оказывающих отрицательное воздействие на репродуктивное здоровье женщины и обуславливающих высокие показатели перинатальной заболеваемости и смертности. По

данным многих авторов, частота данного осложнения не имеет тенденции к снижению и составляет от 1 до 5% всех беременностей [1, 2, 3]. ПНБ — одна из самых трудных областей в репродуктивной медицине, так как этиология данного заболевания часто неизвестна, а современная диагностика и известные стратегии лечения, основанные на фактических данных, недостаточно эффективны [2, 4].

ПНБ является многофакторным заболеванием (МФЗ), развитию которого наиболее часто способствуют анатомические, инфекционные, иммунологические, эндокринные и генетические факторы в различных сочетаниях [3]. Согласно современным представлениям, в развитии ПНБ ранних сроков значимую роль играет наследственная предрасположенность со стороны родителей [3, 5, 6]. На сегодняшний день изучено более 230 генов-кандидатов ПНБ, имеющих отношение к тромбофилии и гиподифринолизу, метаболизму фолиевой кислоты и витамина B₁₂, функционированию эндотелиальных клеток, метаболизму гормонов, иммунному ответу и другим процессам (база данных «HuGE Navigator»). Однако необходимо отметить, что результаты большинства этих исследований противоречивы и плохо воспроизводимы [6, 7]. Тем не менее, при обобщенном анализе литературных данных можно выделить ряд генетических маркеров, продемонстрировавших ассоциацию с ПНБ в нескольких метаанализах: С677Т гена *MTHFR* (rs1801133), 4G/5G гена *SERPINE-1* (rs1799889), G894Т (rs2070744) гена *NOS3*, I/D-полиморфизм гена *ACE* (rs4646994), G215С (rs1042522) гена *TP53*, G634С (rs2010963) и С936Т (rs3025039) гена *VEGFA*, в связи с чем данные аллельные варианты несомненно представляют особый интерес при изучении предрасположенности к развитию ПНБ [8].

В последнее десятилетие фокус в исследованиях ассоциаций генетических маркеров с МФЗ человека постепенно смещается от оценки вклада отдельных полиморфных вариантов к определению эффектов

взаимодействия генов [9]. Поскольку ПНБ, несомненно, имеет полигенную основу, то ген-генные взаимодействия могут играть важную роль в этиологии данного заболевания, обуславливая противоречивые результаты проведенных ассоциативных исследований и являясь одним из источников его «недостающей наследуемости». В связи с вышеизложенным, целью представленной работы являлся анализ ассоциации с ПНБ полиморфных вариантов генов ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции, а также поиск межгенных взаимодействий, играющих значимую роль в формировании генетической предрасположенности к данной патологии.

Материалы и методы

Обследовано 592 женщины из русской этнической выборки. Первую группу составили пациентки с ПНБ, критерием включения в группу было наличие в анамнезе не менее 2-х самопроизвольных потерь беременности, не связанных с аномалиями развития или хромосомной патологией плода. Критериями исключения из исследования являлись наличие анатомических причин привычных потерь беременности, гормональные нарушения во время беременности, аномалии кариотипа родителей. Группу контроля составили женщины с физиологически протекавшей беременностью и благоприятным акушерским анамнезом. Характеристика обследованных групп представлена в табл. 1. Минимальный возраст пациенток составил 18 лет, максимальный —

Характеристика исследуемых групп

Таблица 1

Обследованные группы	Кол-во индивидов	Возраст, лет
Контрольная группа	339	27,29 ± 4,60
Женщины с ПНБ	253	29,59 ± 4,49

Краткая характеристика исследованных полиморфных вариантов

Таблица 2

Ген и его локализация на хромосоме	SNP	Локализация в гене (по данным базы NCBI)	Аллели	Предковый аллель
<i>ACE</i> 17q22-q24	I/D rs4646994	Инtron 16	I/D	D
<i>MTHFR</i> 1p36.3	C677T rs1801133	Экзон 5	C/T	C
<i>SERPINE1</i> 7q21.3-q22	5G/4G rs1799889	5'-UTR	4G/5G	5G
<i>NOS3</i> 7q36	G894T rs1799983	Экзон 7	G/T	G
<i>VEGF</i> 6p21.3	C936T rs3025039	3'-UTR	C/T	C
	G634C rs2010963	5'-UTR	G/C	G
<i>TP53</i> 17p13.1	G215C rs1042522	Экзон 4	G/C	G

44 года. По показателю среднего возраста исследуемые группы были сопоставимы. Образцы крови обследуемых были собраны на базе НИИ медицинской генетики и НИИ акушерства, гинекологии и репродукции (г.Томск) в течение 2010—2014 гг. Биологическим материалом для исследования служила ДНК, выделенная из венозной крови пациенток.

В работе проводился молекулярно-генетический анализ полиморфных вариантов шести генов-кандидатов подверженности к ПНБ, выбранных на основании на наших предыдущих исследованиях (табл. 2): *ACE* (ангиотензин-превращающего фермента), *MTHFR* (метилентетрагидрофолатредуктазы), *SERPINE-1* (ингибитора активатора плазминогена 1 типа), *NOS3* (эндотелиальной синтазы оксида азота), *TP53* (супрессора опухолевого роста P53), *VEGF* (фактора роста эндотелия сосудов) [8].

Генотипирование маркеров rs4646994, rs1801133, rs1799889, rs1799983 осуществляли согласно протоколам, описанным ранее [10—13]. Генотипирование полиморфных вариантов rs3025039, rs2010963, rs1042522 проводилось методом ПЦР в режиме реального времени с использованием линейных разрушаемых проб «TaqMan Genotyping Assay» («AppliedBiosystems»). Экспериментальные исследования проведены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием пакетов статистических программ «Statistica 10.0», «MDR» и «Haploview 4.2». При сравнении частот аллелей и генотипов между анализируемыми группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса или точный тест Фишера для числа наблюдений хотя бы в одной из ячеек таблицы сопряженности менее 5. Для оценки ассоциаций SNPs с патологическим фенотипом вычисляли отношение шансов (OR) и доверительные интервалы (CI) для отношения шансов (95% CI). Тест на соответствие распределения генотипов закону Харди—Вайнберга в обеих выборках проводили по критерию χ^2 . Критический уровень значимости различий p , при котором нулевая гипотеза об отсутствии различий отвергалась и принималась альтернативная, принимали равным 0,05. Анализ неравновесия по сцеплению (LD) проводился в программе «HaploView 4.2». LD между парами SNPs оценивалось с помощью коэффициента D' , предложенного Левонтином, и коэффициента корреляции r^2 Пирсона [14]. Анализ межгенных взаимодействий проводили в программе «Multifactor Dimensionality Reduction» методом снижения многомерной размерности, применяя алгоритм расширенного поиска (exhaustive search algorithm).

Результаты и обсуждение

Анализ распределения частот генотипов и аллелей в изученных выборках

В табл. 3 представлены распределение частот аллелей и генотипов исследованных полиморфных вариантов, соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди—Вайнберга и уровень значимости, полученный при сравнении групп больных с контрольными выборками.

Как видно, распределение частот генотипов во всех контрольных выборках соответствовало равновесию Харди—Вайнберга, а частоты аллелей и генотипов находились в диапазоне мировых данных.

Из семи исследованных полиморфных вариантов статистически значимые различия были выявлены для четырех маркеров: С677Т гена *MTHFR*, G894Т гена *NOS3*, G634С и С936Т гена *VEGF*. Так, аллель Т полиморфного варианта С677Т гена *MTHFR* был ассоциирован с повышенным риском подверженности ПНБ (OR = 1,41, CI: 1,08—1,84).

Известно, что несинонимичная замена С677Т гена *MTHFR* приводит к значительному снижению активности метилентетрагидрофолатредуктазы, обусловленному заменой аминокислотного остатка аланина на валин в области связывания данного фермента с ко-фактором флавин-аденин-динуклеотидом [15]. Данный вариант представляет интерес в связи с патологическими состояниями, ведущими к накоплению гомоцистеина в организме и повреждению эндотелия сосудов с последующей активацией внутрисосудистого свертывания и развитием ряда гестационных осложнений, включая и ПНБ [16].

Несмотря на большое количество исследований, посвященных выявлению ассоциации аллельного варианта С677Т гена *MTHFR* и ПНБ, единого мнения по этому поводу до сих пор нет. Согласно результатам ряда метаанализов, генетический вариант С677Т вносит значительный вклад в подверженность ПНБ [17, 18]. Однако другие исследования не обнаружили связи между аллельным вариантом С677Т гена *MTHFR* и идиопатическим ПНБ [19, 20]. Исходя из данных отечественных авторов, носительство аллеля 677Т гена *MTHFR* в 2 раза увеличивает риск развития неблагоприятных исходов периода гестации [21].

В настоящей работе была зафиксирована также ассоциация с ПНБ аллельного варианта G894Т гена *NOS3*. Частота генотипа GG894 аллельного варианта была повышена у женщин в контрольной группе по сравнению с группой ПНБ (при сравнении группы индивидов с генотипом GG и выборки пациенток с генотипами GT и TT $\chi^2 = 5,68$; $p = 0,02$), что может свидетельствовать о протективном значении данного генотипа в отношении развития данной патологии (OR = 0,72; CI: 0,57—0,92). Наряду с этим в группе с ПНБ наблюдалось статистически значимое увеличение частоты аллеля 894Т по сравнению с контрольной группой (38% против 30% соответственно), следовательно, аллель 894Т может быть предрасполагающим к возникновению данной патологии (OR = 1,39; CI: 1,09—1,77).

Распределение частот аллелей и генотипов в исследуемых группах

Исследуемые полиморфизмы (гены)			Исследуемые группы			
			ПНБ, N = 253	Контрольная группа, N = 339	OR, (95% CI)	Уровень значимости p для критерия χ^2 с поправкой Йетса ¹
C677T MTHFR	Частоты генотипов, %	CC	52	62	0,68 (0,49–0,94)	6,23 (p = 0,04*)
		CT	39	33	1,30 (0,93–1,83)	
		TT	9	5	1,70 (0,89–3,24)	
	Частота аллеля, %	T	28	22	1,41 (1,08–1,84)	6,47 (p = 0,01*)
	p^2		0,58	0,56		
I/D ACE	Частоты генотипов, %	II	25	25	0,99 (0,67–1,44)	0,06 (p = 0,97)
		ID	51	52	0,97 (0,70–1,35)	
		DD	24	23	1,05 (0,71–1,55)	
	Частота аллеля, %	D	49	49	1,02 (0,81–1,29)	0,04 (p = 0,85)
	p^2		0,65	0,44		
G894T NOS3	Частоты генотипов, %	GG	39	49	0,66 (0,47–0,92)	6,79 (p = 0,03*)
		GT	46	41	1,27 (0,91–1,76)	
		TT	15	10	1,50 (0,92–2,46)	
	Частота аллеля, %	T	38	30	1,39 (1,09–1,77)	6,92 (p = 0,009*)
	p^2		0,78	0,38		
G215C TP53	Частоты генотипов,%	CC	10	9	1,03 (0,59–1,81)	0,95 (p = 0,62)
		CG	39	43	0,85 (0,61–1,19)	
		GG	51	48	1,16 (0,83–1,61)	
	Частота аллеля, %	C	29	31	0,92 (0,71–1,19)	0,39 (p = 0,53)
	p^2		0,35	0,94		
G634C VEGF	Частоты генотипов,%	CC	19	8	2,59 (1,57–4,27)	25,70 (p<0,001*)
		CG	44	36	1,41 (1,01–1,98)	
		GG	37	56	0,46 (0,33–0,65)	
	Частота аллеля, %	C	41	26	1,97 (1,53–2,52)	28,57 (p<0,001*)
	p^2		0,13	0,13		
C936T VEGF	Частоты генотипов,%	CC	43	64	0,42 (0,30–0,58)	27,99 (p<0,001*)
		CT	44	30	1,85 (1,31–2,60)	
		TT	13	6	2,44 (1,35–4,41)	
	Частота аллеля, %	T	35	21	2,06 (1,58–2,68)	29,34 (p<0,001*)
	p^2		0,71	0,13		
4G/5G SERPINE-1	Частоты генотипов,%	4G/4G	30	32	0,90 (0,63–1,29)	0,99 (p = 0,61)
		4G/5G	55	51	1,18 (0,85–1,65)	
		5G/5G	15	17	0,87 (0,63–1,29)	
	Частота аллеля, %	5G	42	43	0,94 (0,74–1,20)	0,01 (p = 0,94)
	p^2		0,08	0,57		

Примечание. N – Количество индивидов в группе. ¹ – Значение критерия χ^2 с поправкой Йетса и/или точный критерий Фишера и уровень значимости (p) получены при сравнении частот генотипов и аллелей контрольной группы и группы с ПНБ; ² – Уровень значимости, достигнутый при оценке соответствия равновесию Харди–Вайнберга; * – статистически значимые различия между исследуемыми группами

Известно, что полиморфизм G894T гена *NOS3* представляет собой замену гуанина на тимин в позиции 894 в седьмом экзоне гена *NOS3*, что приводит к замене глутамина на аспарагин в оксигеназном домене фермента и изменению его каталитической активности [10]. Показано, что вариант G894T гена *NOS3* обуславливает уменьшение активности NO-синтазы, биодоступность оксида азота (NO) и снижение содержания NO в плазме крови [22]. Патогенетическая роль эндогенного NO при ПНБ связана с развитием эндотелиальной дисфункции, как в материнском организме, так и в фетоплацентарном комплексе [23]. Так, показаны существенные различия в активности NO-синтазы и уровня NO в плазме и эндометрии женщин с ПНБ при сравнении данных параметров с группой контроля [24, 25]. Принимая во внимание значимую роль NO-синтазы и оксида азота в процессах ангиогенеза, контроле сосудистого тонуса и антитромботических эффектах в эндометрии во время децидуализации и в плаценте на ранних сроках беременности, изменения в гене, кодирующем эндотелиальную NO-синтазу, могут служить потенциальными факторами предрасположенности к ПНБ [23].

Несколько метаанализов выявили тесную связь между вариантом G894T гена *NOS3* и идиопатическим ПНБ [23, 26, 27]. В китайской этнической группе было зафиксировано значимое снижение частоты аллеля 894G у пациенток с ПНБ [28], что согласуется с данными, полученными в популяциях индийцев [22], корейцев [29], а также в настоящей работе. Наряду с этим Shin S.J. и соавторы обнаружили, что генотип 894TT гена *NOS3* значимо чаще встречался в группе с ПНБ по сравнению с контрольной выборкой (OR = 2,39; CI:1,25—4,58; $p = 0,008$) [29]. В представленной работе также наблюдалось повышение частоты данного генотипа в группе с ПНБ по сравнению с контрольной группой (15% и 10% соответственно), однако эти различия не были статистически значимы. Следует отметить, что результаты ряда работ, посвященных анализу ассоциации полиморфизма G894T гена *NOS3* с ПНБ, не обнаруживают связи этого генетического маркера с данной патологией [30, 31].

В настоящей работе ассоциация с ПНБ была установлена также для маркеров G634C и C936T гена *VEGF* (табл. 3). Так, в группе пациенток с ПНБ отмечались статистически значимое повышение частоты генотипа CC (OR = 2,59; CI:1,57—4,27; $\chi^2 = 13,57$; $p = 0,0002$) и частоты генотипа CG (OR = 1,41; CI:1,01—1,98; $\chi^2 = 4,03$; $p = 0,044$) полиморфного варианта G634C по сравнению с контрольной группой. Частота аллеля 634C также была выше у женщин с ПНБ по сравнению с группой сравнения (OR = 1,97; CI:1,53—2,52; $\chi^2 = 28,57$; $p < 0,001$).

Второй изученный маркер гена *VEGF* — C936T также показал статистическую значимую ассоциацию с ПНБ: генотипы CT и TT встречались достоверно чаще в груп-

пе с ПНБ по сравнению с выборкой женщин с физиологическим течением беременности (OR = 1,85; CI:1,31—2,60; $\chi^2 = 11,75$; $p = 0,0006$ и OR = 2,44; CI:1,35—4,41; $\chi^2 = 8,21$; $p = 0,004$ соответственно). Аллель T полиморфного варианта C936T гена *VEGF* преобладал в группе ПНБ по сравнению с группой контроля (OR = 2,06; CI:1,58—2,68; $\chi^2 = 16,12$; $p < 0,001$). Таким образом, генотипы CT и TT аллельного варианта C936T, а также генотипы CC и GC полиморфизма G634C гена *VEGF* являются аллелями риска в структуре подверженности ПНБ у женщин г. Томска.

Аналогичные результаты были показаны в работе Ху Х. и соавторов [32]. Метаанализ, включающий 1832 пациентки с ПНБ и 2271 женщину с благоприятным акушерским анамнезом, продемонстрировал ассоциацию с ПНБ аллеля C (OR = 1,16, CI:1,03—1,31, $p = 0,01$) и генотипа CC (OR = 1,36, CI:1,06—1,74, $p = 0,02$) полиморфного варианта G634C. Наряду с этим было установлено, что аллель C (OR = 0,72, CI:0,56—0,93, $p = 0,01$) и генотип CC (OR = 0,69, CI:0,53—0,89, $p < 0,005$) варианта C936T обладают протективными свойствами в отношении развития ПНБ [32]. В то же время, в некоторых научных исследованиях связи между вариантами C936T и G634C гена *VEGF* и ПНБ обнаружено не было [33—35].

Известно, что фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) играет ключевую роль в регуляции ангиогенеза, так как увеличивает сосудистую проницаемость и является основным хемотаксическим и митогенным стимулом для эндотелиоцитов. Вышеперечисленные свойства обуславливают значимость VEGF как в процессах эмбрионального развития, так и в материнской сосудистой адаптации к беременности [36, 37]. В представленной работе с развитием ПНБ показана ассоциация полиморфных вариантов G634C и C936T гена *VEGFA*, расположенных соответственно в 5'- и 3'-нетранслируемых областях данного локуса и ассоциированных с вариабельностью уровня его транскрипта [38, 39]. Показано, что нарушение экспрессии гена *VEGFA* в плацентарной ткани может приводить к нарушениям перфузии в эндометрии, и как следствие к ряду неблагоприятных исходов беременности, включая ПНБ, внутриутробную гибель и задержку развития плода, а также преэклампсию [40].

В настоящей работе при сравнении обследованных групп не было выявлено статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов аллельных вариантов 4G/5G *SERPINE-1*, G215C *TP53* и I/D-полиморфизма гена *ACE*.

Таким образом, в качестве генетических факторов, ассоциированных с повышенной предрасположенностью к ПНБ и вовлеченных в формирование гиперкоагуляции и эндотелиальной дисфункции при беременности у русских можно выделить полиморфные варианты G894T гена *NOS3*, C677T гена *MTHFR*, а также C936T и G634C гена *VEGF*.

Анализ межгенных взаимодействий изученных генов-кандидатов ПНБ

Известно, что развитие МФЗ, в том числе и акушерских осложнений, обусловлено аддитивным действием множества генов и их аллельных вариантов, кумулятивный эффект которых может составлять до 20–70% общего риска, обусловленного генетическими факторами [41]. В связи с этим в настоящем исследовании был проведен анализ межгенных взаимодействий изученных генов-кандидатов ПНБ.

В результате MDR-анализа выявлено две модели для предсказания риска возникновения ПНБ (табл. 4).

Модель сочетания двух аллельных вариантов гена *VEGF* C936T (rs3025039) и G634C (rs2010963) (рис. 1) демонстрирует 10 из 10 непротиворечивых кросс-валидаций ($p = 0,001$). Балансовая точность всей модели составила 67,97%, чувствительность — 60,34%, специфичность — 75,59% ($p < 0,0001$).

Из рисунка видно, что предрасполагающими для формирования ПНБ у женщин г. Томска сочетаниями генотипов будут являться следующие: CC/CC; CG/CT; CC/CT; GG/TT; CG/TT; CC/TT (*VEGF* G634C/C936T соответственно). Комбинации GG/CC; GG/CT; CG/CC являются низкорисковыми для развития ПНБ.

Для оценки значимости данной модели в настоящей работе был проведен анализ неравновесия по сцеплению (LD) между изученными SNPs гена *VEGF*. Установлено, что в исследованных группах локусы C936T (rs3025039) и G634C (rs2010963) гена *VEGF* при наследовании не сцеплены между собой ($D' = 0,05$; $r^2 = 0,002$ для контрольной группы и $D' = 0,012$; $r^2 = 0,001$ для группы с ПНБ).

Необходимо отметить, что статистически значимые различия при сравнении исследуемых групп были показаны для пяти сочетаний генотипов из девяти обнаруженных (табл. 5). Так, было показано значимое увеличение частоты комбинации генотипов 936CT-634CC в группе с ПНБ по сравнению с контрольной группой (10,3% и 2,4% соответственно). Вычисленный коэффициент отношения шансов показал, что носительство данного сочетания генотипов повышает риск развития ПНБ более чем в 4 раза ($OR = 4,75$; $CI: 1,95–11,61$), в то время как при анализе ассоциации отдельных полиморфных вариантов показатель отношения шансов для дан-

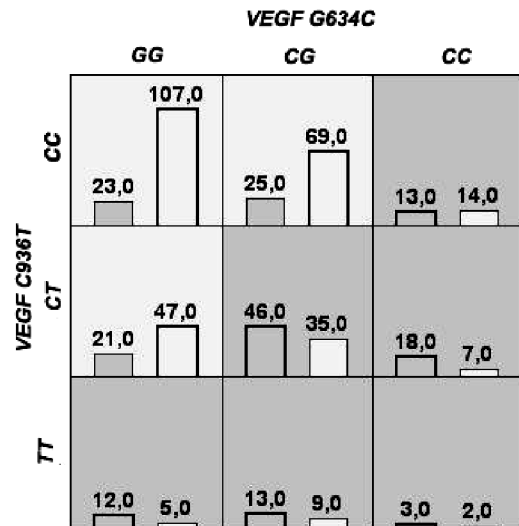


Рис. 1. Распределение сочетаний генотипов полиморфных вариантов генов *VEGF* C936T (rs3025039) и G634C (rs2010963) в группе больных ПНБ и в группе сравнения: темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска ПНБ, серые ячейки – генотипы пониженного риска, левые столбики – группа больных ПНБ, правые столбики – группа сравнения.

ных генотипов был существенно ниже: 936CT ($OR = 1,85$; $CI: 1,31–2,60$), 634CC ($OR = 2,59$; $CI: 1,57–4,27$). Также нами были обнаружены следующие рисковые сочетания генотипов: 936CT-634CG ($OR = 2,67$; $CI: 1,64–4,35$) и 936TT-634GG ($OR = 4,30$; $CI: 1,49–12,41$), частота которых в группе ПНБ была статистически больше, чем в контрольной группе (26,4% и 7,4% против 11,9% и 1,7% соответственно). Частота сочетания генотипов 936CC-634GG и 936CC-634CG была статистически выше в контрольной группе (36,3% и 23,4% соответственно) по сравнению с группой больных (13,2% и 14,4% соответственно). Это позволяет сделать вывод, что две данных комбинации генотипов снижают риск возникновения ПНБ и обладают протективным эффектом ($OR = 0,55$; $CI: 0,33–0,91$ и $OR = 0,27$; $CI: 0,16–0,44$ соответственно).

Интересно, что в исследуемых группах не выявлено сочетания генотипов, включающих все мутантные аллели (936TT-634CC). Можно предположить, что индивиды, наследующие все мутантные аллели по данным по-

Характеристика моделей межгенных взаимодействий исследуемых полиморфных маркеров

Таблица 4

Модель	Tr. Bal. Acc	Ts. Bal. Acc	Se	Sp	CV Cons	Общий p (χ^2)
C936T и G634C <i>VEGF</i>	0,6797	0,6739	0,6034	0,7559	10/10	$p < 0,001$ (28,94)
5G/4G <i>SERPINE-1</i> ; I/D <i>ACE</i> ; G894T <i>NOS3</i> ; C677T <i>MTHFR</i> ; C936T и G634C <i>VEGF</i>	0,8792	0,5914	0,8793	0,8644	9/10	$p < 0,001$ (121,09)

Примечание. Tr. Bal. Acc – тренировочная сбалансированная точность; Ts. Bal. Acc – тестируемая сбалансированная точность; Se – чувствительность модели, Sp – специфичность; CV Cons – кросс-валидация.

лиморфным вариантам являются редко встречающимися или нежизнеспособными, хотя это предположение требует дальнейшего исследования на более репрезентативной выборке.

Модель, включающая шесть полиморфных вариантов генов *SERPINE-1*, *ACE*, *NOS3*, *MTHFR* и *VEGF* (табл. 4) обладает CVC-согласованностью 9 из 10 ($p = 0,001$). Общая балансовая точность составила 87,19% при чувствительности 87,93% и специфичности 86,44% ($p < 0,0001$).

В рамках данной модели в исследуемых группах было обнаружено 258 из 729 возможных сочетаний, из которых

для дальнейшего анализа нами было отобрано 34 комбинации, встречающихся хотя бы в одной из исследуемых выборок с частотой более 1%. Для 4-х из 34-х анализируемых комбинаций генотипов были показаны статистически значимые различия (табл. 6). Отношение шансов (OR) и доверительный интервал (95% CI) удалось рассчитать только для 3-х сочетаний шести исследуемых локусов, так как при их наличии в обеих группах количество наблюдений было отлично от 0 [109ДГ]. В группе с ПНБ при сравнении с контрольной выборкой было выявлено увеличение частоты сочетаний 936СТ-634CG-677ТТ-4G/5G-894GT-DD (5,2% и 0,7% соответственно) и

Таблица 5

Частота встречаемости статистически значимых сочетаний генотипов гена *VEGF* в группе с ПНБ и контрольной группе

Сочетание генотипов (C936T-G634C)	Группа с ПНБ (n = 253)	Контрольная группа (n = 339)	Критерий χ^2 (p-уровень)
	Процентное соотношение		
CC-GG	13,2	36,3	27,89 (p<0,001)
CC-CG	14,4	23,4	5,01 (0,025)
CT-CG	26,4	11,9	15,26 (0,0001)
CT-CC	10,3	2,4	12,25 (0,005)
TT-GG	7,4	1,7	7,05 (0,008)

Примечание. n — количество индивидов в группе

Таблица 6

Частота встречаемости статистически значимых сочетаний генотипов локусов *VEGF*, *MTHFR*, *SERPINE-1*, *NOS3*, *ACE* в исследуемых группах

Сочетание генотипов C936T-G634C-C677T-4G/5G-G894T-I/D	Группа с ПНБ (n = 253)	Контрольная группа (n = 339)	Критерий Фишера
	Процентное соотношение		
936CC-634GG-677CC-4G/5G-894GG-II	0	2,7	p = 0,029
936CC-634GG-677CT-4G/5G-894GG-ID	0,6	3,4	p = 0,015
936CT-634CG-677ТТ-4G/5G-894GT-ID	2,9	0,3	p = 0,041
936CT-634CG-677ТТ-4G/5G-894GT-DD	5,2	0,7	p = 0,016

Примечание. n — количество индивидов в группе



Рис. 2. Дендрограмма межгенных взаимодействий локусов *MTHFR* C677T, *SERPINE-1* 5G/4G, *ACE* I/D, *NOS3* G894T, *TP53* G215C, *VEGF* C936T и G634C при ПНБ.

Длинные линии в дендрограмме описывают слабую взаимосвязь между маркерами. Короткие линии, соединяющие два предиктора, отражают сильное взаимодействие между локусами. Цвет каждой линии обозначает тип взаимодействия: красный и оранжевый представляют синергетические взаимодействия, т.е. комплементарности между локусами исследуемых генов, желто-коричневый — независимый эффект; зеленый и синий описывают аддитивный эффект, т.е. эффект полимерии каждого предиктора.

936СТ-634СG-677ТТ-4G/5G-894GT-II (2,9% против 0,3% соответственно). Установлено, что при наличии комбинации генотипов 936СТ-634СG-677ТТ-4G/5G-894GT-DD риск возникновения ПНБ увеличивается почти в 9 раз (OR = 8,70; CI:1,01-75,08), а при наличии 936СТ-634СG-677ТТ-4G/5G-894GT-ID — в 5 раз (OR = 5,20; CI:1,04-26,06). Сочетание генотипов 936СC-634GГ-677СТ-4G/5G-894GG-ID обладает протективным эффектом, так как снижает риск возникновения данного заболевания (OR = 0,20; CI:0,05—0,89).

Необходимо отметить, что при анализе данной модели взаимодействия изучаемых локусов получено небольшое количество значимых сочетаний генотипов, что обусловлено проблемой небольшого размера выборок, которая возникает при множественном тестировании вследствие увеличения числа подгрупп при возрастании количества взаимодействующих генов в обучающей выборке. Интересным представляется факт включения в данную модель аллельного варианта 4G/5G гена *SERPINE-1* и I/D-полиморфизма гена *ACE*, не продемонстрировавших в настоящем исследовании ассоциацию с ПНБ при анализе на уровне отдельных локусов.

Возможности программы MDR позволяют представить в виде дендрограммы вклад каждого SNP в риск развития ПНБ и оценить характер межгенных взаимодействий (рис. 2).

Исходя из данной дендрограммы, между маркерами I/D гена *ACE*, 5G/4G гена *SERPINE-1* и G215C гена *TP53* отмечается межгенное взаимодействие с явным синергичным эффектом, в то же время ген-генные взаимодействия между локусами С677Т гена *MTHFR*, G894Т гена *NOS3*, С936Т и G634С гена *VEGF* носят аддитивный характер в отношении риска развития ПНБ у женщин русской национальности г. Томска.

Заключение

В настоящее время продолжается активный поиск генетических маркеров ПНБ. При этом возникла и стала важнейшей проблема «недостающей наследуемости» («missing heritability»), одним из источников которой могут являться межгенные взаимодействия. В рамках представленного исследования был осуществлен анализ роли полиморфных вариантов генов регуляции ангиогенеза и генов, ассоциированных с развитием эндотелиальной дисфункции, в подверженности к ПНБ. Показано, что в качестве генетических факторов, ассоциированных с предрасположенностью к данной патологии в русской этнической группе можно выделить аллели 677Т гена *MTHFR* и 894Т гена *NOS3*, а также генотипы 936СТ и 936ТТ гена *VEGF*. Продемонстрирована значимая роль аддитивного и эпистатического эффектов межгенных взаимодействий изученных полиморфных вариантов генов *SERPINE-1*, *ACE*, *NOS3*, *MTHFR* и *VEGF* в формировании генетической архитектуры ПНБ. Вышеописанные результаты свидетельствуют о более высо-

кой информативности оценки риска развития невынашивания беременности при анализе комбинации генотипов нескольких аллельных вариантов по сравнению с данными, полученными на уровне отдельных полиморфных маркеров. Дальнейшие исследования ген-генных взаимодействий в структуре подверженности к ПНБ могут стать основой для постепенного заполнения пробелов в «недостающей наследуемости» данной патологии.

Список литературы

1. Сидельникова ВМ, Сухих ГТ. Невынашивание беременности. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010. 534с.
2. Радзинский ВЕ, Соловьева АВ, Оленев АС. Невынашивание беременности. Что в перспективе? Репродуктивная медицина. 2014;3-4(20):8-10.
3. Rull K, Nagiraja L, Laan M. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. *Frontiers in Genetics*. 2012;3(34):1-13.
4. Sergi C, Al Jishi T, Walker M. Factor V Leiden mutation in women with early recurrent pregnancy loss: a meta-analysis and systematic review of the causal association. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;291(3):671-679.
5. Kolte AM, Nielsen HS, Steffensen R, et al. Inheritance of the 8.1 ancestral haplotype in recurrent pregnancy loss. *EvolMedPublicHealth*. 2015;(1):325-331.
6. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В. С. Баранова. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. 528с.
7. Shi X, Xie X, Jia Y, et al. Maternal genetic polymorphisms and unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Clin Genet*. 2017 Feb;91(2):265-284.
8. Трифонова ЕА, Ганьжа ОА, Габидулина ТВ и др. Генетические факторы в развитии привычного невынашивания беременности: обзор данных мета-анализов. *Акушерство и гинекология*. 2017;(4):14-20.
9. Aschard H, Lutz S, Maus B, et al. Challenges and opportunities in genome-wide environmental interaction (GWEI) studies. *Hum Genet*. 2012 Oct;131(10):1591-613.
10. Nasr HB, Dimassi S, M'hadhbi R, et al. Functional G894T (rs1799983) polymorphism and intron-4 VNTR variant of nitric oxide synthase (NOS3) gene are susceptibility biomarkers of obesity among Tunisians. *Obesity research & clinical practice*. 2016;10(4):465-475.
11. Blasiak J, Smolarz B. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G promoter polymorphism is not associated with breast cancer. *Acta Biochimica Polonica*. 2000;47(1):191-199.
12. Kalita J, Somarajan BI, Kumar B, et al. A study of ACE and ADD1 polymorphism in ischemic and hemorrhagic stroke. *Clinica chimica acta*. 2011;412(7):642-646.
13. El-Aziz TAA, Mohamed RH. Influence of MTHFR C677T gene polymorphism in the development of cardiovascular disease in Egyptian patients with rheumatoid arthritis. *Gene*. 2017;610:127-132.
14. Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-265.
15. Ren A, Wang J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2006;86(6):1716-1722.

16. Трифонова ЕА, Габидулина ТВ, Агаркова ТА и др. Гомоцистеин, полиморфизмы гена MTHFR и осложнения беременности. *Акушерство и гинекология*. 2011; 2: 8-15.
17. Cao Y, Xu J, Zhang Z, et al. Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Gene*. 2013; 514:105-111.
18. Chen H, Yang X, Lu M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss in China: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2016;293(2):283-290.
19. Yousefian E, Kardi MT, Allahveisi A. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism in Iranian women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2014;16(7):1-4.
20. Isaoglu U, Ulug P, Delibas IB, et al. The association between inherited thrombophilia and recurrent pregnancy loss in Turkish women. *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology*. 2014;41(2):177-181.
21. Медянная ИВ, Гудинова ЖВ. Распространенность генетических полиморфизмов, ассоциируемых с тромбозом, ригидными и сосудистыми осложнениями гестационного периода, в когорте беременных женщин российской популяции. *Акушерство и гинекология*. 2012;4:10-15.
22. Parveen F, Faridi RM, Alam S, et al. Genetic analysis of eNOS gene polymorphisms in association with recurrent miscarriage among North Indian women. *Reproductive biomedicine online*. 2011;23(1):124-131.
23. Perez N, Peterlin B, Volk M, et al. A critical update on endothelial nitric oxide synthase gene variations in women with idiopathic recurrent spontaneous abortion: genetic association study, systematic review and meta-analyses. 2015;21(5):466-478.
24. Banerjee P, Ghosh S, Dutta M, et al. Identification of key contributory factors responsible for vascular dysfunction in idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. *PloS one*. 2013;8(11):1-9.
25. Najafi T, Novin MG, Ghazi R, et al. Altered endometrial expression of endothelial nitric oxide synthase in women with unexplained recurrent miscarriage and infertility. *Reproductive biomedicine online*. 2012;25(4):408-414.
26. Su MT, Lin SH, Chen YC. Genetic association studies of angiogenesis- and vasoconstriction-related genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2011;17(6):803-12.
27. Cao Y, Zhang Z, Xu J, et al. Genetic association studies of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in women with unexplained recurrent pregnancy loss: a systematic and meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2014;41(6):3981-3989.
28. Luo L, Li DH, Wei SG, et al. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene associated with recurrent miscarriage. *Genetics and Molecular Research*. 2013;12(3):3879-3886.
29. Shin SJ, Lee HH, Cha SH, Kim JH, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (? 786T> C, 4a4b, 894G> T) and haplotypes in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2010;152(1):64-67.
30. Zammiti W, Mtraoui N, Mahjoub T. Lack of consistent association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms, homocysteine levels and recurrent pregnancy loss in Tunisian women. *American journal of reproductive immunology*. 2008;59(2):139-145.
31. Yang C, Fangfang W, Jie L, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion (I/D) polymorphisms and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2012;29(1):1167-1173.
32. Xu X, Du C, Li H, et al. Association of VEGF genetic polymorphisms with recurrent spontaneous abortion risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015; 10(4):e0123696.
33. Lee HH, Hong SH, Shin SJ, et al. Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion. *Fertility and sterility*. 2010;93(4):1244-1247.
34. Traina E, Daher S, Moron AF, et al. Polymorphisms in VEGF, progesterone receptor and IL-1 receptor genes in women with recurrent spontaneous abortion. *Journal of reproductive immunology*. 2011;88(1):53-57.
35. Papazoglou D, Galazios G, Papatheodorou K, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertility and sterility*. 2005;83(4):959-963.
36. Lash GE, Cartwright JE, Whitley GS. The effects of angiogenic growth factors on extravillous trophoblast invasion and motility. *Placenta*. 1999;20:661-667.
37. Yalcintepe SA, Silan F, Hacivelioglu SO, et al. Fetal VEGF genotype is more important for abortion risk than mother genotype. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2014;3(2):88-94.
38. Amirchaghmaghi E, Rezaei A, Moini A, et al. Gene expression analysis of VEGF and its receptors and assessment of its serum level in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Cell J*. 2015;4(16):538-545.
39. Galazios G, Papazoglou D, Tsikouras P, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009;22(5):371-378.
40. Andraweera PH, Dekker GA, Roberts CT. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Human reproduction update*. 2012;18(4):436-457.
41. Cordell HJ. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nat Rev Genet*. 2009 Jun;10(6):392-404.

Общность и специфичность генетической компоненты подверженности сахарному диабету первого типа и хроническому вирусному гепатиту С

Гончарова И.А.^{1,2}, Тарасенко Н.В.^{1,3}, Марков А.В.¹, Назаренко М.С.^{1,2,3},
Белобородова Е.В.³, Кондратьева Е.И.³, Пузырев В.П.^{1,3}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия, irina.goncharova@medgenetics.ru

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

³ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

Фибротические процессы, протекающие в разных органах и тканях и приводящие к формированию органной недостаточности, характеризуются многими общими чертами. Однако патогенетическая значимость и генетическая составляющая, детерминирующая фиброгенез при различных патологических состояниях, может иметь как общие, так и ярко выраженные специфические особенности. Цель настоящего исследования заключалась в оценке общности и специфичности генетической компоненты подверженности заболеваниям, характеризующимся фибротической трансформацией различных органов: почек при сахарном диабете 1-го типа (СД1) и печени при хроническом вирусном гепатите С (ХВГС). Выборка пациентов с ХВГС включала 184 человека (71% мужчин, 29% женщин; средний возраст 40,2 ± 13,9 года). Группа больных СД1 составила 285 человек (47% мужчин и 53% женщин; средний возраст 25,27 ± 12,6 года). Контрольная группа представляла собой популяционную выборку (n = 285, 54% мужчин и 46% женщин, средний возраст 56,7 ± 8,4 года). Генотипирование 48 SNP выполнено методом масс-спектрометрии на приборе Sequenom MassARRAY® (США). Статистическая обработка данных проводилась в программной среде R с использованием стандартного пакета «stats». Выявлено, что предрасполагающими к развитию СД1 являлись генотипы: AA rs3765124 гена *ADAMDEC1* (OR = 1,52 (1,01–2,28), p = 0,004); TT rs1007856 гена *ITGB5* (OR = 1,86 (1,20–2,90), p = 0,040); CC rs20579 гена *LIG1* (OR = 1,86 (1,20–2,90), p = 0,008); GG rs1143674 гена *ITGA4* (OR = 2,06 (1,29–3,29), p = 0,002); AA rs679620 гена *MMP3* (OR = 2,03 (1,19–3,47), p = 0,008); аллель С полиморфного варианта rs12980602 гена *IFNL2* (OR = 1,49 (1,04–2,14), p = 0,029) и аллель С rs4986819 гена *PARP4* (OR = 1,52 (1,01–2,28), p = 0,044). При сравнении полученных результатов с данными по частотам изученных SNP у больных ХВГС, показано, что общими маркерами, вносящими вклад в предрасположенность к ХВГС и СД1, являлись SNP генов *ADAMDEC1* (rs3765124), *ITGB5* (rs1007856), *MMP3* (rs679620) и *LIG1* (rs20579). Ассоциации имели однонаправленный характер, поскольку одни и те же аллели и генотипы вносили вклад в риск развития как ХВГС, так и СД1. Таким образом, заболевания, сопровождающиеся фибротической трансформацией различных органов, характеризуются наличием общей компоненты среди всего генетического ландшафта, определяющего подверженность к данным патологиям. Из числа общих генов, вносящих вклад в развитие ХВГС и СД1, белковые продукты генов *ADAMDEC1*, *ITGB5* и *MMP3* вовлечены в метаболизм экстрацеллюлярного матрикса и непосредственно участвуют в процессах фиброгенеза.

Ключевые слова: генетическая предрасположенность, гены фиброгенеза, хронический вирусный гепатит С, сахарный диабет первого типа.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-00840 а.

Similarity and specificity of the genetic predisposition of the diabetes mellitus type 1 and chronic hepatitis C

Goncharova I.A.^{1,2}, Tarasenko N.V.^{1,3}, Markov A.V.¹, Nazarenko M.S.^{1,2,3},
Beloborodova E.V.³, Kondratieva E.I.³, Puzyrev V.P.^{1,3}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

² Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation
e-mail: irina.goncharova@medgenetics.ru

Fibrotic processes that occur in different organs and tissues and that lead to the formation of organ failure are characterized by many shared features. However, the pathogenic significance and the genetic component determining the fibrogenesis in various pathological states can have both shared and brightly expressed specific features. The aim of our study was to assess the similarity and specificity of the genetic components of susceptibility to diseases that characterized by fibrotic transformation of various organs:

kidneys in diabetes mellitus type 1 (T1D) and liver in chronic hepatitis C (HCV). The group of patients with HCV included 184 persons (71% men and 29% women; mean age 40.2 ± 13.9 years old). The group of patients with T1D included 285 patients (47% men and 53% women; mean age 25.27 ± 12.6 years old). The population-based controls consisted of 285 persons (54% men and 46% women, mean age 56.7 ± 8.4 years old). Genotyping of 48 SNPs was performed using mass spectrometry on the Sequenom MassARRAY® tool (USA). Statistical data analysis was performed in the software environment R using the standard package «stats». We found that the T1D predisposing genotype was «AA» of rs3765124 of *ADAMDEC1* gene (OR = 1.52(1.01–2.28), p = 0.004); «TT» of rs1007856 of *ITGB5* gene (OR = 1.86(1.20–2.90), p = 0.040); «CC» of rs20579 of *LIG1* gene (OR = 1.86(1.20–2.90), p = 0.008); «GG» of rs1143674 of *ITGA4* gene (OR = 2.06 (1.29–3.29), p = 0.002); «AA» of rs679620 of *MMP3* gene (OR = 2.03 (1.19–3.47), p = 0.008); the allele «C» of rs12980602 of *IFNL2* gene (OR = 1.49 (1.04–2.14), p = 0.029) and allele «C» rs4986819 of the *PARP4* gene (OR = 1.52 (1.01–2.28), p = 0.044). Comparison of the obtained results with the data on the frequency of studied SNPs in patients with HCV showed that SNPs of *ADAMDEC1* (rs3765124), *ITGB5* (rs1007856), *MMP3* (rs679620) and *LIG1* (rs20579) were the shared markers that contribute to predisposition to HCV and T1D. Associations were unidirectional, because the same alleles and genotypes contribute to the risk of as HCV and T1D. Diseases accompanied by fibrotic transformation of various organs characterized by the presence of shared components among the entire genetic landscape that determines the susceptibility to these pathologies. Among the number of shared genes contributing to the development of HCV and T1D, the protein products of genes *ADAMDEC1*, *ITGB5* and *MMP3* are involved in the metabolism of the extracellular matrix and directly in the processes of fibrogenesis.

Keywords: genetic predisposition, fibrogenesis genes, chronic hepatitis C, diabetes mellitus type 1.

Введение

Фиброгенез — универсальный генетически детерминированный процесс, который поражает различные ткани и органы человека и приводит, в конечном итоге, к формированию развернутой клинической картины органной недостаточности. Развитие терминальных исходов фиброза при многих заболеваниях ставит перед исследователями задачу поиска маркеров для своевременного формирования групп риска и предотвращения развития необратимых последствий широкого спектра хронических заболеваний, к которым относятся сахарный диабет 1-го типа (СД1) и хронический вирусный гепатит С (ХВГС).

Несмотря на то, что СД1 и ХВГС с точки зрения патогенеза принадлежат к разным классам патологий (аутоиммунным и инфекционным, соответственно), признаки фиброза, как осложнения основного заболевания регистрируются как у пациентов с СД1, так и с ХВГС. В случае СД1 гипергликемия запускает каскад биохимических процессов в канальцах, клубочках и интерстиции почек, в результате происходит формирование диабетической нефропатии. Данная патология развивается вследствие интенсивных фибротических процессов в почках, таких, как склерозирование клубочков из-за обменных нарушений в компонентах внеклеточного матрикса, где центральная роль отводится коллагенам. В результате происходит накопление различных белков экстрацеллюлярного матрикса (в том числе коллагена, фибронектина, ламининов), что приводит к развитию нефросклероза. При ХВГС наблюдается фибротическое поражение печени в результате хронического воспаления, вызванного персистенцией вируса гепатита С. Избыток фиброзной ткани в конечном итоге, является причиной развития цирроза печени.

Фибротические процессы в разных органах и тканях характеризуются общими чертами, одной из которых является нарушение баланса между синтезом и распадом внеклеточного матрикса с преобладанием процессов накопления внеклеточных матричных компонентов.

Однако патогенетическая роль и генетическая составляющая, детерминирующая фиброгенез при различных патологических состояниях, могут иметь как общие, так и ярко выраженные специфические черты. Поиск генов, обладающих плейотропным действием и участвующих в формировании эндофенотипов и развитии осложнений при различных патологических состояниях человека, остается актуальной задачей, решение которой поможет выявлению новых мишеней для лекарственной терапии и реализации индивидуализированного подхода к лечению.

В связи с этим целью настоящего исследования заключалась в оценке общности и специфичности генетической компоненты подверженности СД1 и ХВГС по генам фиброгенеза.

Материалы и методы

В исследование были включены 754 человек. Все обследованные относятся к славянскому населению, проживающему в г. Томске и Томской области. Выборка пациентов с ХВГС была сформирована на базе отделения гастроэнтерологии Областной клинической больницы г. Томска и составила 184 пациента (71% мужчин и 29% женщин; средний возраст $40,2 \pm 13,9$ года). Группа больных СД1 была сформирована из числа лиц, проходивших лечение в эндокринологическом отделении Областной клинической больницы г. Томска, и составила 285 человек (47% мужчин и 53% женщин; средний возраст $25,27 \pm 12,6$ года). Контрольная группа представляла собой популяционную выборку. Она включала 285 человек, из них 54% мужчин и 46% женщин (средний возраст $56,7 \pm 8,4$ года).

Генотипирование 48 SNP, которые входили в состав панели разработанной в НИИ медицинской генетики, выполнено методом масс-спектрометрии на приборе Sequenom MassARRAY® (США). Данная панель была подробно описана ранее [1]. Статистическая обработка данных проводилась в программной среде R с использо-

ванием стандартного пакета «stats» (версия 3.0.3) [<http://www.R-project.org/>].

Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей в исследуемых выборках был выполнен методом перестановок (пермутационный тест, 10000 итераций) для получения точных оценок статистики χ^2 Пирсона. Проверка статистических гипотез при сравнительном анализе данных проводилась на 5%-ном уровне значимости.

Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Результаты

Группа больных СД1 характеризовалась более высокой частотой генотипа AA и аллеля A rs3765124 гена *ADAMDEC1*, генотипа GG и аллеля G rs1143674 гена *ITGA4*, генотипа TT и аллеля T rs1007856 гена *ITGB5*, генотипа CC и аллеля C rs20579 гена *LIG1*, генотипа AA rs679620 гена *MMP3*, аллеля C полиморфного варианта rs12980602 гена *IFNL2* и аллеля C rs4986819 гена *PARP4* по сравнению с популяционным контролем (табл. 1).

При сравнении частот генов между группой больных ХВГС и популяционной выборкой жителей г. Томска ранее было выявлено, что у больных ХВГС выше частота: генотипа CC rs10087305 гена *ADAMDEC1*, аллеля A и генотипа AA rs3765124 гена *ADAMDEC1*, аллеля A и генотипа AA rs679620 гена *MMP3*, аллеля T и генотипа TT rs1007856 гена *ITGB5*, аллеля C и генотипа CC rs20579 гена *LIG1*, аллеля C и генотипа CC rs3739998 гена *KIAA1462* [2].

Поскольку оба изученных патологических состояния являются многофакторными, для них характерна полигенная природа подверженности с различным числом генетических вариантов, вносящих вклад в развитие конечного фенотипа. Так, из 48 проанализированных полиморфных вариантов, шесть ассоциированы с ХВГС (*ADAMDEC1* (rs3765124, rs10087305), *MMP3* (rs679620), *ITGB5* (rs1007856), *LIG1* (rs20579), *KIAA1462* (rs3739998)) и семь — с СД1 (*ADAMDEC1* (rs3765124), *MMP3* (rs679620), *ITGB5* (rs1007856), *LIG1* (rs20579), *IFNL2* (rs12980602), *PARP4* (rs4986819), *ITGA4* (rs1143674)).

Выявлены как общие для ХВГС и СД1, так и специфические гены и SNP, ассоциированные только с одной из изученных патологий. Общими являются гены ADAM-подобного дицеклина 1 *ADAMDEC1*, интегрин бета 5 *ITGB5*, матриксной металлопротеиназы 3 *MMP3* и лигазы *LIG1*. Ассоциации имеют однонаправленный характер (табл. 2).

Белковые продукты генов *ADAMDEC1*, *MMP3* и *ITGB5*, ассоциированных с ХВГС и СД1, вовлечены в функционирование экстрацеллюлярного матрикса и участвуют в процессах фиброгенеза, которые характер-

ны для изученных патологических состояний. Например, при HCV-инфекции наблюдается фибротическое поражение печени в результате хронического воспаления, вызванного персистенцией вируса гепатита С. При СД1 формируются осложнения, которые характеризуются развитием фиброзной ткани в различных органах. Так, при диабетической нефропатии происходит формирование гломерулярного и интерстициального фиброза в почках, что связано с действием главного повреждающего агента при сахарном диабете — хронической гипергликемии. Белковые продукты генов *ADAMDEC1* и *MMP3* обладают металлопротеиназной активностью и играют существенную роль при различных патологических процессах, в том числе и при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, прогрессировании фиброза печени различной этиологии и осложнений СД1 [3, 4]. Аллель A rs3765124 гена *ADAMDEC1* является предпологающим к развитию инфаркта миокарда, СД1 и диабетической нефропатии [5]. Продукт гена *ITGB5* является мембранным белком из семейства интегринов, которые взаимодействуют с внеклеточным матриксом и участвуют в функционировании клеток организма. Ассоциативные исследования с привлечением гена *ITGB5* показали связь полиморфизма с широким спектром патологий, в том числе с заболеваниями желудочно-кишечного тракта [6].

Кроме этого, общим геном, вносящим вклад в развитие ХВГС и СД1, является ген лигазы *LIG1*. Эффективность работы системы репарации имеет большое значение для поддержания целостности генома при воздействии внешних и внутренних факторов различной природы. Была показана связь некоторых SNP генов репарации с ферментативной активностью кодируемых белков, частотой хромосомных aberrаций, микросателлитной нестабильностью и различными, в том числе онкологическими, заболеваниями [7, 8, 9]. Выявлена связь структурного полиморфизма генов репарационной системы с различными заболеваниями печени [10, 11].

К специфическим маркерам, ассоциированным только с СД1 можно отнести гены *PARP4* (rs4986819), *IFNL2* (rs12980602), *ITGA4* (rs1143674), а с ХВГС связан ген *KIAA1462* (rs3739998). Среди генов, определяющих подверженность только к одному из изученных заболеваний, выявлены гены, белковые продукты которых относятся к различным функциональным классам. Так, специфическими для СД1 являются гены, белковые продукты которых влияют на функционирование системы репарации (*PARP4*), иммунного ответа (*IFNL2*) и метаболизм экстрацеллюлярного матрикса (*ITGA4*). Уникальным для ХВГС является ген *KIAA1462*, связанный с эндотелиальной дисфункцией и развитием сердечно-сосудистых заболеваний [12].

Показано, что белок PARP4 содержит специфичный регион протяженностью более 300 аминокислот, который определяет индивидуальные особенности отношения хозяин-патоген, что указывает на роль АДФ-рибо-

зилирования как ключевого шага в направлении противовирусной защиты в геномах млекопитающих [13]. Можно предположить, что ген *PARP4* связан с механизмами формирования иммунного ответа при СД1, когда в качестве триггера выступают различные вирусные (вирус Коксаки, ротавирус, вирус эпидемического паротита, цитомегаловирус, вирусы Эпштейна-Барра, красну-

хи, ветряной оспы) или бактериальные (микобактерия паратуберкулеза) агенты. Выявлено, что мутации гена *PARP4* ассоциированы с развитием гепатоцеллюлярной карциномы и множественной лекарственной устойчивостью [14, 15]. Результаты ассоциативных исследований полиморфных вариантов гена *PARP4* с СД1 в научной литературе не обнаружено.

Таблица 1

Распределение частот аллелей и генотипов SNP-маркеров генов, ассоциированных с СД1

Ген, SNP	Генотип, аллель	Контроль, N (%)	СД1, N (%)	p / p [#]	OR (95%CI)
<i>ADAMDEC1</i> , rs3765124	AA	64 (24,3)	86 (36,6)	0,004 / 0,004 [#]	1,52 (1,01–2,28)
	AG	141 (53,6)	101 (43,0)		0,64 (0,42–0,99) [#]
	GG	58 (22,1)	48 (20,4)		
	A	269 (51,1)	273 (58,1)	0,033	1,32 (1,02–1,71)
		G	257 (48,9)		197 (41,9)
<i>IFNL2</i> , rs12980602	TT	105 (61,8)	91 (51,7)	0,078	—
	TC	57 (33,5)	68 (38,6)		
	CC	8 (4,7)	17 (9,7)		
	T	267 (78,5)	250 (71,0)	0,029	0,67 (0,47–0,96)
	C	73 (21,5)	102 (29,0)		1,49 (1,04–2,14)
<i>ITGA4</i> , rs1143674	GG	54 (22,2)	56 (37,1)	0,002 / 0,002 [#]	2,06 (1,29–3,29)
	GA	131 (53,9)	75 (49,7)		0,48 (0,30–0,78) [#]
	AA	58 (23,9)	20 (13,2)		
	G	239 (49,2)	187 (61,9)	0,001	1,68 (1,24–2,28)
	A	247 (50,8)	115 (38,1)		0,60 (0,44–0,81)
<i>ITGB5</i> , rs1007856	TT	58 (22,2)	76 (32,3)	0,040 / 0,015 [#]	1,86 (1,20–2,90)
	CT	138 (52,9)	109 (46,4)		0,54 (0,35–0,83) [#]
	CC	65 (24,9)	50 (21,3)		
	T	254 (48,7)	261 (55,5)	0,036	1,32 (1,02–1,71)
	C	268 (51,3)	209 (44,5)		0,76 (0,59–0,98)
<i>LIG1</i> , rs20579	CC	152 (67,0)	185 (79,0)	0,008 / 0,005 [#]	1,86 (1,20–2,90)
	CT	66 (29,1)	46 (19,7)		0,54 (0,35–0,83) [#]
	TT	9 (3,9)	3 (1,3)		
	C	370 (81,5)	416 (88,9)	0,002	1,82 (1,23–2,68)
	T	84 (18,5)	52 (11,1)		0,55 (0,37–0,81)
<i>MMP3</i> , rs679620	GG	54 (32,2)	50 (31,8)	0,011 / 0,008 [#]	0,49 (0,29–0,84) [#]
	GA	81 (48,2)	55 (35,1)		2,03 (1,19–3,47)
	AA	33 (19,6)	52 (33,1)		
	G	189 (56,3)	155 (49,4)	0,093	—
	A	147 (43,7)	159 (50,6)		—
<i>PARP4</i> , rs4986819	CC	200 (76,0)	194 (82,2)	0,045	—
	CG	58 (22,0)	42 (17,8)		
	GG	5 (2,0)	0 (0,0)		
	C	458 (87,1)	430 (91,1)	0,044	1,52 (1,01–2,28)
	G	68 (12,9)	41 (8,9)		0,64 (0,42–0,99)

Примечание. N — число индивидов с соответствующими генотипами в обследованной выборке; p — достигнутый уровень значимости критерия χ^2 или двустороннего точного теста Фишера при сравнении частот генотипов и аллелей; OR — отношение шансов; 95%CI — 95% доверительный интервал; [#] отмечен уровень значимости и OR (95%CI), достигнутые при сравнении объединенной группы, включающей индивидов с гомозиготным генотипом по аллелю «а» («аа») и индивидов с гетерозиготным генотипом («ab») (суммарно «аа+ab»), с группой лиц с гомозиготным генотипом по альтернативному аллелю «b» («bb»).

Аллели и генотипы полиморфных вариантов генов *ADAMDEC1*, *ITGB5*, *MMP3* и *LIG1*, ассоциированные с ХВГС и СД1

Ген (SNP)	Аллель, генотип	OR (95%CI); p	
		ХВГС	СД1
<i>ADAMDEC1</i> (rs3765124)	A	1,48 (1,12-1,96); 0,006	1,32 (1,02-1,71); 0,033
	AA	1,78 (1,16-2,76); 0,008	1,79 (1,20-2,69); 0,004
<i>ITGB5</i> (rs1007856)	T	1,33 (1,00-1,76); 0,045	1,32 (1,02-1,71); 0,036
	TT	1,74 (1,10-2,73); 0,015	1,67 (1,10-2,53); 0,015
<i>MMP3</i> (rs679620)	A	1,74 (1,25-1,42); 0,001	—
	AA	2,40 (1,40-4,12); 0,001	2,03 (1,19-3,47); 0,008
<i>LIG1</i> (rs20579)	C	1,82 (1,19-2,80); 0,004	1,82 (1,23-2,68); 0,002
	CC	1,92 (1,18-3,12); 0,007	1,86 (1,20-2,90); 0,004

Интерферон лямбда, кодируемый геном *IFNL2*, характеризуется наличием иммуномодулирующих свойств, участвует в активации экспрессии антигенов I класса HLA-системы и в противовирусной защите организма. Как известно, при СД1 вирусная инфекция является одним из пусковых механизмов аутоиммунного процесса в поджелудочной железе, где наблюдается высокий уровень экспрессии гена *IFNL2* [16]. Ранее была показана ассоциация полиморфизма гена *IFNL2* с развитием сахарного диабета 1-го и 2-го типов [17]. Полиморфный вариант rs12980602, изученный в настоящем исследовании, расположен рядом с 5'-нетранслируемой областью гена *IFNL2* и влияет на функционирование белка IL28A [18]. Гаплотип, в составе которого находится данный маркер, ассоциирован с вирусным гепатитом С, а также с высоким уровнем аминотрансфераз и общего билирубина у больных [19].

Ген *ITGA4* кодирует белок, который относится к семейству интегринов, влияющих на процессы фиброгенеза различных органов. Кроме этого, показано, что интегрины (в том числе и *ITGA4*), стимулируют рост сосудов в поджелудочной железе, что способствует миграции Т-клеток к островковым β-клеткам и инициации аутоиммунного процесса [20]. Данные о связи полиморфизма гена *ITGA4* с развитием сахарного диабета и его осложнений противоречивы [21, 22].

Ген *KIAA1462* кодирует белок, основной функцией которого является регуляция межклеточной адгезии, формирование цитоскелета эндотелиальных клеток и поддержание нормальной проницаемости эндотелия. Повреждение эндотелия печеночных синусоидов напрямую связано с нарушением внутривенной гемодинамики, поражением гепатоцитов и развитием фиброза печени [23]. Полиморфизм гена *KIAA1462* влияет на развитие сердечно-сосудистых и некоторых онкологических заболеваний [24, 25].

В заключении, следует отметить что нам удалось выявить как специфические генетические варианты, предрасполагающие к развитию СД1 и ХВГС, так и общие маркеры, вносящие вклад в предрасположенность

к обоим изученным заболеваниям. В состав генетической компоненты, определяющей подверженность к СД1 и ХВГС — заболеваниям, характеризующимся фибротической трансформацией различных органов, входят гены, вовлеченные в метаболизм экстрацеллюлярного матрикса и процессы фиброгенеза (*ADAMDEC1*, *ITGB5*, *MMP3* и *ITGA4* — для СД1; *ADAMDEC1*, *ITGB5* и *MMP3*. — для ХВГС). Общими маркерами, вносящими вклад в предрасположенность к ХВГС и СД1, являются SNP генов *ADAMDEC1*(rs3765124), *ITGB5* (rs1007856), *MMP3* (rs679620) и *LIG1* (rs20579). Специфичными для СД1 являются гены *PARP4* (rs4986819), *IFNL2* (rs12980602), *ITGA4* (rs1143674), а для ХВГС — ген *KIAA1462* (rs3739998).

Список литературы

1. Гончарова ИА, Кучер АН, Тарасенко НВ и др. Разработка панели генетических маркеров фиброгенеза и оценка её информативности для русского населения г. Томска. Медицинская генетика. 2015;14(8)(158):7-12.
2. Гончарова ИА, Назаренко МС, Тарасенко НВ и др. Генетические маркеры фиброгенеза при хроническом вирусном гепатите С. Медицинская генетика. 2016;15(12):29-36.
3. Li Y, Zhang Q, Liu Y., et al. Hepatitis C virus activates Bcl-2 and MMP-2 expression through multiple cellular signaling pathways. Journal of Virology. 2012. 86(23): 12531-543.
4. Kadoglou NP, Daskalopoulou SS, Perrea D, Liapis CD, et al. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. Angiology. 2005. Feb;56(2):173-189.
5. Гончарова ИА, Тарасенко НВ, Макеева ОА, и др. Полиморфизм гена *ADAMDEC1* и его вклад в развитие заболеваний, характеризующихся процессами фиброгенеза. Медицинская генетика. 2015. Т. 14. № 9 (159). С. 24-30.
6. Bohanes P, Yang D, Loupakis F, et al. Integrin genetic variants and stage-specific tumor recurrence in patients with stage II and III colon cancer. Pharmacogenomics J. 2015. Mar; 15(3): 226-234. doi: 10.1038/tj.2014.66.
7. Azizian-Farsani F, Rafiei G, Saadat M. Impact of Sodium Arsenite on Chromosomal Aberrations With Respect to Polymorp-

hisms of Detoxification and DNA Repair Genes. *Int J Toxicol*. 2014 Nov-Dec;33(6):518-522. doi: 10.1177/1091581814557953.

8. Gaymes TJ, Mohamedali AM, Patterson M, et al. Microsatellite instability induced mutations in DNA repair genes CtIP and MRE11 confer hypersensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in myeloid malignancies. *Haematologica*. 2013 Sep;98(9):1397-406. doi: 10.3324/haematol.2012.079251.

9. Sobczuk A, Poplawski T, Blasiak J. Polymorphisms of DNA repair genes in endometrial cancer. *Pathol Oncol Res*. 2012 Oct;18(4):1015-1020.

10. Лукманова ЛИ, Давлетшин РА, Юлдашев ВЛ и др. Поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов XRCC1, XPD и XRCC3 с повышенным риском развития алкогольного гепатита. *Медицинская генетика*. 2011;9:31-35.

11. Jung SW, Park NH, Shin JW et al. Polymorphisms of DNA repair genes in Korean hepatocellular carcinoma patients with chronic hepatitis B: Possible implications on survival. *J Hepatol*. 2012 Sep;57(3):621-7. doi: 10.1016/j.jhep.2012.04.039.

12. Гончарова ИА, Макеева О.А, Голубенко М.В и др. Гены фиброгенеза в детерминации предрасположенности к инфаркту миокарда. *Молекулярная биология*. 2016;50(1):94-105.

13. Daugherty MD, Young JM, Kerns JA, Malik HS. Rapid evolution of *PARP* genes suggests a broad role for ADP-ribosylation in host-virus conflicts. *PLoS Genet*. 2014 May 29;10(5):e1004403. doi: 10.1371/journal.pgen.1004403.

14. Chen Y, Wang L, Xu H, et al. Exome capture sequencing reveals new insights into hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma at the early stage of tumorigenesis. *Oncol Rep*. 2013 Oct;30(4):1906-12. doi: 10.3892/or.2013.2652.

15. Liu Y, Snow BE, Kickhoefer VA et al. Vault poly(ADP-ribose) polymerase is associated with mammalian telomerase and is dispensable for telomerase function and vault structure in vivo. *Mol Cell Biol*. 2004 Jun;24(12):5314-23.

16. Database GTEXPportal [Electronic resource]: URL: <http://www.gtxportal.org/home/gene/IFNL2> (accessed: 2016).

17. Torkamani A, Topol EJ, Schork NJ. Pathway analysis of seven common diseases assessed by genome-wide association. *Genomics*. 2008 Nov;92(5):265-272. doi: 10.1016/j.ygeno.2008.07.011.

18. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 2010 Apr 29;464(7293):1293-1300.

19. Zhang AM, Ma K, Song Y. et al. Genetic polymorphisms of the IFN genes are associated with biochemical features in Han Chinese with HCV infection from Yunnan Province, China. *Infect Genet Evol*. 2014 Jan;21:161-165. doi: 10.1016/j.mecgid.2013.11.013.

20. Aspod C, Rome S, Thivolet CJ. Early events in islets and pancreatic lymph nodes in autoimmune diabetes. *Autoimmun*. 2004. Jan; 23(1): 27-35. DOI:10.1016/j.jaut.2004.03.007.

21. Karamizadeh Z, Kamali Sarvestani E, Saki F, et al. Investigation of osteopontin levels and genomic variation of osteopontin and its receptors in Type 1 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest*. 2013. Nov; 36(11);1090-93. doi: 10.3275/9098.

22. Bailey SD, Xie C, Do R, et al. Variation at the NFATC2 locus increases the risk of thiazolidinedione-induced edema in the Diabetes REDuction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication (DREAM) study. *Diabetes Care*. 2010 Oct;33(10):2250-3. doi: 10.2337/dc10-0452.

23. Щёктова АП, Котельникова ЛП, Мугатаров ИН, Федчук НН. Эндотелиальная дисфункция, воспаление и фиброз при гепатобилиарной патологии. *Фундаментальные исследования*. 2013. № 5-2. С. 451-455.

24. Boyd J, Luo B, Peri S, et al. Whole exome sequence analysis of serous borderline tumors of the ovary. *Gynecol Oncol*. 2013.Sep;130(3):560-4. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.06.007.

25. Erdmann J, Willenborg C, Nahrstaedt J, et al. Genome-wide association study identifies a new locus for coronary artery disease on chromosome 10p11.23. *Eur. Heart J*. 2011. 32: 158-168. doi: 10.1093/eurheartj/ehq405.

Анализ CNVs при анэмбрионии и неразвивающейся беременности

Савченко Р.Р.¹, Кашеварова А.А.¹, Скрыбин Н.А.¹, Жигалина Д.И.²,
Лопаткина М.Е.¹, Никитина Т.В.¹, Васильев С.А.¹, Лебедев И.Н.¹

¹ НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск;
e-mail: savchenko_renata@mail.ru

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

Несмотря на высокую частоту репродуктивных потерь, характерную для человека, вариации числа копий участков ДНК (CNVs) как одна из возможных причин невынашивания беременности остаются малоизученными. В связи с этим целью настоящего исследования являлся анализ CNVs при анэмбрионии и неразвивающейся беременности. Исследовано 29 образцов внезародышевых тканей спонтанных абортусов первого триместра беременности, полученных от женщин с диагнозом *анэмбриония*, и 18 образцов тканей, полученных от женщин с диагнозом *неразвивающаяся беременность*. Идентификация CNVs проведена методом матричной сравнительной геномной гибридизации (aCGH) на ДНК-микрочипах высокого разрешения. Выявлено 299 CNVs при анэмбрионии и 132 CNVs при неразвивающейся беременности. Некоторые потенциально патогенетически значимые CNVs были верифицированы методом ПЦР в реальном времени. При анэмбрионии выявлено 19 (54,3%) потенциально патогенетически значимых микроделетий и 16 (45,7%), микродупликаций, в то время как при неразвивающейся беременности в обследованной нами выборке обнаружены исключительно микродупликации хромосомных участков.

Ключевые слова: анэмбриония, неразвивающаяся беременность, вариации числа копий участков ДНК (CNV), матричная сравнительная геномная гибридизация (aCGH).

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование проведено при финансовой поддержке гранта РФФ № 16-15-10229.

Analysis of CNVs in anembrionic pregnancy and missed abortions

Savchenko R.R.¹, Kashevarova A.A.¹, Skryabin N.A.¹, Zhigalina D.I.²,
Lopatkina M.E.¹, Nikitina T.V.¹, Vasilyev S.A.¹, Lebedev I.N.¹

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRC, Tomsk, Russia

² National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

Corresponding author: savchenko_renata@mail.ru

Despite the high frequency of early pregnancy losses in human embryo development, copy number variations (CNVs), as one of the possible causes of miscarriage, are insufficiently explored. The present study is aimed to search for copy number variations (CNVs) in euploid anembrionic pregnancies and missed abortions. The 29 samples of extraembryonic tissues from anembrionic pregnancies and 18 samples of extraembryonic mesoderm from missed abortions were analysed using array comparative genomic hybridization (CGH) on high-resolution microarrays. Copy number variations were detected in both experimental groups but their total number in anembrionic pregnancies (299 CNVs) were significantly higher than in the group of missed abortions (132 CNVs). Several CNVs were selectively verified using real-time PCR. The predominance of microdeletions in anembrionic pregnancies is noteworthy. Nineteen (54.3%) potentially pathogenic microdeletions and 16 (45.7%) microduplications were found in anembrionic pregnancies while there were only microduplications in the group of observed missed abortions.

Key words: anembrionic pregnancy, missed abortion, copy number variation (CNV), array comparative genomic hybridization (aCGH).

Введение

Невынашивание беременности является одной из ключевых проблем современной репродуктивной биологии и медицины. По разным оценкам, от 15 до 25% клинически распознаваемых беременностей спонтанно прерываются на сроке до 16 недель [1, 2]. Причины остановки развития эмбрионов имеют многофакторную природу, однако ключевая роль в этиологии ранних репродуктивных потерь отводится генетическим факторам [3]. Известно, что около половины зародышей имеют числовые и структурные аномалии хромосомного набо-

ра [4]. Причины гибели оставшейся значительной части эмбрионов, у которых стандартными цитогенетическими методами был определен нормальный кариотип, часто остаются неясными. Возможно, некоторые случаи невынашивания беременности могут быть вызваны вариациями числа копий участков ДНК (copy number variation, CNVs).

CNVs регистрируются как у практически здоровых индивидов, так и могут быть ассоциированы с различными патологическими состояниями. К настоящему моменту опубликован ряд работ, посвященных изуче-

нию значительной роли CNVs в патогенезе разных наследственных заболеваний, таких как нервно-психические расстройства, умственная отсталость, некоторые наследственные формы рака и др. [5–8]. Вероятно, ряд клинически значимых CNVs может приводить и к внутриутробной селекции эмбрионов. Результаты исследований в данном направлении начали публиковаться сравнительно недавно и, главным образом, принадлежат зарубежным коллективам [3, 9–16].

Целью настоящего исследования являлся аCGH-анализ случаев анэмбрионии и неразвивающейся беременности.

Материалы и методы

Исследовано 29 образцов внезародышевых тканей (цитотрофобласт хориона, ЦХ, 14 образцов), экстраэмбриональная мезодерма (ЭМ, 15 образцов) спонтанных абортусов, полученных от женщин с диагнозом *анэмбриония*, и 18 образцов ЭМ, полученных от женщин с диагнозом *неразвивающаяся беременность*. Все спонтанные абортусы, включенные в данное исследование, имели нормальный кариотип, установленный при стандартном метафазном анализе. Сроки беременности, определенные по дате последней менструации, варьировали от 6 до 12,5 недель (среднее значение $8,7 \pm 1,8$ недель) и от 6,5 до 16 недель (среднее значение $10,5 \pm 3,7$ недель) при анэмбрионии и неразвивающейся беременности, соответственно, а по данным ультразвукового обследования беременных женщин от 3,5 до 11 недель (среднее значение $5,8 \pm 1,7$ недель) и от 6 до 10 недель (среднее значение $8,1 \pm 2,0$ недель). Возраст матерей в группе анэмбрионии варьировал от 23 до 37 лет (среднее значение $29,8 \pm 4,7$ года), а при неразвивающейся беременности от 21 до 34 (среднее значение $29 \pm 4,7$ года). Возраст отцов находился в диапазоне от 26 до 43 лет (среднее значение $33,9 \pm 6,0$ лет) и от 24 до 34 (среднее значение $29 \pm 4,9$ года) при анэмбрионии и неразвивающейся беременности, соответственно. Проведение настоящего исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН.

ДНК для молекулярно-цитогенетического анализа была выделена из тканей плаценты с использованием стандартного протокола фенол-хлороформной экстракции. Матричная сравнительная геномная гибридизация (аCGH) была проведена с использованием ДНК-микрочипов высокого разрешения SurePrint G3 Human CGH+SNP Microarray Kit, 4x180K и SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4x180K (Agilent Technologies, США) по протоколу, рекомендованному производителем. Детекция гибридационных сигналов осуществлялась на сканере SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies, США), а обработка сканированных изображений проведена с использованием программы Feature Extraction 10.7.3.1 (Agilent Technologies, США). Ана-

лиз полученных данных был проведен с использованием программного обеспечения CytoGenomics 2.5.7.0 (Agilent Technologies, США).

Классификация CNVs осуществлялась с использованием баз данных DGV (Database of Genomic Variants) [17] и DECIPHER (Database of Genomic Variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources) [18], а анализ функций генов — с помощью баз данных NCBI Gene [19] и NCBI PubMed [20].

Верификация потенциально клинически значимых CNVs проведена методом ПЦР в реальном времени (RT-PCR). Разработка олигонуклеотидных праймеров для RT-PCR осуществлялась с использованием баз данных NCBI Gene, UCSC Genome Browser [21], Ensembl [22], а также программ Primer-BLAST [23] и VectorNTI Advance®11.5.4 (Invitrogen, США).

Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ и ресурсов коллекции биологического материала «Биобанк населения Северной Евразии».

Результаты и обсуждение

Применение аCGH позволило выявить 299 CNVs при анэмбрионии и 132 CNVs при неразвивающейся беременности. Значительно более высокое число CNVs, обнаруженных при анэмбрионии, возможно, объясняется тем, что данная форма патологии внутриутробного развития является наиболее тяжелой и вклад хромосомных аберраций в её этиологию, как правило, заметно выше, чем при неразвивающейся беременности. Обнаруженные в обеих группах CNVs были локализованы как в некодирующих областях генома, так и перекрывались с известными генами, что может указывать на возможную важную роль данного типа изменчивости в регуляции генной экспрессии. После исключения из дальнейшего анализа полиморфных вариантов, встречающихся у здоровых индивидов и зарегистрированных в DGV, а также вариантов, затрагивающих гены, оставшиеся CNVs, были классифицированы как потенциально патогенетически значимые для эмбрионального развития. При анэмбрионии их число составило 35 CNVs (в 21 образце), а при неразвивающейся беременности — 25 CNVs (в 8 образцах). Потенциально патогенетически значимые CNVs, их размеры и некоторые затронутые ими гены представлены в табл. 1 и 2.

CNVs, выявленные в обеих группах, затрагивали гены, продукты которых играют роль в реализации важных биологических процессов, таких как клеточная пролиферация и дифференцировка, межклеточная сигнализация, развитие нормальной морфологии клеток и анатомических структур, эмбриональное развитие.

Потенциально патогенетически значимые CNVs, обнаруженные при анэмбрионии

№	Ткань	Регион	Координаты, hg19	Размер, т.п.н.	Гены в области CNV
1	ЭМ	—			
	ЦХ	del4p12	chr4:45951948-47320722	1369	<i>COX7B2</i>
		del4q13.1-q13.2	chr4:65239160-67362778	2124	<i>EPHA5</i>
		del7q21.11	chr7:84392662-86174019	1781	<i>SEMA3D</i>
		del8q24.13	chr8:125093552-125186016	92,5	<i>FER1L6</i>
		del10q21.3	chr10:66638141-68024837	1387	<i>CTNNA3</i>
2	ЭМ	dup2q21.1	chr2:130928976-131317673	388,7	<i>PTPN18, CFC1</i>
		dup5q13.2	chr5:68849594-70369959	1520	<i>OCLN</i>
		dup6p22.1	chr6:29854870-29887327	32	<i>HLA-H</i>
		dup19p12	chr19:20591370-20682636	91	<i>ZNF826P</i>
	ЦХ	—			
3	ЭМ	dup7p14.3	chr7:29212013-29522819	310,8	<i>CHN2</i>
	ЦХ	del2p21	chr2:45168836-45169561	726	<i>SIX3</i>
		del2q32.1	chr2:185310259-185486252	176	<i>ZNF804A</i>
		del6q22.31	chr6:123554069-123591006	36,9	<i>TRDN</i>
		del10q21.3	chr10:66638141-68024837	1387	<i>CTNNA3</i>
		del12q15-q21.1	chr12:71287027-71721907	439,9	<i>PTPRR, TSPAN8</i>
		del20q13.32	chr20:57245941-57465925	220	<i>STX16, GNAS</i> и др.
4	ЭМ	dup6p22.1	chr6:29854870-29896710	41,8	<i>HLA-H</i> и др.
		del18p11.32-p11.31	chr18:118760-5275294	5157	<i>METTL4, SMCHD1</i> и др.
	ЦХ	del6p25.3	chr6:320910-517491	196,6	<i>DUSP22, IRF4</i>
5	ЭМ	del5q14.3	chr5:84810680-86062835	1252	<i>NBPF22P, COX7C</i> и др.
		dup6p22.1	chr6:29854870-29887327	32	<i>HLA-H, HCG2P7</i>
		dup10q24.32	chr10:103288313-103323240	35	<i>BTRC</i>
	ЦХ	del5q14.3	chr5:84810680-86062835	1252	<i>NBPF22P, COX7C</i> и др.
		dup6p22.1	chr6:29854870-29887327	32	<i>HLA-H, HCG2P7</i>
		dup10q24.32	chr10:103288313-103323240	35	<i>BTRC</i>
		dup11p15.1	chr11:18413974-18460081	46	<i>LDHA, LDHC</i>
6	ЭМ	—			
	ЦХ	del7p22.2	chr7:3697372-3750340	52,9	<i>SDK1</i>
7	ЭМ	—			
	ЦХ	del18q12.2-q12.3	chr18:36374692-37518109	1143	<i>LOC647946, mir-924</i>
9	ЭМ	dup11p15.5	chr11:2017341-2191412	174	<i>H19</i> и др.
	ЦХ	—			
10	ЭМ	dup2p21	chr2:45168836-45169314	479	<i>SIX3</i>
	ЦХ	dup2p11.2	chr2:85383744-85520965	137	<i>TCF7L1</i>
		dup3p21.1	chr3:53923973-54192397	268	<i>SELK, CACNA2D3</i>
		dup8p11.23	chr8:36673502-37024831	351	<i>KCNU1</i>
		dup9p24.3	chr9:526605-789845	263	<i>KANK1</i>
		dup17p13.2	chr17:4393779-4442307	49	<i>SPNS2, MYBBP1A</i>
11	ЭМ	dup6q22.31	chr6:121680801-122209022	528	<i>GJA1</i>
	ЦХ	dup6q22.31	chr6:121680801-122209022	528	<i>GJA1</i>
12	ЭМ	del1q31.1	chr1:196825135-196883398	58	<i>CFHR4</i>
	ЦХ	del1q31.1	chr1:196825135-196883398	58	<i>CFHR4</i>
15	ЭМ	dup7p21.1	chr7:19155285-19157193	2	<i>TWIST1</i>
		del15q15.3	chr15:43895633-43948346	53	<i>STRC</i>
		dupXp11.23	chrX:48318839-48760198	441	<i>SUV39H1, HDAC6</i> и др.
		dupYq11.223	chrY:23655107-23891753	237	<i>RBM1B</i> и др.
	ЦХ	—			

Поскольку при проведении матричной сравнительной геномной гибридизации существует вероятность получения ложноположительных результатов, выборочно методом RT-PCR были верифицированы некоторые потенциально патогенетически значимые CNVs. В группе анэмбрионий было проверено 8 CNVs, затрагивающих 9 генов. В группе неразвивающихся беременностей было верифицировано 5 потенциально патогенетически значимых CNVs, затрагивающих 6 генов. Таким образом, суммарно в обеих группах методом RT-PCR были выборочно подтверждены 9 из 13 CNVs: 4 при анэмбри-

онии (del10q21.3 (*CTNNA3*), del18p11.32-p11.31 (*METTL4*, *SMCHD1*), del5q14.3 (*COX7C*), dup10q24.32 (*BTRC*)) и 5 при неразвивающейся беременности (dup14q22.2 (*BMP4*), dup12q24.21 (*TBX3*), dup11p15.5-15.4 (*INS*, *H19*), dupXp11.22 (*HSD17B10*)). Важно отметить, что 4 CNVs не подтвердились: del 2p21 (*SIX3*), del 20q13.32 (*STX16*, *NPEPL1*), dup 11p15.5 (*H19*) при анэмбрионии и dup 2q31.1 (*DLX1*) при неразвивающейся беременности.

Интересные результаты были получены при анализе качественного состава CNVs в обеих исследованных

Таблица 2

Потенциально патогенетически значимые CNVs, обнаруженные в ЭМ при неразвивающейся беременности

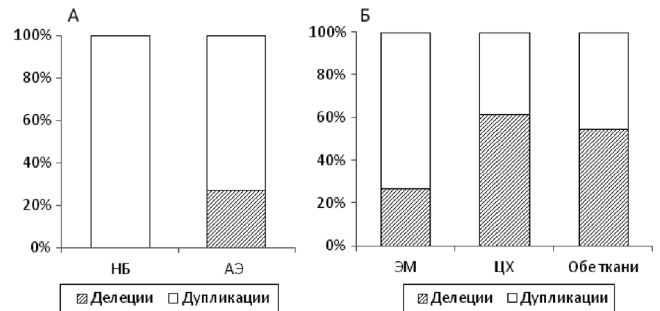
№	Регион	Координаты, hg19	Размер, т.п.н.	Гены в области CNV
1	dup2q31.1	chr2:172947223-172953729	7	<i>DLX1</i>
	dup14q22.2	chr14:54418667-54427486	9	<i>BMP4</i>
2	dup11p15.5-p15.4	chr11:1092290-3626932	2535	<i>SYT8</i> , <i>H19</i> и др.
	dupXp22.33	chrX:60701-3140981	3080	<i>SHOX</i> , <i>CRLF2</i> и др.
	dupXp11.23	chrX:47330212-48760937	1431	<i>TIMP1</i> , <i>CFP</i> и др.
	dupXq28	chrX:152987955-154005218	1017	<i>BCAP31</i> и др.
	dupYp11.32- p11.2	chrY:10701-7036724	7026	<i>PLCXD1</i> и др.
3	dupXp11.22	chrX:53458184-53461271	3	<i>HSD17B10</i>
	dup15q11.1-q11.2	chr15:20481702-22558756	2077	<i>HERC2P3</i> , <i>GOLGA6L6</i> и др.
	dup16p11.2	chr16:32279544-34185056	1906	<i>LOC390705</i> , <i>TP53TG3</i> и др.
4	dup2q31.1	chr2:176958994-176959346	0,35	<i>HOXD13</i>
	dup3p26.3	chr3:2640411-2670402	30	<i>CNTN4</i>
	dup3p21.1	chr3:53923973-54146450	222	<i>SELK</i>
	dup3q28	chr3:188019777-188080406	61	<i>LPP</i>
	dup4q12	chr4:55484144-55612932	129	<i>KIT</i>
	dup5p14.1	chr5:81037484-81127498	90	<i>SSBP2</i>
	dup6p21.1	chr6:45395872-46104796	709	<i>RUNX2</i> , <i>CLIC5</i> , <i>ENPP4</i>
	dup7p14.3	chr7:32103877-32170788	67	<i>PDE1C</i>
	dup7q21.11	chr7:80444185-80531734	88	<i>SEMA3C</i>
	dup9p24.3	chr9:526605-789845	263	<i>KANK1</i>
	dup9p21.3	chr9:23196282-24313081	1117	<i>ELAVL2</i>
	dup12q24.21	chr12:114375674-116099724	1724	<i>RBM19</i> , <i>TBX5</i> , <i>TBX3</i>
	dup15q11.1-q11.2	chr15:20095481-22509254	2414	<i>HERC2P3</i> , <i>GOLGA6L6</i> и др.
	dup19p12-p11	chr19:24323677-24474254	151	<i>LOC100101266</i>
	dupXp22.33	chrX:60701-482475	422	<i>PLCXD1</i> , <i>GTPBP6</i> и др.
dupXp11.22	chrX:50367783-50441087	73	<i>SHROOM4</i>	
dupXq21.1	chrX:77371786-77372595	1	<i>PGK1</i>	
dupXq27.3-q28	chrX:146441166-147639704	1999	<i>FMR1-AS1</i> и др.	
5	dup20q13.32	chr20:57463534-57465925	2	<i>GNAS</i>
6	dup19q13.43	chr19:57349319-57351566	2	<i>ZIM2</i> , <i>PEG3</i>
7	dup4q34.3	chr4:178067448-179741395	1674	<i>NEIL3</i> , <i>AGA</i>
	dup10q11.21	chr10:42806964-43356545	113	<i>BMS1</i>
8	dup4q34.3	chr4:178067448-179741395	1674	<i>NEIL3</i> , <i>AGA</i>

группах. Так при анэмбрионии было выявлено 19 потенциально патогенетически значимых микроделетий (54,3%) и 16 микродупликаций (45,7%) хромосомных участков, в то время как при неразвивающейся беременности в обследованной нами выборке регистрировались только микродупликации. Кроме того, при анэмбрионии различалось распределение микроделетий и микродупликаций по тканям, однако в общей сложности преобладали микроделетии. В ЭМ было обнаружено 4 микроделетии (26,7%) и 11 микродупликаций (73,3%), а в ЦХ 16 микроделетий (61,5%) и 10 микродупликаций (38,5%) (рисунок).

В работе Rajcan-Separovic с соавторами [15] описаны 6 уникальных CNVs, зарегистрированных у пяти внутриутробно погибших зародышей с нормальным кариотипом (2 случая анэмбрионии и 3 неразвивающихся беременности с наличием эмбрионального материала). И при анэмбрионии, и при неразвивающейся беременности авторами было выявлено по 2 микродупликации и по одной микроделетии хромосомных участков. В более позднем исследовании Robberecht с соавторами [16] обнаружили 4 микроделетии при неразвивающейся беременности. Принимая во внимание результаты двух вышеупомянутых работ, отсутствие микроделетий при неразвивающейся беременности в нашем исследовании, по-видимому, объясняется малым объемом выборки. Тем не менее, тенденция к преобладанию микродупликаций при неразвивающейся беременности так же, как и в нашей работе, прослеживается в исследовании Robberecht с соавторами [16]: 17 (81%) микродупликаций и 4 (19%) микроделетии. Исключение из анализа CNVs, не затрагивающих гены, незначительно смещает данное соотношение: 15 (83%) микродупликаций и 3 (17%) микроделетии. Микродупликации преобладают и в других исследованиях внутриутробно погибших зародышей: 12 (60%) к 8 (40%) [14] и 26 (57,8%) к 19 (42,2%) [24], однако в данных работах отсутствует морфологическая характеристика обследованного абортивного материала, что делает невозможным прямое сравнение результатов.

Полученное нами распределение CNVs с преобладанием микроделетий при анэмбрионии сложно сопоставить с существующими опубликованными работами, поскольку данная форма патологии остается малоизученной высокоразрешающими методами исследования кариотипа. Так в общей сложности было выявлено 6 уникальных CNVs в трех случаях анэмбрионии [15, 16].

При сопоставлении обнаруженных нами CNVs с результатами других исследований, перекрытие генов, вовлеченных в CNVs, удалось выявить только в двух случаях. Так, описанная нами ранее микроделетия 10q21.3 [3] регистрировалась также в работах Rajcan-Separovic с соавторами [14] и Robberecht с соавторами [16] и затрагивала во всех описанных случаях ген *CTNNA3*, а микроделетия 7p22.2, обнаруженная нами при анэмбрионии, была также показана Viaggi с соавторами [24] и



А — CNVs, обнаруженные в ЭМ при неразвивающейся беременности (НБ) и анэмбрионии (АЭ); Б — CNVs в материале анэмбрионий: ЭМ — распределение CNVs в экстраэмбриональной мезодерме; ЦХ — распределение CNVs в цитотрофобласте хориона; обе ткани — суммарное распределение CNVs в обеих тканях.

в обоих случаях затрагивала единственный ген *SDKI*. Данный ген кодирует белок клеточной адгезии, связь которого с аномальным протеканием эмбриогенеза неочевидна. Кроме того, при анэмбрионии нами были обнаружены микродупликация 11p15.1, показанная также Rajcan-Separovic [14], микродупликация 2p11.2, в то время как Viaggi с соавторами [24] зарегистрировали микроделетию 2p11.2, и микроделетия 2p21, в то время как в работе [24] регистрируется микродупликация в данном локусе. Вышеупомянутые хромосомные перестройки в нашем и зарубежных исследованиях затрагивали разные гены. При неразвивающейся беременности нами была выявлена микродупликация Xq28, показанная также Rajcan-Separovic [15] и микродупликация 7p14.3, в то время как в упомянутой работе [15] регистрировалась микроделетия этого региона. Гены, вовлеченные в данные CNVs, также не перекрывались в нашем и зарубежном исследовании. Таким образом, широкий спектр обнаруженных микроструктурных хромосомных aberrаций, а также отсутствие перекрытий с CNVs, зарегистрированными в других работах, усложняет поиск патогенетически значимых для эмбрионального развития CNVs.

Важно отметить, что в настоящее время исследования роли CNVs в этиологии ранних репродуктивных потерь находятся на стадии накопления данных. Принимая во внимание высокую частоту невынашивания беременности, характерную для человека, и возможную важную роль CNVs в этиологии ранних репродуктивных потерь, продолжение исследований в данном направлении, а также изучение функций генов, вовлеченных в CNVs, представляются чрезвычайно актуальными.

Список литературы

1. Macklon NS, Geraedts JP, Fauser BC. Conception to ongoing pregnancy: the «black box» of early pregnancy loss. Hum. Reprod. Update. 2002;8(4):333-343.
2. Неразвивающаяся беременность. Методические рекомендации МАРС / В.Е. Радзинский. — М.: Редакция журнала StatusPraesens, 2015. — 48 с.

3. Лебедев ИН, Кашеварова АА, Скрыбин НА и др. Матричная сравнительная геномная гибридизация (array-CGH) в диагностике хромосомного дисбаланса и CNV-полиморфизма при анэмбрионии. Материалы II национального конгресса «Дискуссионные вопросы современного акушерства». 2013;LXII (2):117-125.
4. Griffin DK. The incidence, origin and etiology of aneuploidy. *Int. Rev. Cytol.* 1996;167:263-295.
5. Bassett AS, Chow EW, Husted J et al. Clinical features of 78 adults with 22q11 Deletion Syndrome. *Am J Med Genet A.* 2005;138(4):307-313.
6. Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT. Schizophrenia and affective disorders-cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Med Genet A.* 2001;69(2):428-433.
7. Glessner JT, Wang K, Cai J et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature.* 2009;459(7246):569-573.
8. Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ et al. Copy number polymorphism in *Fcgr3* predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature.* 2006;439(7078):851-855.
9. Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K et al. Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am. J. Hum. Genet.* 2004;74:1168-1174.
10. Benkhalifa M, Kasakyan S, Clement P et al. Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro. *Prenat. Diagn.* 2005;25:94-900.
11. Shimokawa O, Harada N, Miyake N et al. Array comparative genomic hybridization analysis in first-trimester spontaneous abortions with «normal» karyotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 2006;140:1931-1935.
12. Conrad DF, Andrews TD, Carter NP et al. A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat. Genet.* 2006;38(1):75-81.
13. Menten B, Swerts K, Delle Chiaie B. Array comparative genomic hybridization and flow cytometry analysis of spontaneous abortions and mors in utero samples. *BMC Medical Genetics.* 2009;10:89-94.
14. Rajcan-Separovic E, Diego-Alvarez D, Robinson WP et al. Identification of copy number variants in miscarriage from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Hum. Reprod.* 2010;25:2913-2922.
15. Rajcan-Separovic E, Qiao Y, Tyson C et al. Genomic changes detected by array CGH in human embryos with developmental defects. *Hum. Reprod.* 2010;16:125-134.
16. Robberecht C, Pexsters A, Deprest J et al. Cytogenetic and morphological analysis of early products of conception following hysteroembryoscopy from couples with recurrent pregnancy loss. *Prenat. Diagn.* 2012;4:1-10.
17. Database of genomic variants. URL: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home> (дата обращения 15.01.2016)
18. Database of genomic variation and phenotype in humans using Ensembl Resources URL: <https://decipher.sanger.ac.uk/> (дата обращения: 20.01.2016).
19. NCBI Gene. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> (дата обращения: 1.03.2016).
20. NCBI PubMed. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (дата обращения: 1.03.2016).
21. Genome Browser University of California Santa Cruz. URL: <https://genome.ucsc.edu/> (дата обращения 20.03.2016).
22. Genome browser Ensembl. URL: <http://www.ensembl.org/index.html/> (дата обращения: 20.03.2016).
23. NCBI BLAST. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (дата обращения: 20.03.2016).
24. Viaggi CD, Savani S, Malacarne M et al. First-trimester euploid miscarriages analysed by array-CGH. *J Appl Genetics.* 2013;54(3):353-359.

Клинический случай редкой органической ацидурии

Еремина Е.Р.

ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет», ereelrob@rambler.ru

Представлено клиническое описание редкого наследственного заболевания обмена аминокислот, относящегося к группе органических ацидурий, — 3-гидрокси-3-метилглутаровой ацидурии, которое определяется дефицитом митохондриального фермента 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА лиазы. Болезнь у пациента манифестировала на третьи сутки жизни тоническими судорогами с нарушением кислотно-основных показателей. На фоне медикаментозной коррекции в отделении реанимации и интенсивной терапии в течение 36 часов состояние больного было стабилизировано, судороги купированы. При проведении тандемной масс-спектрометрии в крови обнаружен повышенный уровень 3-гидрокси-изовалерил-2-метил-3-гидрокси-бутилкарнитина. Определение органических кислот в моче больного показало повышение концентраций дикарбоновых кислот, которое характерно для наследственного заболевания обмена веществ 3-гидрокси-3-метилглутаровой ацидурии. При частичном анализе гена *HMGCL* в экзоне 5 определена мутация NM_00019 с.С392TS131L в гомозиготном состоянии, не описанная ранее в литературе. У отца и матери пробанда данная мутация обнаружена в гетерозиготном состоянии. На основании молекулярно-генетического диагноза семье даны рекомендации по пренатальной диагностике.

Ключевые слова: 3-гидрокси-3-метилглутаровая ацидурия, дефицит 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А-лиазы, гипогликемия, метаболический ацидоз.

Автор декларирует отсутствие конфликта интересов.

Clinical case of a rare organic aciduria

Eremina E.R.

Buryat State University, ereelrob@rambler.ru

The clinical description of a rare hereditary metabolic disease of an amino acid 3-hydroxy-3 methylglutaric aciduria is presented, which belonging to the group of organic aciduria and determined by a deficiency of the mitochondrial enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase. The disease manifested on the third day of life with tonic convulsions with a violation of acid-base indicators. Against the backdrop of medical correction in the intensive care unit and within 36 hours, the patient's condition was stabilized, the convulsions were stopped. Tandem mass spectrometry was performed, an elevated level of 3-hydroxy-isovaleryl-2-methyl-3-hydroxybutylarnitine was found in the blood. Determination of organic acids in the patient's urine showed an increase in the concentrations of dicarboxylic acids, which is characteristic for the hereditary metabolic disease of 3-hydroxy-3 methylglutar aciduria. Partial analysis of the exon 5 *HMGCL* gene determined the mutation NM_00019 с.С392TS131L in the homozygous state, not previously described in the literature. Father and mother of the proband heterozygous state mutation is found. The family received recommendations for prenatal diagnosis based on molecular genetic diagnosis.

Keywords: 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase deficiency, hypoglycemia, metabolic acidosis.

К группе наследственных органических ацидурий, которые характеризуются экскрецией неаминных органических кислот с мочой, относят около десятка различных нозологических форм. Эти заболевания возникают в результате нарушений в катаболизме аминокислот с разветвленной цепью, причиной которых является дефект активности фермента. К данной группе наследственной патологии обмена веществ относится 3-гидрокси-3-метилглутаровая ацидурия (ОММ 246450), в основе которой лежит дефицит 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА (ГМГ-КоА) лиазы [1–3].

ГМГ-КоА лиаза катализирует расщепление ГМГ-КоА на ацетоуксусную кислоту и ацетил-КоА, последнюю стадию кетогенеза и катаболизм лейцина [1, 4]. Мутационное изменение белка ГМГ-КоА лиазы, который расположен в матриксе митохондрий и в перок-

сисомах, приводит к недостаточности митохондриальной ГМГ-КоА лиазы в печени, почках, мозге, мышцах, лейкоцитах и фибробластах [1]. Для заболевания определен ген *HMGCL*, который состоит из 9 экзонов размером от 64 до 787 п.н. [3] и локализован на хромосоме 1р.36.11 [5].

Дефицит ГМГ-КоА лиазы — редкое в большинстве популяций заболевание, за исключением Саудовской Аравии [6] и стран Пиренейского полуострова (Португалия и Испания) [7, 8], в которых эта патология является наиболее частой среди органических ацидурий [6, 8]. Пациенты с этим заболеванием описаны в европейских странах [9, 10], также сообщается о больных с дефицитом ГМГ-КоА лиазы из Японии [6]. Для населения Тайваня частота дефицита ГМГ-КоА лиазы составляет менее 1 на 1 000 000 живорожденных [11].

Дефицит ГМГ-КоА лиазы наследуется аутосомно-рецессивно с полной пенетрантностью и у большинства больных манифестирует в неонатальном периоде или в первый год жизни [1, 6—8]. Описаны случаи, когда первые симптомы болезни проявлялись в возрасте от трех до 36 лет [12, 13].

Болезнь провоцируется инфекцией и протекает в виде приступов рвоты, летаргии с переходом в коматозное состояние. У всех пациентов с дефицитом ГМГ-КоА лиазы наблюдаются приступы метаболического ацидоза в сочетании с тяжелой гипогликемией, мягким кетозом, гипераммониемией, которые осложняются мышечной гипотонией и судорогами [1, 6]. Гепатомегалия и дисфункция печени наблюдаются у отдельных больных [1, 14].

Около 20% пациентов погибают от тяжелой гипогликемии или метаболической энцефалопатии, которым предшествовала инфекция или иммунизация [1, 9]. Разнообразная неврологическая симптоматика проявляется примерно у половины больных с дефицитом ГМГ-КоА лиазы. У некоторых больных могут наблюдаться задержка психомоторного развития и умственная отсталость [1, 2]. Когнитивные нарушения зафиксированы у 50% пациентов с недостаточностью ГМГ-КоА лиазы [9]. Обратимые изменения белого вещества головного мозга у больного младенца в возрасте 8 месяцев описаны при магнитно-резонансном исследовании [15]. У 3,5-летнего пациента с дефицитом ГМГ-КоА лиазы, который не имел симптомов болезни до этого возраста, найдены изменения белого вещества головного мозга кортикоспинального тракта [16]. Повреждение белого вещества головного мозга преимущественно в правой лобной и задней теменной долях описаны у аргентинской девочки с этой редкой ацидурией в возрасте 4 месяцев [17].

В целом нормальное развитие больных с дефицитом ГМГ-КоА лиазы возможно при квалифицированно подобранной диете и профилактике метаболических кризов [1].

Мы представляем клинический случай редкого аутосомно-рецессивного заболевания — ГМГ-КоА дефицита лиазы у больного Ж. Сведения о клинических проявлениях и течении заболевания у пациента получены при анализе медицинской документации. Мать и отец ребенка соматически здоровы, кровное родство между собой отрицают. Пациент Ж. от четвертой беременности, которая протекала на фоне преэклампсии в третьем триместре и закончилась самопроизвольными родами в 40 недель. Мальчик родился массой 3790 г при росте 52 см, с оценкой по шкале Апгар 7 баллов на первой минуте и 8 баллов на пятой минуте жизни. Из анамнеза известно, что ребенок от первой беременности умер на 7 сутки (судорожный синдром неуточненной этиологии), вторая беременность закончилась рождением здоровой девочки, третья беременность перестала развиваться на 4-й неделе.

Больной Ж. после рождения поступил в детское отделение в удовлетворительном состоянии. На вторые сутки жизни развилась гипертермия до 38,0°C, температура нормализовалась путем физических методов охлаждения. На третьи сутки жизни при отрицательной динамике, включая тонические судороги, пациент переведен в отделение реанимации и интенсивной терапии. Мальчик находился на искусственной вентиляции легких 36 часов, на фоне положительной динамики показателей кислотно-основного состояния был экстубирован, судороги купированы. По данным ультразвукового исследования описаны диффузные изменения паренхимы печени, печень выходит за пределы реберной дуги на 2 сантиметра.

При консультации больного Ж. врачом-генетиком указано на необходимость исключения наследственного нарушения белкового обмена. Даны рекомендации по соблюдению низкобелковой и низкожировой диеты, необходимости избегать длительное голодание, отказаться от иммунизации или осуществлять тщательный контроль при неизбежности её проведения.

При повторном ультразвуковом исследовании печени больного Ж. — размеры органа в пределах нормы, паренхима средней эхогенности, сосудистый рисунок не изменен. При пальпации печень на 1 сантиметр выходит из-за края реберной дуги.

Физиологические рефлексы вызываются симметрично с обеих сторон.

После лечения в неонатальном стационаре пациент Ж. выписан в удовлетворительном состоянии.

В результате проведения тандемной масс-спектрометрии (ФГБНУ «Медико-генетический научный центр») в крови пациента выявлено резкое повышение концентрации 3-гидрокси-изовалерил-2-метил-3-гидрокси-бутилкарнитина. Определение органических кислот в моче показало повышение концентраций следующих кислот: 3-гидрокси-3-метилглутаровой, 3-метилглутаровой, 3-гидроксиизовалериановой, 3-метилглутаконовой, 3-метилкротонилглицина. Перечисленные метаболиты в крови и моче свидетельствует о наследственном заболевании обмена веществ 3-гидрокси-3-метилглутаровой ацидурии у больного Ж. [1, 18]. При этой патологии меньшие, но заметные уровни других дикарбоновых кислот могут также обнаруживаться в моче [18].

У пациента Ж. при частичном анализе гена *HMGCL* в экзоне 5 выявлена мутация NM_00019 с.C392TS131L в гомозиготном состоянии. У отца и матери пробанда данная мутация обнаружена в гетерозиготном состоянии. Данных об этой мутации в гене *HMGCL* в литературе не найдено [19].

Среди мутаций гена *HMGCL*, которые известны в настоящее время, описаны мутации сайта сплайсинга, сдвига рамки считывания, миссенс- и нонсенс-мутации. В европейских странах, в которых редко встречаются больные с дефицитом ГМГ-КоА лиазы, описаны уникальные мутации в гене *HMGCL* [7, 9, 11]. В саудовской

популяции обнаружена общая этноспецифическая мутация R41Q в 89% случаев из 64 тестированных аллелей, что имеет важное значение для разработки пренатальной и преимплантационной диагностики. Авторы считают, что высокая частота указанной мутации связана с эффектом основателя [20].

Генотип-фенотипические корреляции для дефицита ГМГ-КоА лиазы не найдены, поскольку развитие болезни в значительной степени зависит от внешних факторов, таких, как гипогликемия, голодание или инфекционное заболевание [3, 7, 9].

Семье проведено медико-генетическое консультирование и даны следующие рекомендации: планирование беременности, периконцепционная профилактика. На основании результатов молекулярно-генетической диагностики возможно проведение пренатальной диагностики 3-гидрокси-3-метилглутаровой ацидурии у плода в сроке 8 недель беременности.

Анализ медицинской документации больного Ж. показал, что диагностика дефицита ГМГ-КоА-лиазы представляет сложности в клинической практике. Своевременная диагностика и лечение, направленное на профилактику метаболических кризов, в том числе сокращение времени между приемами пищи с соблюдением низкобелковой и низкожировой диеты, тщательный контроль состояния пациента при иммунизации, предотвращение инфекционных заболеваний, позволяют дать благоприятный прогноз для жизни больных этим заболеванием.

Список литературы

1. Краснопольская К.Д. Наследственные болезни обмена веществ. М.: Фохат, 2005. 364 с.
2. Lin WD, Wang CH, Lai CC et al. Molecular analysis of Taiwanese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency. *Clin Chim Acta*. 2009 Mar; 401(1-2):33-6.
3. Pie J, Casals N, Puisac B et al. Molecular basis of 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *J PhysiolBiochem*. 2003 Dec;59(4):311-21.
4. Faull, K.F., Bolton, P.D., Halpern, B., Hammond, J., Danks, D.M. The urinary organic acid profile associated with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Clin. Chim. Acta*. 1976 73: 553-559.
5. Mitchell GA, Robert MF, Hruz PW et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL): cloning of human and chicken

liver HL cDNAs and characterization of a mutation causing human HL deficiency. *J. Biol. Chem*. 1993. 268: 4376-4381.

6. Muroi J, Yorifuji T, Uematsu A et al. Molecular and clinical analysis of Japanese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HL) deficiency. *Hum. Genet*. 2000 Oct 107: 320-326.

7. Pie J, Lopez-Vinas E, Puisac B, et al. Molecular genetics of HMG-CoA lyase deficiency. *Mol. Genet. Metab*. 2007. Nov;92(3):198-209.

8. Cardoso ML, Rodrigues MR, Leao E, et al. The E37X is a common HMGCL mutation in Portuguese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric CoA lyase deficiency. *Mol. Genet. Metab*. 2004. Aug;82(4):334-8.

9. Grunert SC, Schlatter SM, Schmitt RN et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: Clinical presentation and outcome in a series of 37 patients. *Mol. Genet. Metab*. 2017 Jul;121(3):206-215.

10. Ozand PT, Devol EB, Gascon GG. Neurometabolic diseases at a national referral center: five years experience at the King Faisal Specialist Hospital and Research Centre. *J. Child.Neurol*. 1992. 7 (suppl.): 4-11.

11. Lin WD, Wang CH, Lai CC et al. Molecular analysis of Taiwanese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency. *ClinChimActa*. 2009 Mar;401(1-2):33-36.

12. Pierron S, Giudicelli H, Moreigne M et al. Late onset 3-HMG-CoA lyase deficiency: a rare but treatable disorder. *Arch Pediatr*. 2010 Jan;17(1):10-3.

13. Bischof F, Nagele T, Wanders RJ et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency in an adult with leukoencephalopathy. *Ann Neurol*. 2004 Nov;56(5):727-30.

14. Plochl E, Bachmann C, Colombo JP et al. 3-hydroxy-3-methylglutaruria. Clinical aspects, follow-up and therapy in a young child. *Klin Padiatr*. 1990 Mar-Apr;202(2):76-80.

15. Zafeiriou DI, Vargiami E, Mayapetek E et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a lyase deficiency with reversible white matter changes after treatment. *Pediatr Neurol*. 2007 Jul;37(1):47-50.

16. Yilmaz Y, Ozdemir N, Ekinici G et al. Corticospinal tract involvement in a patient with 3-HMG coenzyme A lyase deficiency. *Pediatr Neurol*. 2006 Aug;35(2):139-41.

17. Dodelson de Kremer R, Kelley RI, Depetris de Boldini C et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency as a cause of severe neurological damage. *Medicina (B Aires)*. 1992;52(1):30-6.

18. Gibson KM, Breuer J, Nyhan WL. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: review of 18 reported patients. *Eur J Pediatr*. 1988 Dec;148(3):180-6.

19. www.ncbi.nlm.nih.gov

20. Al-Sayed M, Imtiaz F, Alsmadi OA et al. Mutations underlying 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency in the Saudi population. *BMC Med Genet*.2006 Dec 16;7:86.

Правила оформления статей в журнале «Медицинская генетика»

К публикации принимаются ранее не опубликованные работы по профилю журнала: теоретические и обзорные статьи, результаты завершенных оригинальных исследований, краткие сообщения, описания клинических случаев, рецензии на книги, комментарии читателей к ранее опубликованным статьям и письма к редактору, информация о научных мероприятиях. Не принимаются к печати статьи, представляющие собой отдельные этапы незавершенных исследований, а также статьи, посвященные исследованиям, выполненным с нарушением этических норм и правил и норм гуманного обращения с биообъектами. Решение о публикации принимается редколлегией журнала после рецензирования рукописи с учетом научной значимости и актуальности представленных материалов. При рассмотрении полученных авторских материалов редакционная коллегия руководствуется «Едиными требованиями к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» (www.ICMJE.org). Статьи, отклоненные редакционной коллегией, повторно не принимаются и не рассматриваются.

Статья должна быть написана на русском или английском языке, представлена в одном печатном экземпляре в формате любой версии текстового редактора Microsoft Word for Windows или прислана в электронном виде на e-mail редакции и размещена на сайте журнала www.medgen-journal.ru. Статья должна сопровождаться направлением (сопроводительным письмом) от учреждения, где была выполнена научная работа.

I. Рукопись. Направляется в редакцию в электронном варианте через online форму на сайте www.medgen-journal.ru. Загружаемый в систему файл со статьей должен быть представлен в формате Microsoft Word (иметь расширение *.doc, *.docx, *.rtf).

1. Рекомендуемый объем полного текста рукописи (оригинальные исследования, лекции, обзоры), в том числе таблицы и список литературы, не должен превышать 6000 слов. Объем статей, посвященных описанию клинических случаев, не более 4000 слов; краткие сообщения и письма в редакцию — в пределах 1500 слов. Количество слов в тексте можно узнать через меню Word («Файл» — «Просмотреть свойства документа» — «Статистика»). Если превышение рекомендованного объема статьи, по мнению автора, оправдано, и текст не может быть уменьшен, решение о публикации принимается на заседании редколлегии по рекомендации рецензента.

2. Формат текста рукописи. Текст должен быть напечатан шрифтом Times New Roman, иметь размер 12 pt и межстрочный интервал 1,0 pt. Отступы с каждой стороны страницы 2 см. Выделения в тексте можно проводить ТОЛЬКО курсивом или полужирным начертанием букв,

но НЕ подчеркиванием. Из текста необходимо удалить все повторяющиеся пробелы и лишние разрывы строк (в автоматическом режиме через сервис Microsoft Word «найти и заменить»).

3. Файл с текстом статьи, загружаемый в форму для подачи рукописей, должен содержать всю информацию для публикации (в том числе рисунки и таблицы). Структура рукописи должна соответствовать шаблону:

Русскоязычная аннотация

Название статьи.

Авторы статьи. При написании авторов статьи фамилию следует указывать до инициалов имени и отчества (Иванов П.С., Петров С.И., Сидоров И.П.)

Название учреждения. Необходимо привести официальное ПОЛНОЕ название учреждения (без сокращений) и адрес электронной почты для контактов с авторами. Если в написании рукописи принимали участие авторы из разных учреждений, необходимо соотнести названия учреждений и ФИО авторов путем добавления цифровых индексов в верхнем регистре перед названиями учреждений и фамилиями соответствующих авторов.

Резюме статьи должно быть (если работа оригинальная) структурированным: актуальность, цель, материалы и методы, результаты, выводы. Резюме должно полностью соответствовать содержанию работы. Объем текста резюме должен быть в пределах 100-300 слов.

Ключевые слова. Необходимо указать ключевые слова — от 3 до 10, способствующих индексированию статьи в поисковых системах. Ключевые слова должны парно соответствовать на русском и английском языках.

Англоязычная аннотация

Article title. Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию;

Author names. ФИО необходимо писать в соответствии с заграничным паспортом, или так же, как в ранее опубликованных в зарубежных журналах статьях. Авторам, публикующимся впервые и не имеющим заграничного паспорта, следует воспользоваться стандартом транслитерации BGN/PCGN (см. Ниже);

Affiliation. Необходимо указывать ОФИЦИАЛЬНОЕ АНГЛОЯЗЫЧНОЕ НАЗВАНИЕ УЧРЕЖДЕНИЯ и адрес электронной почты для контактов с авторами. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ eLibrary.ru;

Abstract. Англоязычная версия резюме статьи должна по смыслу и структуре полностью соответствовать русскоязычной и быть грамотной с точки зрения английского языка;

Key words. Для выбора ключевых слов на английском следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США — Medical Subject Headings (MeSH).

Полный текст (на русском, английском или обоих языках) должен быть структурированным по разделам. Структура полного текста рукописи, посвященной описанию результатов оригинальных исследований, должна соответствовать общепринятому шаблону и содержать разделы: введение (актуальность), цель и задачи, материалы и методы (пациенты и методы), результаты, выводы, обсуждение (дискуссия).

Дополнительная информация (на русском, английском или обоих языках)

Информация о конфликте интересов. Авторы должны раскрыть потенциальные и явные конфликты интересов, связанные с рукописью. Конфликтом интересов может считаться любая ситуация (финансовые отношения, служба или работа в учреждениях, имеющих финансовый или политический интерес к публикуемым материалам, должностные обязанности и др.), способная повлиять на автора рукописи и привести к сокрытию, искажению данных, или изменить их трактовку. Наличие конфликта интересов у одного или нескольких авторов не является поводом для отказа в публикации статьи. Выявленное редакцией сокрытие потенциальных и явных конфликтов интересов со стороны авторов может стать причиной отказа в рассмотрении и публикации рукописи.

Информация о спонсорстве. Необходимо указывать источник финансирования как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется.

Благодарности. Авторы могут выразить благодарности людям и организациям, способствовавшим публикации статьи в журнале, но не являющимся её авторами.

Список литературы. В библиографии (пристатейном списке литературы) каждый источник следует помещать с **новой** строки под порядковым номером.

В списке все работы перечисляются в порядке цитирования, а НЕ в алфавитном порядке.

Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях и лекциях допускается до 20, в обзорах — до 60 источников;

В тексте статьи ссылки на источники приводятся в квадратных скобках арабскими цифрами.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены **ВСЕ АВТОРЫ**. В случае, если у публикации более 4 авторов, то после 3-го автора необходимо поставить сокращение «и др.» или «et al.». Недопустимо сокращать название статьи. Название англоязычных журналов следует приводить в соответствие с каталогом названий базы данных MedLine. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать

его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя.

Формат пристатейных списков литературы должен соответствовать требованиям и стандартам MedLine (U.S. National Information Standards Organization NISO Z39.29-2005 [R2010]), что обеспечит в дальнейшем индексирование статьи в международных базах данных (см. раздел «Оформление библиографии»). При ссылке на журнальные статьи (наиболее частый источник информации для цитирования) следует придерживаться шаблона:

Автор АА, Соавтор ББ. Название статьи. Название журнала. Год;Том(Номер):стр.-стр.

Следует обратить внимание на то, что после инициал авторов не следует ставить точки. Название статьи и журнала не следует разделять знаком «//». Для описания даты выхода, тома, номера журнала и страниц, на которых опубликована статья, следует использовать сокращенный формат записи. Пример:

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. NEJM. 2002 Jul 25;347(4):284-287.

Дедов ИИ, Шестакова МВ. Эпидемиология сахарного диабета и микрососудистых осложнений. Сахарный диабет. 2010;(3):17-22.

II. Английский язык и транслитерация. При публикации статьи часть или вся информация должна быть дублирована на английский язык или транслитерирована (написана латинскими буквами). При транслитерации рекомендуется использовать стандарт BGN/PCGN (United States Board on Geographic Names / Permanent Committee on Geographical Names for British Official Use), рекомендованный международным издательством Oxford University Press, как «British Standard». Для транслитерации текста в соответствии со стандартом BGN можно воспользоваться ссылкой <http://ru.translit.ru/?account=bgn>.

III. Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нём информацию. Ссылки на таблицы в тексте обязательны.

IV. Рисунки (графики, диаграммы, схемы, чертежи и другие иллюстрации, рисованные средствами MS Office) должны быть контрастными и четкими. Объем графического материала минимальный (за исключением работ, где это оправдано характером исследования). Каждый рисунок должен быть помещен в текст и сопровождаться нумерованной подрисуночной подписью. Ссылки на рисунки в тексте обязательны.

V. Фотографии, отпечатки экранов мониторов (скриншоты) и другие нерисованные иллюстрации необходимо загружать отдельно в специальном разделе формы для подачи статьи в виде файлов формата *.jpeg, *.bmp, *.gif (*.doc и *.docx — в случае, если на изображе-

ние нанесены дополнительные пометки). Разрешение изображения должно быть >300 dpi. Файлам изображений необходимо присвоить название, соответствующее номеру рисунка в тексте. В описании файла следует отдельно привести подрисуючную подпись, которая должна соответствовать названию фотографии, помещаемой в текст (пример: Рис. 1. Сеченов Иван Михайлович).

VI. Соответствие нормам этики. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие. В случае проведения исследований с участием животных — соответствовал ли протокол исследования этическим принципам и нормам проведения биомедицинских исследований с участием животных. В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, её расположения, номера протокола и даты заседания комитета).

VII. Сопроводительные документы. При подаче рукописи в редакцию журнала необходимо дополнительно загрузить файлы, содержащие сканированные изображения заполненных и заверенных сопроводительных документов (в формате *.pdf). К сопроводительным документам относится сопроводительное письмо с места работы автора с печатью и подписью руководителя организации, а также подписями всех соавторов.

VIII. Заполнение on-line формы. Для успешной индексации статей в отечественных и международных базах данных при подаче рукописи в редакцию через on-line форму необходимо отдельно подробно ввести все её метаданные. Некоторые метаданные должны быть введены отдельно на русском и английском языках: название учреждения, в котором работают авторы рукописи, подробная информация о месте работы и занимаемой должности, название статьи, аннотация статьи, ключевые слова, название спонсирующей организации.

Авторы. ВНИМАНИЕ! ФИО АВТОРОВ заполняется только на английском языке. Необходимо полностью заполнить анкетные данные всех авторов. Адрес электронной почты автора, указанного как контактное лицо для переписки, будет опубликован для связи с коллективом авторов в тексте статьи, и будет в свободном виде доступен пользователям сети Интернет и подписчикам печатной версии журнала.

Название статьи. Должно быть полностью продублировано на английском языке.

Аннотация статьи. Должна полностью совпадать с текстом в файле рукописи как на английском, так и на русском языках.

Индексация статьи.

Ключевые слова. Необходимо указать ключевые слова — от 3 до 10, способствующих индексированию статьи в поисковых системах. Ключевые слова должны быть попарно переведены на английский язык. Для выбора ключевых слов на английском следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США — Medical Subject Headings (MeSH).

Язык. Необходимо указать язык, на котором написан полный текст рукописи. В случае, когда автор публикует статью на двух языках, необходимо указать двойную индексацию по языку (например, [ru; en])

Список литературы. Пристатейный список литературы должен быть оформлен в соответствие с «Правилами оформления пристатейных списков литературы», разработанными в соответствии с рекомендациями MedLine и Scopus (стандарт U.S. National Information Standards Organization NISO Z39.29-2005 [R2010]).

Дополнительные данные в виде отдельных файлов нужно отправить в редакцию вместе со статьёй сразу после загрузки основного файла рукописи. К дополнительным файлам относятся сопроводительные документы, файлы изображений, исходные данные (если авторы желают представить их редакции для ознакомления или по просьбе рецензентов), видео- и аудиоматериалы, которые целесообразно опубликовать вместе со статьёй в электронном журнале. Перед отправкой следует внести описание каждого отправляемого файла. Если информация из дополнительного файла должна быть опубликована в тексте статьи, необходимо дать файлу соответствующее название (так, описание файла изображения должно содержать нумерованную подрисуючную подпись, например: Рис. 3. Макропрепарат удалённой кисты.).

Завершение отправки статьи. После загрузки всех дополнительных материалов необходимо проверить список отправляемых файлов и завершить процесс отправки статьи. После завершения процедуры отправки (в течение 7 суток) на указанный авторами при подаче рукописи адрес электронной почты придет оповещение о получении статьи редакцией (отсутствие письма является подтверждением того, что рукопись редакцией не получена). Автор может в любой момент связаться с редакцией (редактором или рецензентами), а также отследить этап обработки своей рукописи через личный кабинет на сайте <http://medgen-journal.ru>.