

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ЯКУТСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР КОМПЛЕКСНЫХ МЕДИЦИНСКИХ ПРОБЛЕМ»
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ»

На правах рукописи

СТЕПАНОВА СВЕТЛАНА КИМОВНА

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ
ЛОКУСА МИОТОНИНПРОТЕИНАЗЫ
В ЯКУТСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ**

03.02.07 – генетика

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор В.А. Степанов

ТОМСК - 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр
Оглавление	2
Список сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	13
1.1. Динамические мутации. Молекулярный механизм развития динамических мутаций	13
1.2. Мышечные дистрофии	23
1.2.1. Миотоническая дистрофия 1 типа	24
1.2.2. Миотоническая дистрофия 2 типа	32
1.2.3. Миотоническая дистрофия 3 типа	34
1.2.4. Популяционные исследования миотонической дистрофии	35
1.2.5. Молекулярно-генетические исследования гена мышечной протеинкиназы (<i>DMPK</i>)	40
1.2.6. Исследование полиморфизма гена мышечной протеинкиназы	42
1.2.7. CTG - повторы в гене мышечной протеинкиназы	44
1.3. Этногенез популяций Северной Евразии	47
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.	58
2.1. Клинико-генеалогическая характеристика больных и их родственников из обследованных семей	58
2.2. Характеристика исследованных популяционных выборок	61
2.3. Молекулярно-генетические методы исследования	64
2.3.1. Выделение ДНК из лейкоцитов крови	64
2.3.2. Анализ участка CTG-повторов в гене <i>DMPK</i>	65
2.3.3. Детекция полиморфных вариантов по шести SNP-маркерам.	67
2.3.4. Анализ CTG- повторов	69
2.3.5. Анализ микросателлитных маркеров в локусе <i>DMPK</i>	70
2.4. Статистическая обработка результатов	71

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	75
3.1. Популяционно-генетический анализ variability SNP и CTG-повторов в гене <i>DMPK</i> в популяциях Северной Евразии.	75
3.1.1. Генетическая variability однонуклеотидных полиморфных вариантов в гене <i>DMPK</i> в шести популяциях Северной Евразии.	75
3.1.2. Анализ variability CTG-повторов в гене <i>DMPK</i> в шести популяциях Северной Евразии.	81
3.2. Характеристика генетической variability локуса <i>DMPK</i> у больных миотонической дистрофией и в якутской популяции.	87
3.2.1. Анализ распределения частот SNP-аллелей и генотипов в локусе <i>DMPK</i> в якутских выборках.	87
3.2.2. Структура SNP-гаплотипов в гене <i>DMPK</i> в якутских выборках	91
3.2.3. Структура STR-гаплотипов в гене <i>DMPK</i> в якутских выборках	94
3.3 Оценка возраста мутации в гене <i>DMPK</i> и популяционно-генетический механизм накопления МД в якутской популяции.	100
Заключение	110
Выводы	113
Список литературы	114
Приложения	145

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АР	– аутосомно-рецессивный
АД	– аутосомно-доминантный
АФ	– аутосомно-рецессивная атаксия Фридрейха
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
МГК	– медико-генетическая консультация
МЗ	– мультифакториальные заболевания
НИИ МГ	– научно-исследовательский институт медицинской генетики
НБНС	– наследственные болезни нервной системы
ПААГ	– полиакриламидный гель
ПДРФ	– полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РБ №1 –	– Республиканская больница №1 – Национальный центр
НЦМ	медицины
РС (Я)	– Республика Саха (Якутия)
СО РАМН	– Сибирское отделение Российской академии медицинских наук
СЦА 1 типа	– спиноцеребеллярная атаксия 1-го типа
ТН	– тип наследования
ШМТ 1 типа	– невральной амиотрофии Шарко–Мари–Тус 1 типа
ХГ	– хорея Гентингтона
ЭКГ	– электрокардиограмма
ЭМГ	– электромиография
ФГБУ	– Федеральное государственное бюджетное учреждение
ЭЭГ	– электроэнцефалограмма
ЯНЦ«КМП»	– Якутский научный центр Комплексных медицинских проблем
СО РАМН	– Сибирское отделение Российской академии медицинских наук
3-М	– аббревиатура фамилий 3 авторов (Марвелл, Малвакс и МакКьюсик), впервые описавших синдром, получивший их имя
AMOVA	– analysis of molecular variance, анализ молекулярной дисперсии

МД	– миотоническая дистрофия
OR	– odds ratio, отношение шансов
ОФМД	– окулофаренгиальная миодистрофия
FRAXA	– синдром фрагильной хромосомы А
LD	– linkage disequilibrium, неравновесие по сцеплению
NCBI	– National Center for Biotechnology Information, Национальный центр биотехнологической информатизации
OMIM	– Online Mendelian Inheritance in Man - номер наследственной болезни или признака в международном каталоге МакКьюсика
SNP	– single nucleotide polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм
STR	– short tandem repeat, короткие tandemные повторы
<i>DMPK</i>	– dystrophia myotonic-protein kinase, ген белка миотонинпротеинкиназы
<i>PAPBN1</i>	– ген поли-(А)-связывающего белка 2
SOPH	– синдром низкорослости с колбочковой дисфункцией, атрофией зрительного нервов и пельгеровской аномалией лейкоцитов

ВВЕДЕНИЕ

По результатам генетико-эпидемиологических, молекулярно-генетических исследований в Республике Саха (Якутия) (РС(Я)), выявлена высокая частота и широкий спектр наследственной патологии, а также накопление отдельных форм моногенных болезней: спиноцереbellарной атаксии 1-го типа, наследственной энзимопенической метгемоглобинемии 1-го типа, окулофаренгиальной миодистрофии, 3М-синдром и т.д. (Ноговицына, 2001; Назаренко, 2004; Тарская, 2004; Захарова, 1982; Банщикова, 2002; Барашков, 2007; Пузырев, Максимова, 2008; Максимова, 2007; 2008, 2009).

В структуре моногенных заболеваний (МЗ) значительную часть составляют наследственные болезни нервной системы (НБНС) (Хидиятова, 2008), для 300 из которых полностью расшифрованы молекулярные дефекты или установлена хромосомная локализация мутантных генов. Частыми наследственными заболеваниями условно принято считать такие, распространенность которых составляет $> 1: 50000$ населения (Гинтер, Зинченко, 2006). К ним относятся такие НБНС, как миотоническая дистрофия, хорея Гентингтона, миодистрофия Дюшенна/Беккера, моторно-сенсорные нейропатии, спиноцереbellарная атаксия и другие.

НБНС носят тяжелый прогрессирующий характер, приводящий к ранней инвалидизации, а иногда и смерти больного. В настоящее время эффективное лечение возможно лишь для некоторых из этих заболеваний. Многие НБНС являются гетерогенными как клинически так и генетически, что значительно затрудняет их дифференциальную диагностику и, соответственно, медико-генетическое консультирование (МГК). Для большинства заболеваний существуют популяционные различия, как по распространенности, так и по спектру и частоте мутаций в генах, детерминирующих их развитие. Поэтому для обеспечения наиболее эффективного МГК необходимо изучение распространенности и молекулярно-генетических основ наследственных заболеваний (НЗ) в отдельных регионах и этнических группах. Причины

распространения в регионе тех или иных НЗ могут быть связаны как со структурными особенностями ответственных генов, так и с генетической структурой популяций, формирование которых происходит под воздействием различных факторов микроэволюции, среди которых в настоящее время наиболее значимыми могут являться дрейф генов и миграции (Хидиятова, 2008). Одним из источников нестабильности генома является экспансия тринуклеотидных повторов, ответственная за патогенез большого числа нейродегенеративных заболеваний человека (Imbert et al., 1998).

Ведущее место занимают НБНС с молекулярным механизмом экспансии тринуклеотидных повторов. В РС (Я) выделены пять форм наследственной патологии, названных «якутскими» наследственными болезнями, имеющих высокую распространенность у якутов в сравнении с мировым народонаселением. Три из них относятся к заболеваниям нервной системы: спиноцеребеллярная атаксия I-го типа (Кузьмина, Коротов, 1994, Платонов, 2003; Брахфогель, 2000, Платонов, 2004), миотоническая дистрофия (Сухомясова, 2005), окулофарингеальная мышечная дистрофия (Максимова, 2009). Распространенность миотонической дистрофии (МД) в разных регионах и этнических группах различна. В среднем по миру 4,0-5,0 на 100 тысяч населения (Harlye, 2004). Самая высокая частота встречается в Квебеке (Канада) 158 на 100 тысяч населения (Matnien, 2012), в Юго-Восточной Азии низкая частота, редко или вообще отсутствует в Южной и Центральной Африке (описан единственный случай в нигерийской семье). В популяции якутов частота МД достигает максимального значения в сравнении с другими популяциями России (21,28 на 100 тыс. человек) (Сухомясова, 2005), именно поэтому заболевание заслуживает пристального изучения в данном регионе.

Миотоническая дистрофия (МД, OMIM:160900) – это аутосомно-доминантное многосистемное заболевание, характеризующееся клиническим полиморфизмом у обоих полов по началу заболевания и тяжести течения, обусловленным вариабельностью экспрессии гена. Главные клинические проявления МД: миотония, мышечная слабость, катаракта, аритмии

сердца, облысение со лба, нарушенная толерантность к глюкозе, умственная отсталость. Мышечные судороги особенно выражены на руках, челюстях, языке (в виде фибрилляции). При данном заболевании характерно варьирующее начало заболевания: от пренатального периода до 50—60 лет. Различают четыре формы по возрастному «пику» начала заболевания: врождённая, юношеская, классическая (20—30 лет) и минимальная (50—60 лет). Это объясняется различиями в числе тринуклеотидных повторов в локусе миотонической дистрофии. Анализ аллельного полиморфизма триплетных СТG-повторов у здоровых лиц из различных популяций России обнаружил низкий уровень генетического разнообразия и низкое содержание нестабильных аллелей в популяции якутов, это говорит о большей генетической гомогенности данной популяции (Попова, 2002). Результаты исследований нормального полиморфизма гена миотонической дистрофии в популяциях РС (Я) косвенно свидетельствуют о том, что накопление данного заболевания обуславливается эффектом основателя. Возможно, что происхождение МД у якутов связано с европеоидным компонентом генофонда, т.к. заболевание встречается преимущественно в европеоидных популяциях (Федорова, 2005). Подавляющее большинство изученных до сих пор мутантных МД - хромосом в различных популяциях имеют один гаплотип, что указывает на их общее происхождение (Tishkoff et al., 1998).

Вариабельность тракта тринуклеотидных повторов в гене миотонинпротеинкиназы (*DMPK*) различных популяциях мира исследована довольно хорошо (Neville, 1994; Tishkoff, 1998; Priyadarshi, 2001; Pan, 2001, Amenabar, 2005; Acton, 2007; Freitas et al., 2007; Tweerasasawat, 2010; Magana, 2011). По населению России есть данные о распространенности аллелей СТG-повторов в ряде популяций европейской части (русские, украинцы, фино-угорские популяции Волго-Уральского региона) и у якутов. В то же время, в гене *DMPK* описано более 1000 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) (www.genecards.org), исследования которых проводились в популяциях Тайваня (Pan, 2001), Японии (Yamagata, 1994), Эфиопии (Gennarelli, 1999),

Южной Африки (Goldman,1995), Сербии (Krndija,2005), Ирана (Shojasaffar, 2008), Китая (Wu, 2011), Таиланда (Theerasasawat, 2010), Кореи (Kwon, 2010), Западной Европы (Ensembl). Исследования гаплотипов в локусе *DMPK* как в популяционных выборках, так и в связи с миотонической дистрофией только начались, и в литературе и базах данных имеются отрывочные данные о частотах SNP-гаплотипов в отдельных популяциях, полученные на разных наборах SNP (Попова, 2002; Walther, 2002; Ćuljković, 2002; Kamatani, 2004; Temmerman, 2004; Yotova, 2005; Kwon, 2010). Эти данные демонстрируют значительные межпопуляционные отличия в частотах гаплотипов в локусе *DMPK* и накопление отдельных гаплотипов у больных МД. Популяционные данные по генетической вариабельности локуса *DMPK* позволили предположить происхождение мутации, приводящей к МД, в популяции, предковой по отношению к населению Европы и Азии. Остается дискуссионным вопрос о связи этой мутации с расселением из Африки – некоторые авторы оценивают время происхождения мутации периодом до миграции предковой популяции из Африки (Tishkoff et al., 1998), другие же предполагают ее возникновение уже после появления современного человека вне Африки. Частоты аллелей и гаплотипов, история формирования гаплотипов в локусе *DMPK* в популяциях Северной Евразии остается неизученной. До конца не ясны и популяционные механизмы, приведшие к накоплению МД у населения Республики Саха (Якутия).

Цель данной работы - охарактеризовать генетическую вариабельность локуса *DMPK* у якутов, больных миотонической дистрофией и в популяциях Северной Евразии; оценить время возникновения мутации в якутской популяции.

Исходя из цели, сформулированы следующие **задачи**:

1. Оценить генетическую вариабельность однонуклеотидных полиморфных вариантов и СТG-повторов в гене *DMPK* в популяциях Северной Евразии.

2. Охарактеризовать структуру SNP-гаплотипов в гене *DMPK* у больных МД и в популяции якутов
3. Проанализировать структуру STR-гаплотипов в гене *DMPK* у больных МД и в популяции якутов. Дать оценку возраста мутации в гене *DMPK* и охарактеризовать популяционно-генетический механизм накопления МД в якутской популяции.

Научная новизна:

Впервые изучена молекулярная структура гена *DMPK* по двум группам маркеров (SNP и STR), маркирующих область динамической мутации в якутской популяции, проанализирована взаимосвязь СТG-повторов и SNP-маркеров. Впервые описана генетическая вариабельность, генетическая дифференциация, структура SNP-гаплотипов и структура неравновесия по сцеплению в локусе *DMPK* в популяционных выборках русских, киргизов, хантов, бурят, кетов. Впервые дана оценка возраста мутации в гене миотонинпротеинкиназы у якутов. По исследованным SNP впервые выявлены мажорные гаплотипы, характерные для группы больных МД якутов.

Практическая значимость:

Данные, полученные в работе, могут быть использованы в медико-генетическом консультировании больных с МД и их семей, в косвенной диагностике МД, в планировании профилактических мероприятий, в программах пренатального и неонатального скрининга наследственных болезней в якутской популяции. Информация о генетическом разнообразии и дифференциации якутов и других популяций Северной Евразии и данные о возрасте мутации и механизме накопления заболевания у якутов может быть использована этнографами, антропологами, историками, лингвистами, изучающими этногенез и происхождение якутов.

Положения, выдвигаемые на защиту:

1. Обнаружена значимая генетическая дифференциация популяций Северной Евразии по SNP-маркерам и CTG-повторам гена *DMPK*.
2. У больных миотонической дистрофией из якутской популяции наблюдаются два основных SNP-гаплотипа. Первый из них (TTTCTC), встречающийся с частотой 40%, является общим для якутов и всех ранее исследованных популяций. Второй гаплотип (GTCCTT, 18,3%) встречается только у якутов и не выявлен среди больных МД из других популяций.
3. Гаплотипом основателя, сцепленным с динамической мутацией в локусе *DMPK* у якутов, является, обнаруженный с помощью анализа фланкирующих STR-маркеров, гаплотип 8-3-6-9-1-2. Возраст мутации МД в якутской популяции, оцененный по вариабельности STR-гаплотипов, составил $3179 \pm 704,84$ лет.

Апробация работы: Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на V съезде Российского общества медицинских генетиков (Уфа, 2005); на VIII научной конференции «Генетика человека и патология» (Томск, 2007, 2014); на межрегиональной научно-практической конференции «Молекулярно-клеточные аспекты патологии человека на Севере» (Якутск, 2007); на межрегиональной научно-практической конференции «Современные аспекты эпидемиологии, диагностики и лечения неврологических заболеваний на Севере» (Якутск, 2008); на научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицинской генетики на Крайнем Севере» (Якутск, 2009); на VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2010» (Москва, 2010, 2014), на VI съезде Российского общества медицинских генетиков (Ростов - на - Дону, 2010), на межлабораторных семинарах ФГБНУ «ЯНЦ КМП» (Якутск, 2007, 2008, 2010, 2011, 2014); на межлабораторном семинаре ФГБНУ «НИИ МГ» (Томск, 2009, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 24 печатные работы.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, изложения и обсуждения полученных результатов, общего заключения, выводов, списка литературы и приложения. Список литературы включает 293 источников (112 отечественных и 181 иностранных). Диссертация содержит 10 рисунков и 25 таблиц (10 таблиц в тексте диссертации и 15 таблиц в Приложении).

ГЛАВА I

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1.Динамические мутации. Молекулярный механизм развития динамических мутаций.

Причиной некоторых наследственных заболеваний человека может быть экспансия (увеличение числа) тандемных тринуклеотидных повторов (ТТП), в норме присутствующих в некоторых генах (Klemer et al., 1991). Тринуклеотидные повторы ДНК, экспрессирующиеся в полиглутаминовые и полиаланиновые тракты аминокислотных остатков, обуславливающие развитие 18 нозологий, а также микросателлитные повторы, экспрессирующиеся в аминокислотные последовательности полипептидов, обуславливающих развитие еще 9 нозологий являющихся особенно значимыми для молекулярной медицины. Результатом анализа этих необычных данных стало открытие нового биологического феномена - экспансии нуклеотидных повторов, роста числа их копий в геноме человека, а также нового класса болезней экспансии. (Мутовин, 2010).

Этот принципиально новый тип мутаций получил название динамических. Наиболее известным примером биологической значимости повторяющихся фрагментов ДНК являются болезни экспансии тринуклеотидных повторов (ТНП), при которых увеличение числа триплетов, по сравнению с нормой, приводит к экспрессии патологического состояния через промежуточную стадию премутации (Пузырев, Степанов,1997). Такой генетический механизм выявлен для синдрома хрупкой X-хромосомы (Fu et al., 1991; Caskey et al., 1992), спинальной и бульбарной мышечной амиотрофии (La Spada et al., 1991, 1992), миотонической дистрофии (Harley et al., 1992), болезни Гентингтона (Rubinsztein et al., 1993), спиноцеребеллярной атаксии первого типа (Orr et al., 1993) и ряда других наследственных болезней человека (Aaltonen et al. 1993, Nagafuchi et al., 1994). На сегодняшний день список

болезней экспансии насчитывает, по крайней мере, более 29 нозологий, и это, по-видимому, не предел. В настоящее время динамические мутации рассматриваются как новый фундаментальный механизм изменчивости.

Одним из важных аспектов молекулярно-генетических исследований болезней «экспансии» является изучение характера полиморфизма локусов, содержащих повторяющиеся последовательности в соответствующих генах среди здоровых лиц в популяционных выборках. Такой анализ направлен на познание механизмов возникновения и распространения болезней «экспансии» в популяциях человека. Предполагается, что чем больше в популяции аллелей, близким к верхней границе нормы («переходных» аллелей), являющихся более нестабильными и склонными к дальнейшей экспансии, тем выше может быть частота соответствующей мутации в данной популяции (Иллариошкин и др., 2006).

Новый класс мутаций - динамических мутаций, вызванный увеличением числа копий простых повторяющихся последовательностей, был открыт 1991 году. Практически одновременно была описана экспансия триплетных повторов в кодирующей области гена рецептора андрогенов (при болезни Кеннеди) (La Spada et al, 1991) и в области ломкого сайта X-хромосомы в некодирующей области ранее не описанного гена FMR1 (при синдроме Мартина-Белла) (Kremer et al, 1991). Многие тринуклеотидные повторы, локализованные в транскрибируемых или регуляторных областях генов, характеризуются высоким уровнем популяционной изменчивости, в пределах которого не наблюдается фенотипических нарушений (то есть болезнь не развивается). Болезнь развивается лишь тогда, когда количество повторов в этих сайтах превосходит определённый критический уровень. Такие мутации не наследуются в соответствии с законом Менделя. Динамические мутации могут вызываться экспансиями повторов нескольких типов. При этом можно выделить несколько типичных для всех динамических мутаций характеристик:

- повторы с экспансией обладают мейотической и митотической нестабильностью;

- в ряду поколений обычно наблюдается увеличение числа копий повтора (антиципация);
- вероятность изменения копийности повторов отличается при наследовании по отцовской и материнской линии.

Фенотипическое проявление экспансии может быть связано с различными молекулярными механизмами – такими как потеря функции или гаплонедостаточность гена с экспансией.

В основе динамических мутаций лежит феномен нестабильности простых повторяющихся последовательностей разных типов в геноме человека. При этом вероятность экспансии того или иного повтора является функцией от его структуры (цис-активирующие факторы) и от внешних по отношению к повтору факторов (транс-активирующие факторы). К числу цис-активирующих факторов в первую очередь относятся структура мономера повтора, длина блока повторов и его гомогенность (наличие прерывания блока повторов повторами другого типа или неповторяющимися фрагментами ДНК) (Gunter et al., 1998). Структура мономера определяет вероятность образования повторами неканонических (не-В) форм ДНК – таких как шпильки, триплексы, тетраплексы, липкие и расплетенные структуры. Так, для наиболее часто подверженных экспансии повторов типа CNG*GNC характерно образование шпильчатых структур. Расчеты и прямое определение структуры разного типа повторов показывают, что в зависимости от структуры повтора стабильность шпилек изменяется в следующем ряду: CGG>CAG>CTG>CCG (Paiva, Sheardy, 2004). Возможно, именно в связи с этим в патогенезе динамических мутаций заметную роль играют повторы CTG и CAG и менее значимы повторы CGG.

Кроме этого, в экспансии могут играть роль образование ДНК-триплексов (в том числе H-формы ДНК) (Potaman et al., 2004) (экспансия повтора GAA при АФ) и квадруплексов (экспансия повтора CGG при синдроме ломкой X-хромосомы) (Fry and Loeb, 1994). Возможно также, что при АФ экспансия может быть связана с образованием так называемых липких (sticky) структур, в которых образуется тесный комплекс из двух противоположно

ориентированных ДНК-дуплексов (Sakamoto et al., 1999; Sakamoto et al., 2001; Vetcher and Wells, 2004).

Под генетической антиципацией (или упреждением) понимается более раннее проявление и возрастание тяжести симптомов наследственного заболевания в последующих поколениях родословной. Антиципация реально проявляется при определенных видах моногенной неврологической патологии, а также при некоторых мультифакториальных заболеваниях (Горбунова, 2002).

Увеличение числа тринуклеотидных повторов и связанное с этим явление антиципации обнаружены при целом ряде заболеваний (табл. 1). Например, при аутосомно-доминантном заболевании—хорее Геттингтона (ХГ) выявляется четкая корреляция между числом ЦАГ-повторов и возрастом дебюта заболевания. У потомков пораженных отцов обнаруживается более тяжелое клиническое течение заболевания. Экспансия числа ТНП происходит в мужском гаметогенезе (Rubinsztein et al., 1994).

Патологические тринуклеотидные повторы встречаются в кодирующей (например, при ХГ) или не – кодирующей (например, при АФ) части гена. В результате экспансия приводит к утрате функции белка (например, фратаксина при АФ) или обретению белком новой функции (например, гентинггином при ХГ). В последнем случае, новая функция белка играет ключевую роль в развитии нейродегенеративного заболевания. Практически для всех «динамических» мутаций характерно поражение головного мозга и особенно подкорковых структур, причем тяжесть заболевания и его начало четко коррелируют с числом повторов. Однако, механизм, посредством которого данный мутантный белок вызывает селективную гибель определенных клеток ЦНС, остается неясным, поскольку многие продукты мутантных генов широко экспрессируются во всех тканях организма. При наличии большой и нестабильной последовательности ДНК триплетный повтор увеличивается при митозе и мейозе (динамические мутации). Это означает, что наибольшая вероятность возникновения таких мутаций отличается при сперматогенезе и оплодотворении/эмбриогенезе, что предполагает два важных последствия. Во-

первых, более длинные повторы возникают у потомков мужского пола, а значит, они и передаются дальнейшим поколениям. В последующих поколениях болезнь возникает в более ранние сроки, и будет протекать тяжелее; этот феномен называется генетической антиципацией (ассоциация более длинных повторов с более тяжелым течением болезни и более ранними сроками ее возникновения). (Горбунова, 2002).

В последние годы предложен ряд моделей, характеризующих молекулярные механизмы феномена экспансии: репликативная, комбинативная и рекомбинационная модели.

Репликативная модель основана на модели репликации ДНК с участием фрагментов Оказаки, которая свидетельствует, что динамическая мутация может быть результатом нарушения функционирования ДНК-полимеразы во время репликации, предшествующей митозу и мейозу. Фрагменты Оказаки имеют среднюю длину 150-200 н.п. Они участвуют в синтезе отстающей (запаздывающей) цепи ДНК, тогда как на основной (лидирующей) цепи синтез идет непрерывно. В данном случае при наличии на 3'-конце протяженной монотонной последовательности будет наблюдаться скольжение вновь синтезированной нити относительно матричной нити ДНК. При этом возможны 2 варианта: либо часть фрагмента Оказаки (например, только 3'-конец), либо весь фрагмент целиком находятся в пределах повтора. Первый вариант: 5'-конец фрагмента Оказаки фиксирован уникальной последовательностью ДНК или AGG-вставками, другой 3'-конец фрагмента Оказаки свободно скользит вдоль комплементарной цепи, образуя вторичные структуры. Вторым вариантом: совершенный или «чистый» повтор длиной 70 триплетов не фиксирован по своим краям уникальными последовательностями и также свободно скользит вдоль комплементарной цепи, образуя шпильки (рис.1). Высказано предположение, что при обоих вариантах уменьшенный уровень репликативного скольжения лежит в основе мутационного процесса при экспансии числа копий повторов.

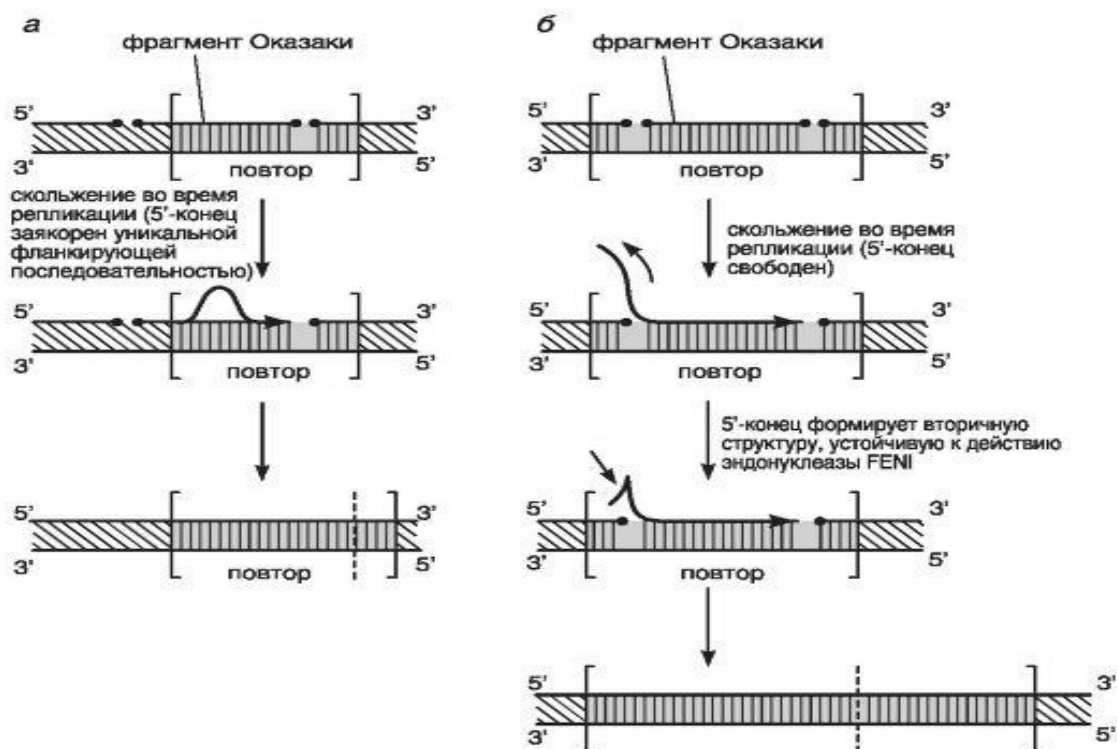


Рис.1 . Модель экспансии повторов на запаздывающей цепи ДНК (по Eichler E.E. et al., 1994)

Таким образом, репликативная модель экспансии у человека предполагает, что динамическая мутация может быть результатом нарушения функционирования ДНК-полимеразы во время репликации, предшествующей митозу и мейозу.

Комбинативная модель основана на изменении длин тандемных повторов может быть результатом неравного кроссинговера. Однако такая экспансия, во-первых, не сопровождается обменом фланкирующих последовательностей ДНК и, во-вторых, нельзя исключить неравный кроссинговер между сестринскими хроматидами, при котором в одинаковой степени может произойти как экспансия, так и сокращение длин повторов, что экспериментально не модель экспансии в результате рекомбинации или геной конверсии. Геной конверсия - это нераспространенный обмен между сестринскими хроматидами одной хромосомы или отклонение фактического обмена от ожидаемого теоретического обмена. Она может быть вызвана двухнитевыми разрывами вблизи нуклеотидных повторов ДНК. Не исключено, что геной

конверсия может индуцироваться аномальной репликацией повторов и сопровождаться кроссинговером. В результате геной конверсии образуются как удлиненные, так и укороченные повторы. Однако в отличие от неравного кроссинговера при геной конверсии это равновесие сдвигается в сторону преобладания нуклеотидных последовательностей с экспансией повторов (рис.2).

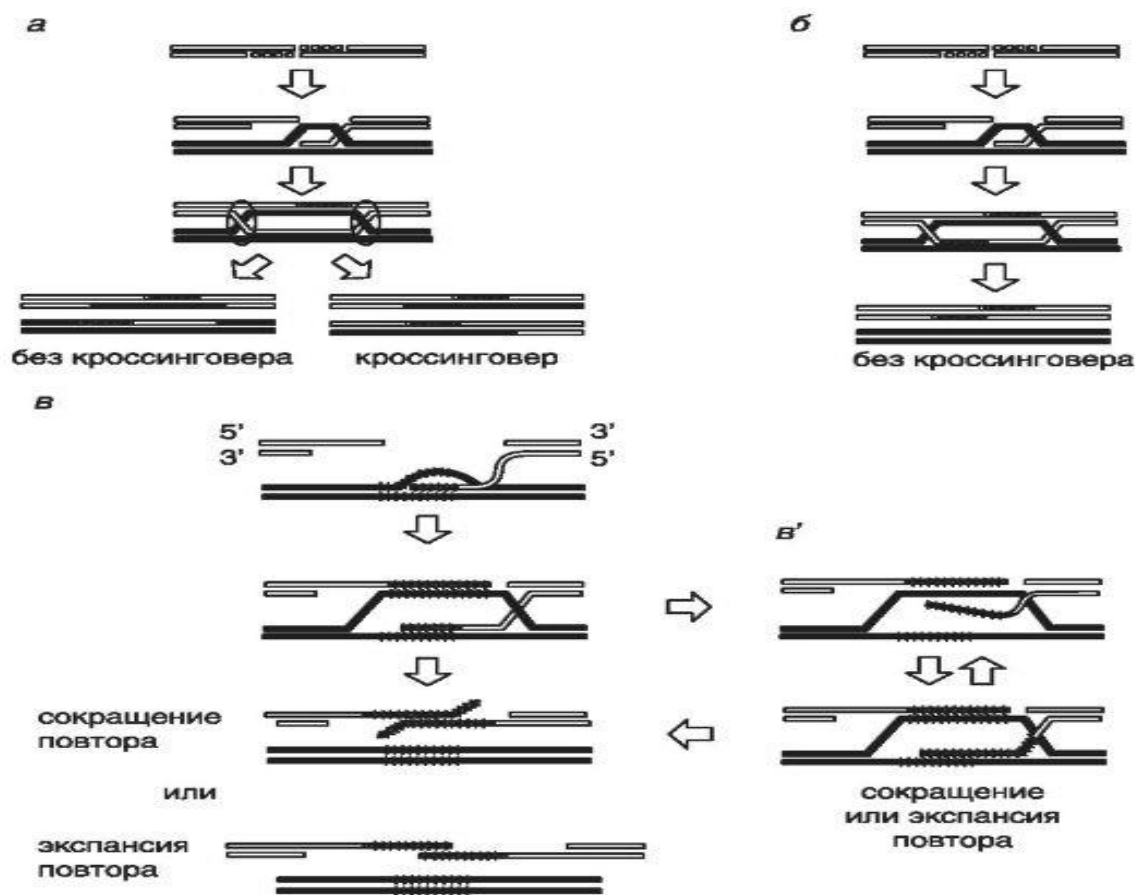


Рис.2 Модели геной конверсии, инициированной двухнитевыми разрывами ДНК (по Cummings C.J. and Zoghbi H.Y., 2000).

Примечание: Стрелки указывают направление синтеза ДНК в рамках репарации двухнитевых разрывов. Поврежденная молекула ДНК выделена белым цветом. Матричная цепь ДНК выделена черным цветом. Дочерняя вновь синтезированная цепь ДНК имеет серый цвет. Области тандемных повторов обозначены вертикальными линиями. Модель а) демонстрирует разрешение двух четырехнитевых структур (структуры Холидея) - они обведены кругами. Модель а) ведет к геной конверсии, ассоциированной с кроссинговером в 50% случаев. Модель б) - синтезависимый отжиг цепей ДНК. Модель в) - перестройки тандемных повторов по модели б). Модель в') - отделение вновь синтезированной цепи и ее повторный ошибочный отжиг на матрице.

На сегодняшний день существует три основные модели молекулярного механизма формирования МД1 (1-формирование ядерных очагов, которые составляют мутантные мРНК и РНК-связывающих белков, которые регулируют сплайсинг (рис.3) и являются транскрипционными факторами, 2-нарушение альтернативного сплайсинга, 3-нарушение клеточной дифференцировки), но всё больше доказательств того, что РНК gain-of-function механизм играет важнейшую роль в этом процессе (de León M.V. et al., 2008).

Предполагается, что характерной чертой экспансии ТНП при МД является aberrantное регулирование альтернативного сплайсинга (Koebis et al., 2011) и изучение характера полиморфизма локусов, содержащих повторяющиеся последовательности в соответствующих генах, в популяциях среди здоровых индивидов направлен на познание механизмов возникновения и распространения болезней экспансии в популяциях человека.

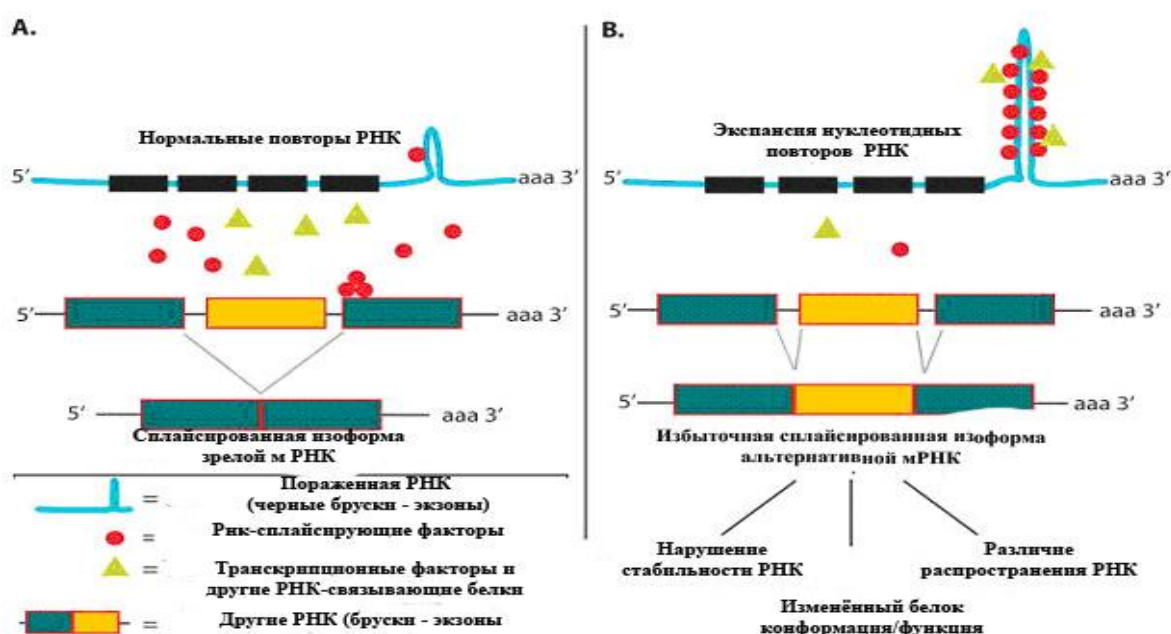


Рис.3. Схематическое изображение сплайсинга в норме (А) и при экспансии тринуклеотидных повторов (В) (по Roberts, 1997)

Таблица 1

Наиболее распространённые болезни экспансии тринуклеотидных повторов

Заболевание	Тип наследования*	Локализация гена	Тип повтора	Локализация области повтора в гене	Число триплетов		Экспрессия гена	Белок	
					нормальные аллели	мутантные аллели			
Синдром фрагильной X-хромосомы	FRAXA	XP	Xq27.3	CGG	5'-нетранслируемая область	<50	200-2000	нарушена	FMRP
	FRAXE	XP	Xq28	CGG	5'-нетранслируемая область	<50	200-2000	нарушена	FMR2
Миотоническая дистрофия	АД	19q1 3.2-13.3	CTG	3'-нетранслируемая область	<30	50-4000	нарушена	миотонинкиназа	
Спинальная и бульбарная амиотрофия Кеннеди	XP	Xq1 1.2-12	CAG	экзон	<34	40-72	не нарушена	андрогенный рецептор	
Хорея Гентонгтона	АД	4p16.3	CAG	экзон	<35	36-121	не нарушена	гентингтин	
Спиноцеребеллярная атаксия 1 (СЦА1)	АД	6p22-23	CAG	экзон	<37	39-81	не нарушена	атаксин-1	
Спиноцеребеллярная атаксия 2 (СЦА2)	АД	12q24.1	CAG	экзон	<29	35-59	не нарушена	атаксин-2	
Спиноцеребеллярная атаксия 3 (СЦА3)	АД	14q32.1	CAG	экзон	<43	61-84	не нарушена	атаксин-3	
Спиноцеребеллярная атаксия 6 (СЦА6)	АД	19p13	CAG	экзон	<16	21-27	не нарушена	A-потенциал-зависимый кальциевый канал	
Спиноцеребеллярная атаксия 7 (СЦА7)	АД	3p12-21.1	CAG	экзон	<17	38-130	не нарушена	атаксин-7	
Дентаторубропаллидолюисова атрофия (ДРПЛА)	АД	12p12-ter	CAG	экзон	<26	49-88	не нарушена	атрофин	
Болезнь Фридрейха	АР	9q13-21	GAA	интрон	<22	120-1700	нарушена	фратаксин	

Примечание: *АД - аутосомно-доминантный; АР - аутосомно-рецессивный; XP - X-сцепленный-рецессивный

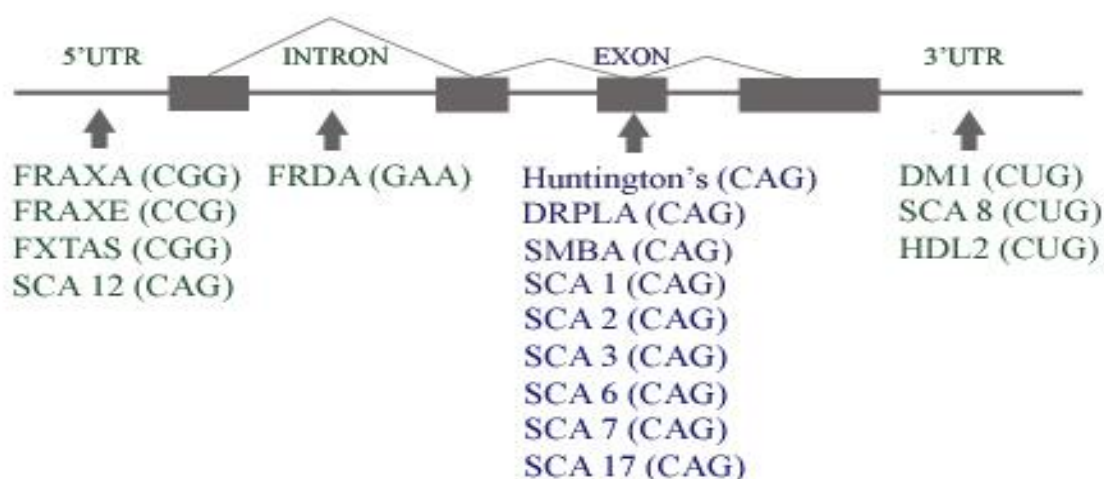


Рис.4. Схематическое расположение в структуре гена динамических мутаций, связанных с болезнями экспансии тринуклеотидных повторов (синим цветом обозначены – мутации в некодирующей части гена, зеленым цветом – мутации в кодирующей части гена) (по Croft, 2009)

В настоящее время динамические мутации рассматривают как новый фундаментальный механизм изменчивости, а также есть все основания считать увеличение числа ТНП одним из универсальных молекулярных механизмов, лежащих в основе нейродегенеративного процесса многих наследственных моногенных заболеваниях человека. Наиболее распространенные болезни экспансии тринуклеотидных повторов приведены в табл.1. Расположение в гене динамических мутаций, связанных с болезнями экспансии тринуклеотидных повторов схематично изображено на рисунке 4.

Таким образом, в настоящее время описан новый класс наследственных болезней (около 30 заболеваний), при которых проявляется феномен антиципации, материнский или отцовский эффект, варьирующая пенетрантность. Установлена связь указанных особенностей наследования и фенотипического проявления этих заболеваний с возникновением динамических мутаций, приводящих к экспансии ТНП. В основе многих наследственных заболеваний лежит экспансия тринуклеотидных повторов, т. е. значительное увеличение количества повторов трех нуклеотидов в геноме. У здорового человека триплетные повторы также встречаются, однако если их

количество превышает определенный уровень, развивается заболевание. Следует отметить также, что важную роль в экспансии играют последовательности, фланкирующие блок повторов. Именно это лежит в основе характерного для динамических мутаций выраженного эффекта основателя.

1.2. Мышечные дистрофии

Дистрофия (др.греч. dystrophy, от dys... - приставка, означающая затруднение, нарушение, и trope – питание) – патологический процесс, в результате которого та или иная ткань теряет или накапливает вещества, в норме не характерные для неё. Дистрофия характеризуется повреждением клеток и межклеточного вещества, в результате чего изменяется функция органа. В основе дистрофии лежит нарушение трофики, т.е. комплекса механизмов, обеспечивающих метаболизм сохранность структуры клеток и тканей. Дистрофические миотонии (ДМ) представляют собой гетерогенную группу нервно-мышечных заболеваний, при которых возникают тонические спазмы мышц в начале активных движений из-за задержки их расслаблений. Такие спазмы в фазе расслабления мышц получили название миотонических. ДМ показывает значительные различия в клинических проявлениях и тяжести заболевания. Их можно разделить:

- миопатии, которые являются основными заболеваниями мышечных волокон;
- миоастении, вызванные дефектами нервно-мышечных соединений;
- нейрогенные расстройства, вызванные болезнью или травмой.

Этиология расстройств различна, но общей чертой, в частности, является избирательное участие различных скелетных мышц в определенной мышечной дистрофии. Харпер в 1989 году представил монографию о миотонической дистрофии, которая регулярно обновляется. (Harper, 1989).

Единой клинической классификации МД не существует, но выделяют моносимптомную/олигосимптомную форму МД и, как проявление

генерализованной формы в зависимости от возраста манифестации - врожденную (конгенитальную), раннюю детскую, классическую юношескую и взрослую (Harper et al., 2004). Согласно Magee и др. (Magee et al., 2002) у больных определены формы МД: классическая взрослая (КВ) с началом заболевания с 16 лет и старше, классическая юношеская (КЮ) с началом в возрасте от 10 до 16 лет, ранняя детская (РД) – до 10 лет и врожденная форма (ВФ).

До 1994 года МД считалось однородным заболеванием, однако исследованиями последних лет выделено 3 типа: миотоническая дистрофия 1 типа (ген *DMPK* локализован на хромосоме 19q13.3), миотоническая дистрофия 2 типа (ген *ZNF9* локализован на хромосоме 3q21), миотоническая дистрофия 3 типа (ген локализован на хромосоме 15q21-q24). Частота встречаемости МД 1 типа варьирует от 0,46 до 189 на 100 тысяч населения, МД 2 и 3 типа изучены значительно хуже (Finsterer, 2002; Martinez, 2004; Шнайдер, 2007). Более подробное описание каждого типа заболевания приведены ниже.

1.2.1. Миотоническая дистрофия 1 типа

Миотоническая дистрофия Россолимо-Куршмана-Штейнерта-Баттена (МД 1, OMIM 160900) – наследственное нервно-мышечное заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования. Заболевание было названо в честь Григория Ивановича Россолимо (1860 - 1925) - русского невролога; Фредерика Юстаса Баттена (1865 - 1918) – английского невролога и педиатра; Ганса Густава Вильгельма Штейнерта (1875-1911) – немецкого терапевта и Ганса Куршмана(1875-1950) - немецкого терапевта. Болезнь впервые описана в России Г.И. Россолимо в 1901 году; позднее, в 1909 году, независимо друг от друга Н. Steinert и F. Batten дали подробное описание клинической картины заболевания (Горбунова и др. 2000; Liquori, 2001). Катаракта, характерная для МД, впервые описана в 1918 году Fleischer (Finsterer, 2002).

В клинической картине МД 1 наблюдаются миотония, атрофии мышц (особенно лица, шеи, дистальных отделов конечностей), парезы скелетной мускулатуры, катаракта, кардиомиопатия, эндокринные нарушения. Часто больные имеют пониженный энергетический уровень, сопровождающийся депрессией (Lee and Cooper, 2009; O' Cochlan et al., 2004, Harper, 2001). При развитии МД 1 типа гораздо более вовлечены дистальные мышцы, нежели проксимальные (Kaliman and Llagostera, 2008).

МД 1-го типа характеризуется широкой вариабельностью начала манифестации - от рождения до 60 лет и старше (Emery, 1998), но наиболее часто встречается в 20-30 лет (Зинченко и др., 1979; Harper et al., 2004). Особенностью данного заболевания является мультисистемность в поражении и клинический полиморфизм (Бирюков, 1975; Гринио, Агафонов, 1997; Лобзин и др., 1998; Большакова и др., 2000; Вельтищев с соавт., 1998; Иллариошкин с соавт., 2002). Для миотонической дистрофии характерно прогрессирующее течение. По данным Mathieu и др. (1999) средняя продолжительность жизни при МД1 типа составляет 53 года, смертность выше чем среди здорового населения (Mathieu et al., 1999).

В семьях с данной патологией в нескольких поколениях отмечается антиципация, т.е. более тяжёлая манифестация болезни и в более молодом возрасте в каждом последующем поколении. Крайние ее проявления представлены тяжелыми врожденными формами болезни с генерализованной гипотонией новорожденных, дыхательными нарушениями, затруднением сосания и глотания, высокой смертностью (Brook et al., 1992). Данный признак описан для миотонической дистрофии давно и рассматривался в 40-х годах как статистический артефакт. Однако сведения о молекулярном дефекте свидетельствуют, о возможности увеличения числа повторов в поколениях. Описаны семьи более чем с тремя поколениями с миотонической дистрофией: в 1-м поколении — только катаракты, во 2-м поколении — умеренная слабость мышц, в 3-м поколении — врождённая форма (Arsenault et al., 2006). В ходе исследования 102 пациентов с МД 1 было

показано, что у больных с числом CTG- повторов от 50 до 99 проявляется только катаракта, остальные клинические признаки наблюдаются в группе больных, имеющих от 100 до 200 повторов. Пациенты с первичной катарактой являлись бессимптомными носителями мутации (Medica et al., 2007).

О зависимости передачи удлинённых CTG – повторов от пола родителей в семьях с МД 1 типа имеются противоречивые друг другу работы. По данным Harper и др. (1989), Morgenlander и др. (1991) врождённая форма (ВФ) миотонической дистрофии наблюдается только при рождении детей больными матерями. Новорожденные умирают в первые несколько дней жизни в 15% (Rudnik – Schöneborn et al., 2004), 16% (Harper et al. 2004), тогда как в нормальной популяции - 1,9%. Выявлено, что новорожденные с МД 1 типа, находившиеся длительно на искусственной вентиляции, в последующем значительно отстают в развитии, в 25% случаях умирают на первом году жизни (Campbell et al., 2004). Но в тоже время, описаны случаи, сокращение размера CTG-повторов при передаче заболевания от отцов с симптомами МД (Lopez de Munain, 1996), т.е., отцовские длинные CTG-повторы имели тенденцию к сокращению при передаче из поколения в поколение (Brunner et al., 1993; Ashizawa et al., 1994) или не изменяются (Ashizawa et al., 1992). У пациентов, рождённых больными матерями, имеется более тяжёлая форма болезни с более ранним началом, чем у пациентов, рождённых от больных отцов (Ashizawa et al., 1994b).

Нейрокогнитивная дисфункция является отличительной чертой ВФ МД после 1 года. Это функция носит комплексный характер нервно – психических проблем, таких как дефицит внимания с гиперактивным расстройством или расстройство типа аутизма (Angeard, 2011).

При МД 1 типа серьёзность сердечной миопатии, проявляющаяся нарушением проводимости и аритмией, прямо коррелирует с возрастом (Sabovic et al., 2003) и числом CTG-повторов (Melacini et al., 1995; Antonini et al., 2000; Clarke et al., 2001; Groh, 2002; Bhakta et al., 2004) и зависит от пола – чаще встречается у мужчин (Groh, 2002; Sabovic et al., 2003). Нарушения

сердечного ритма являются одной из значимых первичных причин смерти у больных с МД 1 типа (29 %) (Шнайдер, 2007). Сахарный диабет также является одним из осложнений при данном заболевании. Он развивается в результате секреторных дисфункций из-за нарушения метаболизма рецептора инсулина при расширении ТНП в гене миотонинпротеинкиназы (Barbosa et al., 1974; Perseghin et al., 2003). Наряду с этим при МД 1 типа гиперинсулинемия связана с реактивной гипогликемией (Sohmiya, 2000). Атрофия, слабость, миотонические спазмы дыхательных мышц приводят к изменению дыхания. Дыхательная недостаточность является наиболее частой причиной смерти при МД 1 типа (до 40%) (Pelargonio et al., 2002). Частота респираторных расстройств у больных нарастает с увеличением размера экспансии СТG-повторов. Пневмония также наиболее частая причина (31 %) летального исхода у больных с миотонической дистрофией поздним дебютом заболевания (Шнайдер, 2007). Чрезмерная дневная сонливость наблюдается у 33,1% пациентов с данным заболеванием, и, как правило, пропорциональна количеству мышечных нарушений (La Berge, 2004).

Диапазон распространенности МД 1-го типа в разных популяциях в зависимости от региона и этнической группы различен, в среднем по миру 4,0 –5,0 на 100 тыс. (Harper et al., 2004; Harley et al., 1991; Brunner, 1993). Большинство описанных случаев заболевания семейные, связанные с эффектом основателя (Emery, 1998; Goldman et al., 1996; Pan et al., 2001; Yotova et al., 2005). Самый высокий уровень распространенности МД 1-го типа в мире выявлен в генетически гомогенной франко-канадской популяции в регионе Сагены-Сент-Джон (северо-восточная часть провинции Квебек, Канада) с численностью почти 285 тысяч человек. (Mathieu et al., 1990). В данном регионе распространенность заболевания в 30-60 раз выше, чем в большинстве популяций и предположительно произошла от одной супружеской пары французского происхождения, которые поженились в 1661 году и родили 14 детей (8 мальчиков и 6 девочек). Выделяют два фактора накопления данной патологии в Квебеке, это высокий уровень рождаемости и низкий уровень

миграции (Ruymirat, 2011). По последним эпидемиологическим данным частота МД в Квебеке уменьшилась и достигает 158,0 на 100 тыс. населения. Исследователи связывают это с генетическим консультированием, проведением ПД, старению населения, постепенным снижением уровня рождаемости (Mathieu, 2012).

Второй по частоте распространения является Израиль, где внутри сообществ евреев выявлена разная частота данной патологии от 5,7 до 47,3 (Segel et al., 2003). В табл.2 приведены некоторые частоты распространенности МД 1-го типа в разных популяциях мира.

Таблица 2

Распространенность МД в мировых популяциях (на 100 тыс. населения)

Популяция	Частота мутации	Литература
Квебек (Канада)	189,0	Mathieu et al., 1990
Квебек (Канада)	158,0	Mathieu, Prevost, 2012
Ирландия Северная	12,53	Magee et al., 1999
Германия	5,5	Grimm, 1975
Англия	2,8	Brewis et al., 1966
Италия	9,31	Siciliano et al., 2001
Тайвань	0,46	Hsiao et al., 2003
Югославия	18,1	Medica et al., 1997
Япония	5,5	Davis et al., 1992
Северная Испания (Гуипузкоа)	2,6	Lopez et al., 1993
Швейцария	11,44	Magee et al., 1996
Израиль	47,3	Segel et al., 2003
Северная Англия	10,4	Norwood et al., 2013
Якутия	21,3	Сухомясова, 2005

На территории России МД 1-го типа рассматривалась в спектре наследственной патологии или в структуре НБНС (Нестеров и др., 1983; Перепелов, 1997, Хидиятова, 2008). В ходе исследований было показано, что МД 1-го типа является достаточно частым заболеванием и может варьировать по частоте распространения внутри этнических групп (Маркова, Магжанов, 1990; Васильева, 1996). Например, на территории Республики Башкортостан

МД 1-го типа распространена неравномерно. Заболевание зарегистрировано в 29 административных районах РБ из 54 и в 14 городах из 21. Распространенность МД в отдельных районах колеблется от 2,26 до 30,46 на 100 тыс. населения. Среди городского населения наиболее высокая частота встречаемости (1:1726) отмечена в городе Баймак с малым числом жителей (1 7 257 человек). Высокая частота заболевания в Баймаке и Баймакском районе обусловлена эффектом основателя и другими факторами популяционной динамики. Распространенность заболевания среди сельского населения (6,99 на 100 тыс. населения) более чем в полтора раза превышает показатель среди городского населения (4,02 на 100 тысяч населения), что связано, вероятнее всего, с более высокой рождаемостью в сельских семьях (Мухаметова, 2011).

Таблица 3

Частота МД в Российской Федерации (на 100 тыс. населения)

Регион РФ	Частота заболевания	Литература
Астраханская обл.	1,8	Насыров, 1995
Башкортостан	5,2	Мухаметова, 2011
Владимирская обл.	0,49	Барышникова и др., 2002
Вологодская обл.	0,73	Гинтер, 1991
Воронежская обл.	0,35	Юров и др., 1976
Ивановская обл.	0,2	Козлова и др., 1971
Иркутская обл.	0,5	Кожова и др., 1971
Кировская обл.	0,76	Зинченко и др., 2007
Костромская обл.	0,45	Зинченко и др., 2007
Краснодарский край	0,23	Зинченко и др., 2007
Куйбышевская обл.	3,2	Вяткина, 1991
Марий Эл	0,58	Зинченко и др., 2007
Пермская обл.	0,27	Дедик и др., 1979
Ростовская обл.	2,49	Зинченко и др., 2007
Самарская обл.	2,66	Скупченко, Новикова, 2001
Саратовская обл.	0,3	Дубинская, 1993
Ярославская обл.	2,5	Ключиков, 1983
Республика Саха (Якутия)	21,3	Сухомясова, 2005

В целом, распространенность заболевания в регионах России колеблется от 0,2 до 5,2 на 100 тыс. населения (табл. 3).

Что касается распространённости миотонической дистрофии в РС (Я), то первое сообщение о накоплении заболевания в Якутии (0,01 на 1000 населения) сделано в 2000 году (Коротов, Кузьмина, 2000). По данным Сухомясовой, частота распространения МД 1-го типа в среднем составляет 1:4699 населения (10,3 на 100 тыс.) и имеет широкий диапазон различия по улусам от 1:818 до 1:45455 населения. Основные очаги накопления больных с МД 1 - вилюйская группа улусов, расположенных в бассейне р. Вилюй, и центральные улусы (Лена-Алданского междуречья) (Сухомясова, 2005). Одной из причин накопления этой патологии может быть длительная географическая изоляция якутской популяции. Возможно, что происхождение миотонической дистрофии у якутов, связано с европеоидным компонентом генофонда, т.к. заболевание встречается преимущественно в европеоидных популяциях (Фёдорова, 2005).

Ген миотонинпротеинкиназы (*DMPK*), ответственный за развитие МД 1, расположен на коротком плече 19 хромосомы в области 13.2 - 13.3, имеет размер 12,7 Кб и содержит 15 экзонов (рис. 5) (Buxton, Shelbourne, 1992; Harley et al., 1992).

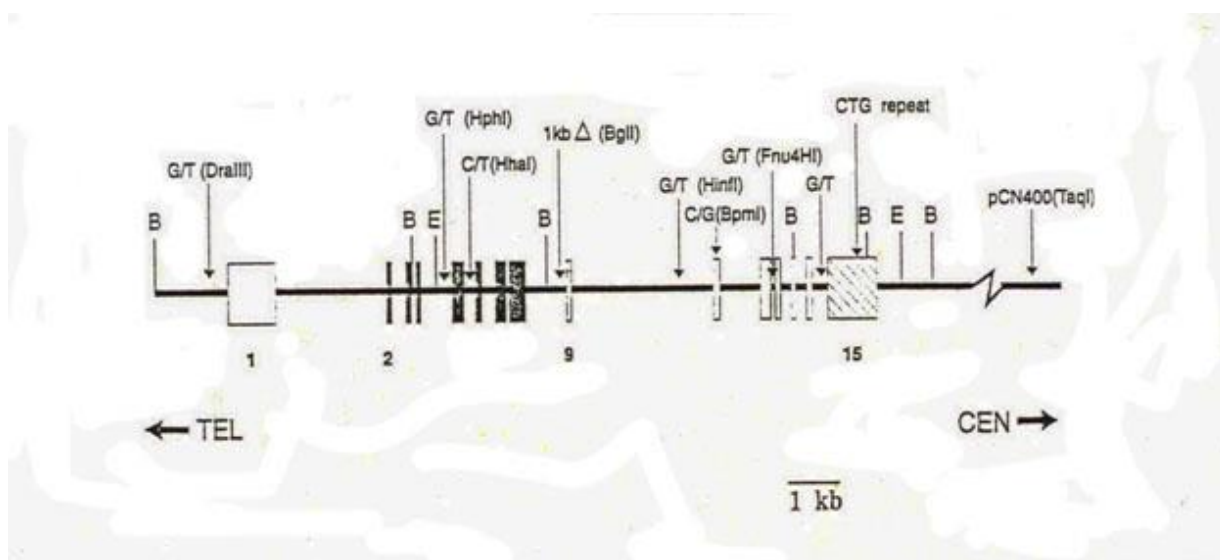


Рис. 5. Схема гена миотонинпротеинкиназы (*DMPK*) (по Nevilli et al. 1994)

Экспрессируемый геном белок миотонинпротеинкиназа относится к семейству серин/треонин протеинкиназ, состоит из 629 аминокислот (Brook,

1992; Shaw, 1993). Этот белок играет важную роль в регуляции клеточной дифференцировки и репликации ДНК. Существует три изоформы миотонинпротеинкиназы в скелетных мышцах, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Количество тринуклеотидных повторов у здоровых людей находится в пределах 5-38 копий. При заболевании их число увеличивается от 50 до 4000 и более (Lee and Cooper, 2009). Считается, что миотоническая дистрофия не исчезает из популяции за счет резервуара экспансии в виде премутации (число повторов от 38 до 50) ввиду поздней манифестации заболевания, а также крайне низкой частоты новых мутаций. Молекулярной основой антиципации является значительное увеличение числа CTG триплетов в гене МД при прохождении через гаметогенез нестабильных аллелей (Buxton et al., 1992; Harley et al., 1992). Антиципация проявляется сильнее, когда ген унаследован от матери (Ashizawa et al., 1994b; Harley et al., 1993; Lavedan et al., 1993; Magee et al., 2002). В небольшом проценте случаев может происходить уменьшение размера мутации при передаче потомству, при этом может наблюдаться клиническая антиципация у детей (Ashizawa et al., 1994; Harley et al., 1993).

На сегодняшний день не существует способов предотвратить или замедлить прогрессирование миотонической дистрофии. При данном заболевании 60% больных практически не могут выполнять некоторые виды деятельности (например: управлять транспортом), уровень образования и соответственно, их доход ниже чем, в общей популяции (Gagnon et al., 2007). Терапия главным образом направлена на борьбу с осложнениями, такими, как деформация позвоночника, развивающаяся вследствие слабости мышц спины, или предрасположенность к пневмониям, обусловленная слабостью дыхательных мышц. Ряд препаратов применяются в лечении миотонии, но требуется осторожность у больных с заболеванием сердца (опасность ухудшения сердечной проводимости). Применение ортопедических аппаратов может укрепить «висячие» стопы, стабилизировать голеностопные суставы, уменьшить частоту падений. При наличии атрофий применяют анаболические

стероиды и общеукрепляющую терапию.

1. 2. 2. Миотоническая дистрофия 2 типа

Миотоническая дистрофия 2 типа (OMIM 116955) или проксимальная миотоническая миопатия — proximal myotonic myopathy, PROMM (болезнь Thornton — Griggs — Moxley) - клинически, но не генетически гетерогенное, мультисистемное заболевание, которое по симптоматике несколько отличается от МД 1. Впервые была описана на большой семье из Миннесоты (Rowland, Thornton, 1994; Ranum, 1998). Мутация идентифицирована в 2001 году. Ген цинковых пальцев протеин 9 (*ZNF9*), ответственный за развитие МД 2, имеет размер 16,2 Кб и расположен на длинном плече 3-й хромосомы (3q21.3) (Ranum et al., 1998; Ricker et al., 1999; Liquori et al., 2001). (рис. 6). При МД 2 найдена мутация в 1 интроне этого гена – нестабильная экспансия CCTG – повтора в количестве от 75 до 11 000, в среднем 5000 повторов (11 КБ до 40 КБ) (Margolis et al., 2006).

В результате экспансии тетрануклеотидного повтора CCTG могут страдать и соседние гены. Схожие механизмы повреждения РНК могут быть общей причиной заболевания и обуславливать схожесть мультисистемной клинической симптоматики DM1 и DM2 (Шнайдер, 2007).

ZNF9 – белок, размером 19 kD, включает семь цинксодержащих доменов, экспрессируется преимущественно в скелетной мускулатуре и миокарде (Armas 2008). До настоящего времени функция белка в этиологии МД 2 типа не понятна. Клиническое течение болезни протекает более мягко, чем при МД 1 типа (Udd et al., 2006)

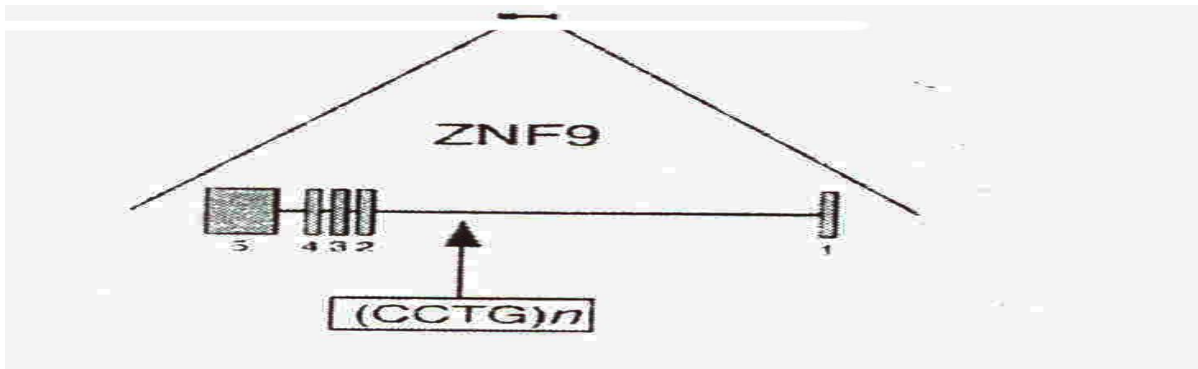


Рис. 6. Схема гена цинковых пальцев протеин 9 (*ZNF9*) (по Margolis et al. 2006)

При МД 2-го типа преобладает проксимальная мышечная слабость, заднекапсулярная катаракта, а также характерен гипергидроз; инсулинонезависимый сахарный диабет встречается в два раза чаще, чем при МД 1-го типа. Ряд авторов указывают, что ни в одном случае МД 2 типа не было выявлено признаков поражения сердечной мышцы, даже при большом количестве тетрануклеотидных повторов. Однако риск развития кардиомиопатии сохраняется (до 7 % случаев МД 2) (Held et al., 1998; Von zur Muhlen et al., 1998). Наблюдается доминантный тип наследования с наличием заболевания по крайней мере в двух поколениях, наличием случаев передачи заболевания «от мужчины мужчине». Возможными клиническими критериями являются: мышечная боль, тремор, флюктуирующая мышечная слабость и обездвиженность, гипертрофия икроножных мышц, первичный мужской гипогонадизм, гипотиреозидизм, нарушение сердечной проводимости, интермиттирующие эпизоды боли в грудной клетке (Шнайдер, 2007). В изученной литературе врожденных форм МД 2 типа не описано (Botta et al., 2006).

В настоящее время не описано ни одного случая данного заболевания в Японии (Kurihara, 2005). Большинство семей с МД 2 -го типа европейского происхождения, заболевание чаще встречается у немцев, поляков. Анализ гаплотипов проведенный показал, что мутация происходит из одного или нескольких основателей. Эти данные предполагают, что возраст мутации

составляет 200-540 поколений (4000 – 12000 лет) (Liquori et al., 2003; Bachinski et al., 2003; Schoser et al., 2004). Распространенность МД 2 типа варьирует в зависимости от численности населения разных континентов (Udd et al., 2006).

1.2.3. Миотоническая дистрофия 3 типа

В 2004 году была описана семья, в трех поколениях которой прослеживалось 10 больных дистрофической миотонией в сочетании с фронтотемпоральной деменцией (Isabelle Le Ver et al., 2004). На основе данных ДНК-типирования больных с дистрофической миотонией описана мутация гена на хромосоме 15q21-q24 и выделен 3-й тип дистрофической миотонии (МД 3) с аутосомно-доминантным типом наследования. Авторы генотипировали 13 полиморфных маркеров, среди которых наиболее значимым был D15S153. Однако, локус на 15-й хромосоме при МД 3 типа нуждается в уточнении, наиболее критическим признан регион между D15S970 и D15S114 у всех 10 наблюдаемых пациентов (Шнайдер, 2007). Распространенность МД 3 типа в настоящее время неизвестна. В доступной литературе встречаются описания одиночных больших семей с МД 3. Заболевание чаще встречается у женщин, чем у мужчин (мужчины : женщины = 1:9). Возраст дебюта варьирует от 32 до 69 лет. В своей работе ученые из Франции (Le Ver et al., 2004) показали, что отличительными клиническими особенностями новой болезни помимо проксимальной слабости, клинических миотоний, ранней двусторонней катаракты, является раннее начало слабоумия. Исходя из этого, возможно, предложено название заболевания - миотоническая дистрофия с лобно-височной деменцией или МД 3 типа. Болезнь развивается в два этапа: на первом этапе у больных медленно встречается прогрессирующая проксимальная мышечная слабость конечностей и мышцы туловища (аксиальная мускулатура), мышечные боли, миотонии, катаракты, мягкий подъем креатинкиназы. Позже болезнь характеризуется тяжелой слабостью и атрофией в проксимальных, дистальных мышцах шеи, а также тяжелые лобно-

височной деменции. Атрофия и выраженная слабость мышц плечевого пояса и экстензоров шеи приводит к развитию симптома «головой тряпичной куклы». Для МД 3 типа поражение сердечной мускулатуры и нарушения сердечного ритма не характерны (Шнайдер, 2007).

Основные сведения о трёх описанных типах миотонической дистрофии суммированы в табл. 4.

Таблица 4

Сравнительные характеристики трёх типов миотонической дистрофии

	МД 1	МД 2	МД 3
Хромосомный локус	19q13.3	3q21.3	15q21-q24
Ген	<i>DMPK</i>	<i>ZNF9</i>	Регион между D15S970 и D15S114
Наследование	Аутосомно-доминантное	Аутосомно-доминантное	Аутосомно-доминантное
Мутация	Экспансия CTG-повторов	Экспансия CCTG-повторов	-
Число повторов в норме	до 37 CTG	до 27 CCTG	-
Премутация	37-50 CTG	27-75 CCTG	-
Мутация	50 – 4000 CTG	75- 11000 CCTG	-

1.2.4. Популяционные исследования миотонической дистрофии

Изолированная популяция, если она не исчезает в ходе истории, образно говоря, разворачивается в «самое себя», поддерживая динамическое равновесие с окружающей средой. Наличие этой генетической «памяти» в системе – важное условие ее стабильности и одновременно свидетельство сохранения исторически сложившейся внутренней структуры (Алтухов, Рычков, 1970). Считают, что при проведении работ по картированию различных заболеваний человека, предпочтение следует отдавать изолированным популяциям (Seffield

et al., 1998; Wright et al., 1999). Поскольку в таких популяциях маловероятной является неаллельная гетерогенность заболеваний и снижается сложность полигенных нарушений за счет уменьшения числа локусов, вероятно вовлеченных в формирование патологического состояния (Seffield et al., 1998). С другой стороны, Laan, Raabo и др. предполагают, что для изучения моногенной патологии, вызванной «свежими» мутациями большой интерес представляют популяции, испытавшие сильное миграционное давление (Laan, Raabo, 1997). Генетические изоляты или популяции с эффектом основателя являются уникальной моделью для изучения моногенных и мультифакториальных заболеваний. Имея небольшое количество предков - основателей, такая популяция является гомогенной, что позволяет побороть проблемы с генетической гетерогенностью. Гены многих наследственных заболеваний были картированы и идентифицированы благодаря изучению их в генетически изолированных популяциях (финская, франко-канадская, евреи Ашкенази и т.д.). Низкие показатели генетического разнообразия линий якутов, указывающие на небольшую численность предковой популяции с последующей значительной экспансией позволяют предположить, что для всех наследственных болезней, имеющих редкую частоту возникновения, получивших распространение в популяции якутов, как правило, должен наблюдаться эффект родоначальника или наличие в генах одной мажорной мутации.

Каждый больной входит составным элементом в ту или иную популяцию с присущим ей генофондом, существующим в условиях определенной среды. Усилия, направленные на устранение внешних причин болезни, могут оказаться малоэффективными, если ничего неизвестно о специфике генетического процесса в популяции и состоянии среды. Дальнейшая разработка всех этих вопросов представляется крайне необходимой в рамках широкого междисциплинарного подхода, в котором ключевая роль должна принадлежать специалистам в области популяционной, демографической и клинической генетики (Алтухов, 1989).

Существуют популяционные различия в числе СТG-повторов в норме и патологии, в распространенности МД 1 типа в различных регионах, этнических группах, в характере самого заболевания, в связи, с чем представляют интерес популяционные исследования в гене *DMPK*. Анализ аллельного полиморфизма триплетных СТG-повторов у здоровых лиц из различных популяций России показал, что генетическое разнообразие в популяции якутов в 2-3 раза ниже, это говорит о большей генетической гомогенности данной популяции (Попова, 2002). Результаты исследований нормального полиморфизма гена миотонической дистрофии в популяциях РС (Я) косвенно свидетельствуют о том, что накопление данного заболевания обуславливается эффектом основателя (Федорова, 2005).

Популяционные исследования варибельности тракта миотонинпротеинкиназы в мире описаны довольно подробно. (Neville et al., 1994; Tishkoff et al., 1998; Priyadarshi, 2001; Pan et al., 2001, Amenabar et al., 2005; Acton et al., 2007; Freitas et al., 2007; Tweerasasawat et al., 2010; Magana et al., 2011). Так, в работе по изучению 25 популяций (5 африканцев, 2 представителей Среднего Востока, 3 европейцев, 6 представителей Восточной Азии, 3 выходцев Океании и Австралии) и 5 приматов было показано, что мутация, которая вызывает МД, возникает, прежде всего, в популяциях неафриканского происхождения. Подавляющее большинство изученных до сих пор мутантных МД - хромосом в различных популяциях имеют один гаплотип, что указывает на их общее происхождение (Tishkoff et al., 1998).

По литературным данным, наибольшая частота МД в мире описана, как уже отмечалось выше, в канадской провинции Квебек. Было выявлено 746 больных, из них 673 живых на момент обследования из 88 семей, происходящих от одной супружеской пары (Mathieu et al., 1990). Предполагается, что мутация была завезена в Квебек из Северной Европы более 300 лет назад. В своей работе Yotova и др. подтвердили ранее проведенное исследование и оценили возраст основателя в северо – восточной

части провинции Квебек в 19 поколений, на рубеже 17 века (Yotova et al., 2005).

Во всестороннем эпидемиологическом обзоре было показано, что среди евреев, живущих в Израиле, средняя распространенность МД составляет 15,7 на 10^5 (1 случай на 6,369) с вариациями внутри сообщества. Евреи ашкенази имели наименьшую частоту – 5,7 на 10^5 (1:17,544) в сравнении с процентом у восточных евреев – сефардов 20 на 10^5 (1:5,000) и у йеменских евреев 47,3 на 10^5 (1:2,114). В результате данного исследования был сделан вывод, что различие в распространенности МД среди сообществ есть следствие премутаций основателя в сообществах евреев не-ашкенази (Mathieu et al., 1990).

Единственный случай МД в нигерийской семье описан Krahe и соавторами (1995), в котором выявлен один гаплотип (Khare et al., 1995).

У представителей Тайваня распространенность МД намного ниже, чем у европейцев или японцев, и может быть приближена к показателям, встречающимся у представителей негроидной расы Южной Африки (Pan et al., 2001).

В эпидемиологических исследованиях проведенных Италии, минимальная частота распространения МД - 9,31 на 10^5 . Эти данные в два раза выше, чем в предыдущих исследованиях, проведенных до внедрения молекулярно-генетического тестирования, что подчеркивает важность и необходимость прямой генетической диагностики для правильной оценки риска передачи заболевания в семьях (Siciliano et al., 2001). На 96 хромосомах здорового населения было выявлено от 5 до 32 повторов, частота СТG-повторов с 12-аллелями встречалась в 25%, 13 аллель 14,6% и аллель 14 с 19,8% (Valaperta et al., 2013).

В исследованиях, проведенных в пяти провинциях Кувейта, выявлена низкая частота МД среди лиц коренного населения (Alfadhli et al., 2004).

В работе Amenabar и соавторов (2005) среди здорового населения Чили выявлено, что аллельные частоты СТG – повторов являются промежуточными между европейскими и аборигенами Пэунче.

Acton и другие предполагают, что частоты СТG – повторов у афроамериканцев являются промежуточными между африканскими неграми и белыми европейского происхождения (Acton et al., 2007).

В иранской популяции частоты аллелей аналогичны Западной Европе и Японии (Shojasaffar et al., 2008).

Kwon и коллеги в своём исследовании выявили эффект основателя при МД 1-го типа в корейской популяции (Kwon et al., 2010).

Исследовав 50 пациентов с диагнозом МД и 400 человек здоровых в Мексике Маганья и другие установили, что распространение СТG – повторов значительно отличаются от других популяций (Magaña et al., 2011).

Theerasasawat и соавтры провели исследование СТG – повторов между пациентами с МД и здоровыми индивидами Таиланда. В результате было показано, что частота распределения СТG – повторов среди тайского населения была сравнима с частотой МД среди тайваньского населения (Theerasasawat et al., 2011).

В Российской Федерации комплексное исследование МД (популяционное, клиническое и молекулярно-генетическое) было проведено в Республике Башкортостан (Магжанов, 1987; Фатхлисламова, 1997; Ахмадеева, 2001, Сломинский, 2006, Хидиятова, 2008) и в г. Санкт-Петербурге (Васильева, 1996; Малышева, 2000). Анализ проведенных исследований в Республике Башкортостан показал неравномерность распределения МД территориально и этнически с локальным накоплением пораженных семей (от 1,05 до 17,7 на 100 тыс. населения), что, возможно, объясняется своеобразием генетической структуры популяций (Магжанов, 1987; Ахмадеева, 2001). Средняя частота заболевания в данном регионе – 5,2 на 100 тыс. человек и МД встречается чаще среди башкир (Мухаметова, 2011).

Таким образом, можно констатировать, что в мире проводится много работ по изучению МД. Но исследований, выявляющих, межпопуляционные различия на огромной и многонациональной территории России, проводится

чрезвычайно мало. Также малочисленны публикации о межэтнических различиях данного заболевания.

1.2.5. Молекулярно-генетические исследования гена мышечной протеинкиназы (*DMPK*)

Генетический дефект (мутация) при миотонической дистрофии 1 типа был идентифицирован в 1992 году на коротком плече 19 хромосомы в области 13.2-13.3 (Brook et al., 1985; 1992; Vuxton et al., 1992; Harley et al., 1992; Mahadevan et al., 1992). Мутация заключается в экспансии тринуклеотидного повтора CTG (Cytosine-Thymine-Guanidine) в гене миотонинпротеинкиназы (*DMPK*). В норме, как уже отмечалось ранее, число CTG-повторов варьирует от 5 до 38, а при МД 1 увеличивается от 38 до 2000 и более. Наиболее тяжелое течение, ранний дебют и серьезный прогноз заболевания отмечаются у индивидуумов с числом тринуклеотидных повторов, равным 3000 и более (Mahadevan, 1992). Продуктом гена *DMPK*, несущим мутацию и имеющим длину является белок миотонинпротеинкиназа (синонимы: серинтреонинпротеинкиназа, DM-протеинкиназа, myotonic dystrophy protein kinase — *DMPK*) (Mounsey, 1995.). *DMPK* состоит из 629 аминокислот и относится к семейству серин/треонин протеинкиназ, родственных цАМФ-зависимым протеинкиназам (Горбунова и др., 2000; Fu et al., 1992).

Shae и др. (1993) установили, что ген *DMPK* содержит 15 экзонов, которые распределены на участке 13 кб геномной ДНК на 19 хромосоме. Белок, кодируемый геном, имеет размер от 68 до 80 kDa и является тканеспецифичным. В настоящее время выделяют 6 подтипов *DMPK*, которые локализуются в различных тканях: в скелетной и гладкой мышечной ткани, в миокарде (волокна Пуркинье, вставочные диски кардиомиоцитов), в центральной нервной системе (на апикальной мембране эпендимы, plexus choroideus, в синапсах мозжечка, гиппокампе, продолговатом и среднем мозге), фибробластах, лимфоцитах (Горбунова и др., 2000).

В исследованиях, проведенных van der Ven и др. (1993), обнаружили более низкие уровни иммунореактивной мышечной протеинкиназы 53 кД в скелетных и сердечной мышцах у пациентов с МД 1, чем у контрольной группы. Иммуногистохимическое окрашивание показало, что белок DMPK локализуется преимущественно в местах нервно-мышечной и миотендионных стыках человека и грызунов скелетных мышц.

В некоторых генах в норме наблюдается варьирующее число тринуклеотидных повторов. Эта особенность строения гена не ведет к изменению функции гена и постоянна в своей локализации. Размах вариаций у разных людей по таким повторам, в том числе у родственников, может быть большим (от единичных до десятков). Однако увеличение числа повторов выше определенной величины ведет к нарушению функции гена, т.е. нарушению синтеза первичного продукта. Суть мутации в таких случаях сводится к экспансии (увеличению числа) ТНП. Это происходит в мейозе у одного из родителей, но непостоянно, чем и обусловлен неменделеевский характер наследования.

Роль гена *DMPK* в развитии миотонической дистрофии до конца не ясна. Достаточно долго считалось, что, в основе патогенеза лежит гаплонедостаточность гена миотонинпротеинкиназы, в 3' нетранслируемой области которого лежит подверженный экспансии повтор (Tapscott, 2000, Fu et al, 1992, Novelli et al, 1993). Однако, в исследованиях на мышцах было показано, что гомозиготность по делеции данного гена не приводит к клинической картине МД – у таких мышечей наблюдаются только легкая мышечная слабость и незначительные нарушения проводящей системы сердца (Janssen et al, 1996, Reddy et al, 1996). В связи с этим было выдвинуто предположение, что в патогенезе заболевания могут быть вовлечены другие гены – например, ген *SIX5*. Область экспансии данного гена находится в непосредственной близости от промотора гена *SIX5*, гомологи которого у дрозофилы и мыши ответственны за развитие глаз и переднего плечевого пояса (Bousher et al., 1995, Jansen et al, 1995). Кроме этого, изменение структуры хроматина в области гена *DMPK*,

может вызвать наиболее дистальные изменения в экспрессии генов – например, повлиять на расположенный, в 5' конце от гена *DMPK* ген *DMWD* (семенник-специфичный ген), нарушение которого может привести к характерной для МД стерильности и на ген рецептора IgG, что может привести к характерному для МД снижению уровня IgG в плазме крови (Junghans et al., 2001).

Для оценки возможного влияния экспансии CTG-повтора на экспрессию генов *DMPK*, *SIX5*, *DMWD* был проведен сравнительный уровень экспрессии мРНК и пре-РНК этих генов у здоровых лиц и у больных МД 1. При этом получены противоречивые результаты – но совместный анализ полученных данных говорит о том, что, скорее всего экспансия минимально влияет на уровень экспрессии всех этих трех генов (Hamshre et al., 1997; Otten et al., 1995; Klesert et al., 1997; Krahe et al., 1995). В связи с этим выдвинута другая гипотеза этиопатогенеза МД 1, согласно которой транскрипты, содержащие CUG триплеты, ведут к нарушению сплайсинга различных пре-мРНК в клетке (Timchenko et al., 1996; Lu et al., 1999; Davis et al., 1997; Lu et al., 1999; Miller et al., 2000). Для проверки этой гипотезы были получены трансгенные мыши, у которых блок примерно из 250 CTG-повторов был вставлен в 3' нетранслируемую область гена актина скелетных мышц (Mankodi et al., 2000). У данных мышей наблюдалось развитие миотонии и характерных для МД нарушений структуры миофиламентов. Роль нарушений обмена пре-мРНК в патогенезе МД была подтверждена после выявления второго гена МД – гена цинковых пальцев *ZNF9* (Tronton et al., 1994; Day et al., 2003; Liguori et al., 2001; Liguori et al., 2003). При этом ни сам ген *ZNF9* (связывающийся с нуклеиновыми кислотами белок с точно неизвестной функцией), ни расположенные в непосредственной близости от него гены ни структурно, ни функционально не были родственны генам *DMPK*, *SIX5* и *DMWD*.

1.2.6. Исследование полиморфизма гена мышечной протеинкиназы

Ген *DMPK*, несмотря на его значимость в патологии человека, недостаточно исследован в отношении полиморфных SNP. Так, из известных

1000 однонуклеотидных полиморфизмов в этом гене, в проекте HarMap прогенотипировано только семь и только в десяти популяциях, и таким образом, структура неравновесия по сцеплению в этом гене остается практически неизученной.

Ген миотонической дистрофии – один из первых аутосомных генов человека, для которого методами генетического анализа была идентифицирована группа сцепления (Eiberg et al., 1983; O'Brien et al., 1983). Современные молекулярные методы эволюционной генетики основываются на использовании ди- и полиаллельных ДНК-маркеров. Полиморфизм единичного нуклеотидного сайта, или однонуклеотидный полиморфизм (*SNP*- single nucleotide polymorphism), чаще всего представлен двумя аллельными вариантами (заменами) однонуклеотидного сайта какой-либо ДНК-последовательности.

Исследования гаплотипов в локусе *DMPK* как в популяционных выборках, так и в связи с миотонической дистрофией только начались, и в литературе и базах данных имеются отрывочные данные о частотах *SNP*-гаплотипов в отдельных популяциях, полученные на разных наборах *SNP*. Эти данные демонстрируют межпопуляционные отличия в частотах гаплотипов в локусе *DMPK* и накопление отдельных гаплотипов у больных МД 1-го типа.

В результате анализов гаплотипов гена миотонинпротеинкиназы, по восьми полиморфным локусам *DraIII*, *HphI*, *HhaI*, *HinfI*, *BpmI*, *Fnu4HI*, *TaqI* гена *DMPK*, выявлен мажорный гаплотип в одной нигерийской семье (Krahe et al., 1995). В популяциях Тайваня было исследовано распределения *CTG*-повторов в нормальных аллелях и в аллелях с экспансией тринуклеотидных повторов. Было найдено 18 аллелей с повторами от 5 до 30, что составило подавляющее большинство всех обнаруженных аллелей. Обнаружена ассоциация между аллелями, содержащими 5-9 повторов и *Alu*-полиморфизмом в нормальных хромосомах. В этом же исследовании было показано восемь гаплотипов, семь из которых были ранее описаны в канадской и японской популяциях (Pan et al., 2001). В 13 этнических популяциях Индии были

проведены исследования по трем полиморфным локусам *Alu*, *HinfI*, *TaqI* (Basu, Majumber, 2001). У исследованных европейских и азиатских больных миотонической дистрофией 1 типа, была показана полная ассоциация между аллелями с выраженной экспансией тринуклеотидных повторов и *Alu*-делеционным полиморфизмом, который расположен в 8 интроне гена *DMPK* на расстоянии 5 т.п.н. с 3' стороны от (CTG)_n повтора (Harley et al., 1992; Imbert, 1993; Mahadevan et al., 1993).

1.2.7. CTG - повторы в гене мышечной протеинкиназы

Распределение нормальных CTG-повторов у здоровых людей в гене миотонинпротеинкиназы изучено многочисленными исследователями из разных стран. Брук в 1992 году с помощью позиционного клонирования показал, что CTG-повторы подвергаются экспансии. Широкомасштабные исследования гаплотипов, состоящих из CTG-повторов и нескольких фланкирующих повторы маркеров в нескольких африканских, азиатских и европейских популяциях человека продемонстрировали, что (CTG) 11-13 аллели имеют наибольшую частоту в 12 из 24 популяций, а у жителей Южной и Центральной Африки аллели (CTG) 9-17 ассоциированы со многими различными гаплотипами (Tishkoff et al., 1998). Высокая частота гаплотипа (CTG) 5- (++++) во многих популяциях может быть обусловлена более ранним влиянием случайного генетического дрейфа, увеличением мутационной стабильности аллеля (CTG) 5 и/или селективным или механическим давлением со стороны гаплотипа на аллели с менее 5 повторами. Другие семь основных гаплотипов могли возникнуть позднее, вследствие одного или более мутационного и/или рекомбинационного событий, вероятно, на хромосоме, первоначально содержащей повторы средней длины. Мутация, рекомбинация и генетический дрейф привели к различию гаплотипов в популяциях Южной и Центральной Африки. При этом дрейф включает значительный эффект основателя, который, возможно, объясняет как высокую частоту гаплотипа (---)

(состояние делеции для всех исследованных локусов), так и его строгую ассоциацию с $(CTG)_n$ -аллелями среднего размера, особенно в неафриканских популяциях. В большинстве популяций аллели средней длины имеют унимодальное распределение, не зависимо от того, связаны ли они с (+++) или (---) гаплотипом, что соответствует модели мутации, при которой экспансия происходит посредством постепенного увеличения на одну или несколько единиц повторов. Однако, присутствие длинных $(CTC)_n$ - аллелей, связанных с (---) гаплотипом в неафриканских популяциях предполагает, что иногда может происходить увеличение числа повторов одним «большим скачком» (Shriver et al., 1993; Valdes et al., 1993; DiRienzo et al., 1994).

В популяциях Южной и Центральной Африки полиморфизмы (+++) наиболее часто ассоциированы с аллелями $(CTG)_{9-17}$, тогда как у евреев Эфиопии на хромосоме (+++) встречаются аллели длиной от 5 до 32 (CTG) - повторов.

В мексиканской популяции аллель $(CTG)_{13}$ составил 38,87%, аллель с 18 (CTG) -повторами наблюдался в 6,7% (Magaña et al., 2011).

Таким образом, можно предположить, что аллели $(CTG)_{>18}$ могли возникнуть на основе аллелей $(CTG)_{9-17}$, а не вследствие резкого увеличения числа повторов в аллеле $(CTG)_5$ (Rubmsztein et al., 1994 ; Zerylnick et al., 1995). Аллели, содержащие более 17 CTG - повторов встречаются только у евреев Эфиопии и в неафриканских популяциях. На основании этого было высказано несколько предположений о возникновении CTG - повторов большой длины на (+++) хромосоме вследствие накопления небольших изменений размера аллеля из группы $(CTG)_{9-17}$, благодаря единственному мутационному событию (большой скачок), в результате уникального рекомбинантного события. Но каков бы ни был механизм, лежащий в основе возникновения новых аллелей большого размера в популяциях Южной и Центральной Африки, наличие аллелей, содержащих 30 CTG - повторов у орангутанга показывает, что увеличение числа повторов не является событием, уникальным только для человека (Tishkoff et al., 1998).

При исследовании СТG-повторов и гаплотипов по трём полиморфным вариантам в гене *DMPK* (*Alu*, *HinI* и *TaqI*) в иранской популяции, было показано, что 23.7% аллелей содержали 5 тринуклеотидных повторов и только 7,25 % - более 18 СТG-повторов. Кроме того, 75% аллелей СТG(5) 80% аллелей СТG(>18) ассоциировали с гаплотипом +++ .(Shojasaffar et al., 2008). В работе Moradin и др. в иранской популяции выявлено тримодальное распределение СТG-повторов (8, 10-12, 22) (Moradin et al., 2010). В популяции Сербии, также, СТG(>18)- повтор ассоциировал с тем же гаплотипом +++ (Krndija et al., 2005).

Что касается количества СТG-повторов в нормальных популяциях, то число триплетов является характерным для каждой этнической группы. Но в большинстве популяций в норме встречается от 6 до 18 повторов (табл.5).

Распределение аллельных вариантов в ранее изученных этно-территориальных группах Якутии несколько иной, чем в европейских популяциях, для которых характерна двухвершинная кривая с максимальной частотой аллелей с 5 и 11-14 повторами. В популяции якутов, по данным Сухомясовой (2005) показано одномодальное распределение наиболее частыми являются аллели с 12 и 13 повторами; их частота составляет 65-79%.

Таблица 5

Частоты СТG-повторов в гене *DMPK* в мировых популяция

Кол-во повторов	Частота СТG-повторов в различных этнических группах			
	Африканцы ¹⁻⁴ (N=1044)	Европейцы ^{1,2} (N=550)	Американские индейцы ^{1,2} (N=738)	Бразильцы ⁵ (N=312)
(СТG) 5	0,2624	0,3745	0,0392	0,3462
(СТG) 6-18	0,7337	0,5490	0,9363	0,5769
(СТG) ≥19	0,0038	0,0763	0,0243	0,0769

Примечание. ¹ Zerylneck et al., 1995; ² Deca et al., 1996; ³ Goldman et al., 1996; ⁴ Gennarelli et al., 1999; ⁵ Freitas et al., 2007;

Преобладание повторов 12 и 13 отмечено в азиатских популяциях, а аллелей с числом повторов 11 – среди европейцев (Попова и др., 2002; Tishkoff et al., 1998; Watkins et al., 1995; Pan et al., 2001).

1.3. Этногенез популяций Северной Евразии

В данной работе исследуются тринуклеотидные СТГ-повторы, шесть однонуклеотидных полиморфных вариантов и шесть микросателлитных локусов в гене *DMPK* в шести популяциях, относящихся к разным этническим группам. Хорошо известна этноспецифичная зависимость как различных генетических нарушений, так и нормального полиморфизма аллельных частот. Поэтому коротко остановимся на описании этногенеза изученных популяций.

Этногенез якутов

Якуты - самоназвание саха «јака» от эвенкийского яко, к которому восходит русское якут. Якуты представляют собой самую многочисленную народность Якутии и самый северный тюркский народ Сибири, являются вторым по численности после бурят в Сибири и на Дальнем Востоке. Этногенез якутского народа до сих пор остается дискуссионным и этот вопрос отражен в многочисленных научных работах по археологии, этнографии, истории и лингвистике (Окладников, 1949; Мочанов, 1988; Серошевский, 1993; Ксенфонтов, 1992; Гоголев, 1993, 2004; Алексеев, 1996, Константинов, 2003). Проблема происхождения саха является большой исторической загадкой и восходит к истокам общетюркского и общемонгольского этногенеза. Первые известия о якутах – саха упоминается в дневнике Э.И. Идес, посла России немецкого происхождения. Он впервые обратил внимание на близость якутского языка к татарским, т.е. к тюркским языкам и предположил, что саха прежде составляли один народ с бурятским и проживали на Байкале (Ксенофонтов, 1992). И.В. Константинов (1975) выделяет четыре периода в формировании якутского народа: докурыканский (гуннский), с конца I тысячелетия до н.э. и до VI в. н.э.; курыканский - VI-X вв.; монгольский - XI-XIII вв.; якутский - XV-XVI вв.

Этногенез якутов начинается с эпохи ранних кочевников, когда на западе Центральной Азии и в Южной Сибири развивались культуры скифо-сибирского типа, связанные своим происхождением с иранскими племенами.

Отдельные предпосылки этой трансформации на территории Южной Сибири уходят в глубь II тыс. до н.э. Наиболее отчетливо истоки этногенеза якутов и других тюркоязычных народов Саяно-Алтая прослеживаются в пазырыкской культуре Горного Алтая. Ее носители были близки к сакам Средней Азии и Казахстана. Ираноязычность пазырыкцев подтверждается также данными топонимики Алтая и прилегающих к нему районов Южной Сибири. По данным исследований В.В. Фефеловой, в крови 29,1 % якутов, обследованных в разных районах республики Саха, обнаружен антиген HLA-A1, встречаемый только в европеоидных популяциях. Он у якутов часто встречается в сочетании с другим антигеном - HLA-B17. А в совокупности эти антигены прослеживаются в крови двух народов - якутов и индийцев-хинди (Фефелева, 1987). Наличие скрытого древнего европеоидного компонента в генофонде якутов подтверждается данными психологии: у них был обнаружен так называемый "межполушарный тип мышления". Есть мнение, что в этногенезе якутов приняли участие какие-то древние отуреченные группы индоиранского происхождения. Возможно, ими были роды, связанные с пазырыкцами Алтая. Физический тип последних отличался от окружающего их европеоидного населения более заметной монголоидной примесью. Кроме того, для сакской мифологии, оказавшей огромное воздействие на пазырыкцев, характерны параллели в большей степени с ведийской. Г.В.Ксенофонов в работе «Ураангхай сахалар» выдвинул концепцию о поэтапном заселении якутами их нынешней территории в период с I по XII век нашей эры. По его предположению якуты представляют собой народ смешанного происхождения, включивший в себя три «волны» тюркоязычных переселенцев из Прибайкалья. Данная концепция, помимо всего прочего, подтверждается современными глоттохронологическими исследованиями. Так, расхождение якутского и тюрского языка датируется 100 годом нашей эры. Наиболее вероятная теория происхождения якутского этноса была выдвинута Токаревым С.А. Согласно этой теории, якутский народ в основном сложился на средней Лене путем смешения различных этнических групп (при проникновении лишь отдельных этнических групп с юга) (Токарев,

1941). В исследовании Crubezy и др. первые контакты русских с якутами относятся к 1632 году. К этому времени якуты были уже вполне сформировавшимся социальным сообществом. Так был датирован верхний предел первого этапа этногенеза якутов – не позднее 1632 года (Crubezy, 2010). Таким образом, якуты относятся к числу народов с сложным этническим формированием, возникшим в результате взаимодействия двух процессов, протекавших в непрерывном единстве дифференциации и интеграции различных этнокультур.

По мнению Ушницкого В.В., результаты анализа историографического аспекта изучаемой проблемы предполагают синтезированное происхождение якутского этноса — от слияния южных пришельцев с местными, автохтонными группами на территории средней Лены в XV–XVI вв. При этом южные мигранты могли прибывать отдельными группами в разное время. Выделяются носители этнонимов ураанхай, саха, боотулу, хоро, байагантай и тумат, как имеющие этнических предков в южных регионах (Ушницкий, 2014).

Этногенез бурятов

Самоназвание бурят – «буряяд», «бурят». Русские называли бурят «братскими людьми». Вопрос о времени объединения бурятских племен в единый этнос до сих пор остается дискуссионным. В настоящее время большинство исследователей сошлись во мнении, что предки бурят в XVII веке еще не представляли единого этноса и завершение образования бурятского народа произошло уже после присоединения Восточной Сибири к Российской империи. Ближайшими соседями предков бурят с давних времен были енисейские кыргызы, ойраты, племена самодийского и тунгусского происхождения и жившие за Байкалом монгольские этнические группы. И все они в какой-то мере оказали влияние на формирование родоплеменного состава бурят. Сейчас среди исследователей преобладает мнение о том, что буряты пришли в Прибайкалье из других краев. Эти взгляды сформировались после прихода к Байкалу русских, которые проявляли исключительный интерес к прошлому аборигенного населения Сибири, к его происхождению и связям с

другими народами Азии. Они обратили внимание на большое сходство внешнего облика бурят с калмыками, а также на сходство обычаев и образа жизни этих народов. Поэтому в официальных документах XVII в., в исторической и географической литературе получила распространение концепция общности происхождения бурят и калмыков. Эти взгляды развивались и позднее. В XVIII в. появились мнения об общности бурят и ойратов — монголоязычного народа, населяющего западные районы Монголии. Сторонником этой точки зрения был «отец сибирской истории» Г. Ф. Миллер (1997). Концепция калмыцкого (ойратского) происхождения бурят сохранялась в науке до XIX в. При этом буряты безоговорочно признавались пришлым населением края. Считалось, что в районы Прибайкалья они перекочевали с Алтая и из Джунгарии. Кроме того, высказывались предположения о непосредственном отчленении бурят от монголов и приходе их в районы Прибайкалья из Восточной Монголии. Оригинальные взгляды на этногенез бурят высказал в конце XIX в. этнограф и путешественник Г. Н. Потанин. Проникновение монголов на территории, ранее занятые тюркскими народами, по его мнению, характеризовалось не молниеносным завоеванием и уничтожением тюркских племен, а медленным продвижением монгольских группировок на территории тюркских народов, постепенным приобщением к их быту и образу жизни. Тюрки постепенно были оттеснены из мест обитания. (Потанин, 1883).

К настоящему времени в целом определен сложный этнический состав бурятского народа. Основным ядром народности, ассимилировавшим и объединившим вокруг себя различные этнические группы, были монголоязычные племена, в то же время в этногенезе бурят отчетливо прослеживаются тюркские, тунгусские элементы (Нимаев, 2000). Большинство исследователей солидарны с тем, что соответствующие условия для окончательной консолидации разных родоплеменных групп бурят в единую народность возникают только после присоединения Бурятии к России.

Этногенез киргизов

Киргизы (самонзвание «кыргыз»). Этногенез киргизов, несмотря на то, что ученые изучают его уже на протяжении почти двух веков, является одним из самых спорных моментов в современном тюрковедении. Существует множество самых различных теорий и гипотез о происхождении этого народа, однако все они признают факт того, что в формировании киргизов принимало участие несколько основных этнических компонентов. По мнению С.Г. Кляшторного древние кыргызы, тюрки, огузы и кипчаки, являлись основными тюркоязычными этносоциальными объединениями, сложившимися практически одновременно, между V-VII вв., и "в течение почти тысячелетия влиявшими на судьбы Центральной и Средней Азии" (Кляшторный, 1987). По сути, современные киргизы являются продуктом смешения и взаимодействия этих четырех объединений, выступающих в этногенезе киргизов как основные этнические компоненты. Одним из первых, высказавших предположение о тесных связях нынешних киргизов с енисейскими кыргызами, был известный исследователь Сибири XVIII века, академик Российской академии наук Фридрих Миллер (Миллер, 1998). Позднее И.Э. Фишер предположил, что современные киргизы были переселены джунгарами с Енисея на территорию современного Кыргызстана в XVII веке (Фишер, 2000). Следует отметить, что в настоящее время ученые справедливо признают ошибочность этой версии, так как существует много фактов, свидетельствующих о нахождении киргизов на Тянь-Шане значительно ранее начала XVIII века – времени переселения енисейских кыргызов джунгарским владетелем Цеван Рабтаном в Семиречье. Наряду с трактовками предыдущих ученых, известность получила и точка зрения русского китаиста XIX века Н.Я. Бичурина, который, в соответствии со своими взглядами об автохтонности большинства южносибирских и центральноазиатских народов, считал, что киргизы издавна жили на Тянь-Шане и Восточном Туркестане.

Киргизский этнос состоит из нескольких основных этнических компонентов. Это, в первую очередь, енисейско-кыргызский этнический

компонент, связанный с древними кыргызами, в средние века населявшими Минусинскую котловину, Туву и прилегающие районы. Другим важным компонентом является древнетюркский. В составе киргизских племен обнаруживаются множество родоплеменных подразделений, связанных с собственно древними восточными и западными тюрками, в том числе с карлуками, чигилями, тардушами. Огузско-уйгурский этнический компонент является еще одним этническим компонентом, выделяемым в этногенезе киргизов. Об исключительном значении кипчакского компонента в этногенезе киргизов говорят многие данные, в первую очередь история современного киргизского языка. Составители классификаций тюркских языков помещают киргизский язык в особую киргизско-кипчакскую группу восточнотюркской ветви тюркских языков. В это же время в кипчакскую среду попадает этноним "кыргыз", который распространяется на часть кипчакских племен, образуя, таким образом, ядро будущего киргизского этноса. К началу XV века киргизы, входящие в состав ойратского государства, оказываются вовлеченными в походы на юг – в земли Семиречья и Моголистана. В результате ослабления моголов, вызванного многочисленными походами Тимура и его потомков, киргизы в XV-XVI веках заселяют Тянь-Шань, при этом вытесняют и частично ассимилируют местные могольские племена. Таким образом, к XVIII веку полностью завершается процесс формирования киргизского этноса.

Обобщая литературные данные можно утверждать, что в этногенезе киргизов выделяется кипчакский компонент, который, вместе с енисейско-кыргызским компонентом сформировал ядро будущих киргизов, предопределил и обусловил будущее своеобразие лингвистических, этнографических и историко-культурных характеристик киргизского народа. Этот компонент обнаруживается в родоплеменной структуре киргизов, он доминирует в их языке, проявляется в богатой эпической традиции и материальной культуре.

Этногенез хантов

Ханты (самоназвание - ханти, хандэ, кантэк, кантах - ях) - народ в Западной Сибири. Общее название хантов – остяки. Так официально именовали хантов в России до 1930 – гг. Среди хантов выделяются три этнографические группы (северные, южные и восточные), отличающиеся диалектами, самоназваниями, особенностями в хозяйстве и культуре, а также эндогамией, причем южные (прииртышские) ханты смешались с русским и татарским населением. Внутри каждой из них, в свою очередь, имеются территориальные группы, различающиеся обычно по названиям отдельных рек, в бассейне которых они живут. Широкое географическое расселение, многообразные контакты обусловили определённые различия внутри хантийского этноса. В антропологическом отношении ханты являются наиболее характерными представителями уральского антропологического типа, к которому относятся также манси, селькупы и ненцы. Самые близкие родственники хантов по происхождению, языку и культуре - манси, особенно близки северные группы. История предков хантийского народа, согласно работе В.И. Молодина (1995), вкратце выглядит так. В эпоху средневековья в Прииртышье на основе потчевашской культуры складывается устьишимская (южнохантыйская), а с предками северных хантов связываются кинтусовские памятники. В Среднем Приобье в VI - VIII вв. на основе кулайской формируется рёлкинская культура с двумя основными компонентами - угорским (восточнохантыйским) и самодийским (селькупским). Археологические данные свидетельствуют о наличии в протохантыйских культурах иноэтических компонентов, носители которых могли проживать по соседству либо на той же территории, что и предки хантов. Этногенез хантов, как и в целом обских угров, на сегодняшний день - еще далеко не решенная проблема. Согласно одной из точек зрения в основе их формирования лежит культура древних аборигенных уральских племен, занимавшихся охотой и рыболовством. Позднее они подверглись влиянию скотоводческих андроновских племен с традициями скифско-сарматской культуры. В процессе слияния этих этнических элементов к

середине I тысячелетия н. э. и сложились обско-угорские племена. К концу I тысячелетия н. э. с востока и юго-востока в северо-западную Сибирь пришли самодийские племена. Новый этап этнических взаимодействий, в результате которых часть обских угров восприняла элементы самодийской культуры, продолжался и в первые века II тысячелетия. С другой точки зрения андроновскую культуру наиболее обоснованно увязывать не с угорским этническим элементом, а с иранским этносом, а наиболее древней угорской культурой считается кулайская. В конце I тысячелетия до н. э. кулайцы расселились на север и запад. Первый переселенческий поток привел к формированию в Нижнем Приобье усть-полуйской культуры, на основе второго в северном Прииртыше возникла потчевашская культура. Обе эти культуры принято считать протохантыйскими. В целом, археологические материалы свидетельствуют о сложности протохантыйских культур, о наличии в них разных этнических элементов. Позднее, в эпоху средневековья, существенное влияние на них оказал тюркский этнический компонент. Кроме того, здесь же имеются следы тунгусского и кетского влияния. В последующем часть западных хантов переселилась на Восток и Север. На Севере ханты вступали в контакты с ненцами и частично были ими ассимилированы. В южных районах шли интенсивные процессы тюркизации, а с XVIII в. и обрусения. К XX веку южные ханты были почти полностью ассимилированы сибирскими татарами и русскими (Тучков, 2008).

Этногенез кетов

Кеты – одна из самых малочисленных народностей Севера, древние жители Южной Сибири, а также Обь – Енисейского междуречья. Расселены в северной части Красноярского края. Большинство кетов сосредоточено на территории Туруханского района. Располагаются компактными группами по притокам Енисея - Елогую, Сургутихе, Пакулихе и Курейке. Подкаменнотунгусская группа входит в Байкитский район Эвенкийского национального округа. Несколько семей живет в Енисейском и Игарском районах Красноярского края. Отдельные группы народностей удалены друг от

друга на значительное расстояние. Северные (курейские) кеты находятся более чем за полторы тысячи километров южных своих соплеменников. Название "кеты" происходит от "кет" - "человек". Утвердилось в русском языке с начала XX столетия. До этого кеты были известны под наименованием "остяки", "енисейские остяки", "енисейцы". Среди пожилой части населения встречается еще одно старое самоназвание - "остыган". Кетский язык занимает изолированное положение и не входит ни в одну группу языков Северной Азии. В кетском языке выделяется два диалекта (имбатский и сымский), значительно отличающиеся друг от друга в области фонетики, морфологии и лексики. Письменности у кетов не было, она формируется в настоящее время на основе русской графики. Все современные кеты говорят на русском языке, некоторые владеют селькупским и эвенкийским языками. (Дульзон, 1968) В антропологическом отношении кетов относили к уральскому типу, сочетающему в себе европеоидные и монголоидные черты. Однако последующее изучение позволило выделить кетов в самостоятельный енисейский тип. По всему комплексу антропологических признаков кеты являются монголоидами с несколько ослабленной степенью выраженности монголоидных черт. Обладая рядом общих признаков, по территории проживания, они обнаруживают сходство с соседними народами. Так, северные группы кетов в антропологическом плане тяготеют к селькупам, отчасти хантам и ненцам, а южная, подкаменно-тунгусская, к хакасам и шорцам. В настоящее время сформулировано положение, что уральские черты кеты приобрели достаточно поздно, поэтому, енисейский антропологический тип генетически не связан с уральской расой и может быть выделен в самостоятельный систематический ранг. Но данная позиция является дискуссионной. С конца I тысячелетия на основе смешения аборигенов и пришлых угорских племён начался этногенез хантов (усть-полуйская культура) (Алексеенко, 1967).

Предки современных кетов сформировались на юге междуречья Оби и Енисея в результате смешения европеоидов Южной Сибири с древними монголоидами. Примерно в I тысячелетии н.э. они вступили в контакты с

тюрко-самодийско-угрозычным населением и в результате миграций оказались на Енисейском Севере. В частности, по реке Кану (правый приток Енисея) были расселены котты, по рекам Усолке и Оне (левобережье низовий Ангары) - асаны, на Енисее в районе Красноярска - арины, выше их по правобережью Енисея до устья реки Тубы - яринцы и байкотовцы. Ниже по Енисею и его притокам Касу, Сыму, Дубчесу, Елогую, Бахте, по низовьям Подкаменной Тунгуски обитали предки современных кетов. Эти племена резко отличались по языку от окружавших их тюркских, самодийских и тунгусских народов. К первой половине 19 века почти все они утратили свой язык, слившись с русскими, эвенками, с предками современных хакасов. И только самые северные - предки кетов - сохранили свой язык и этническое лицо. Кеты, таким образом, являются сегодня единственными представителями этой ныне исчезнувшей группы племен.

Анализ гаплотипического разнообразия на хромосомах, сцепленных с определенным наследственным заболеванием, даёт возможность установить конкретный источник основателя и рассчитать приблизительное время её появления в популяции. Современные антропологические типы сложились в результате длительных этнических контактов отдельных групп населения друг с другом, в процессе сложного взаимного влияния. В целом, коренное население Северной Евразии, на территории которой проживают изучаемые в данной работе популяции, характеризуется преобладанием монголоидных антропологических признаков и принадлежит к различным вариантам монголоидной расы (Тучков, 2008). В языковом отношении народы Северной Евразии принадлежат к различным языковым объединениям: алтайской макросемье языков, уральской языковой семье и палеоазиатской (или иначе – палеосибирской) лингвистической семье. На основе предполагаемой генетической сопринадлежности алтайская языковая семья объединяет тюркские, монгольские и тунгусо – маньчжурские языки. Формирование и развитие любого этноса определяется событиями, происходящими не только в окружающем пространстве, но и далеко за его пределами.

Таким образом, формирование этногенеза народов Северной Евразии проходило в глубокой древности на основе различных этнических образований, как местных, ставших этническими предшественниками ряда тюркских народов, так и пришлых, вступивших в контакт с местными племенами и ассимилировавших их. Особенностью этногенеза якутского населения является смешение южных этносов с аборигенным населением края.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

2.1. Клинико-генеологическая характеристика больных и их родственников из обследованных семей

Работа выполнена в период с 2007 по 2014 гг. на базе лаборатории эволюционной генетики ФГБНУ «НИИ медицинской генетики» г. Томск (руководитель – зав. лабораторией эволюционной генетики, д.б.н., профессор Степанов В.А.), отдела молекулярной генетики ФГБНУ Якутского научного центра комплексных медицинских проблем (директор – д.м.н., профессор Томский М.И.); медико-генетической консультации Перинатального центра ГБУ РС (Я) Республиканской больницы №1 - Национального центра медицины Республики Саха (Якутия) (заведующая – к.м.н. Сухомясова А.Л.).

Данные для исследования больных миотонической дистрофией были взяты из Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии МГК ГБУ РС (Я) РБ№1-НЦМ. В Республике Саха (Якутия) миотоническая дистрофия распределена неравномерно с выраженным накоплением заболевания в отдельных улусах. Патология зарегистрирована в 19 из 35 административно-территориальных единиц: в 17 улусах и в городах Якутске и Нерюнгри с подчиненными территориями. Диапазон распространенности МД по улусам крайне широк и составляет от 2,2 до 122,2 на 100 тысяч населения. Наибольшие частоты МД встречаются в Амгинском, Горном, Оленекском, Среднеколымском, Сунтарском улусах(Сухомясова, 2005).

В работе использованы образцы ДНК 98 больных МД из 47 неродственных семей и 50 их фенотипически здоровых родственников, проживающих в РС(Я). Сведения о больных были получены из Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии медико-генетической консультации ГБУ РС (Я) РБ№1-НЦМ, а также в процессе экспедиционных выездов, проводимых совместно с

сотрудниками ФГБУ «ЯНЦ КМП» СО РАМН, с целью осмотра больных и членов их семей и забора крови для ДНК-анализа. Дополнительные сведения были получены из центральных улусных больниц, медико-социальной экспертной комиссии.

При сборе материала наблюдалось неравномерное территориальное распределение больных по местам их происхождения в РС (Я). Установлено наличие двух основных очагов сосредоточения заболевания: вилюйские улусы, расположенные по бассейну реки Вилюй, где из пяти улусов (Вилюйский, Верхневилюйский, Кобяйский, Нюрбинский, Сунтарский) происходят 18 семей (38,5%) с 40 больными, и улусы Центральной Якутии, где из семи улусов (Амгинский, Горный, Мегино-Кангаласский, Намский, Хангаласский, Усть-Алданский, Таттинский) происходят 23 семей (30,8%) с 38 больными. Из северных улусов (Среднеколымский, Томпонский, Аллаиховский, Момский, Оленекский, Верхоянский) происходят 6 семей с 10 больными.

Локальное накопление больных с МД, возможно, явилось результатом эффекта родоначальника в условиях его расширенного воспроизводства. Для якутского населения характерен высокий уровень рождаемости (Гоголев, 2000; Федорова, 1999; Тарская, 2002).

Популяционная выборка здоровых индивидов представлена коренными жителями Якутии, проживающими в двух улусах РС (Я): центральном (128 чел.) и вилюйском (100 чел.). Западная и Восточная Сибирь представлена бурятами из г.Улан-Удэ (50 чел.) и пос. Хуромша (50 чел.) Республики Бурятия, русскими (100 чел.) из Томской области, хантами (100 чел.) из деревни Русскинской Сургутского района Тюменской области (ХМАО), кетами (50 чел.) из пос. Келлог Туруханского района Красноярского края; из Средней Азии: киргизы южные из г.Ош (50 чел.) и киргизы северные из пос.Кегеты (50 чел.) Республики Кыргызстан. Забор биологического материала (венозной крови) производили после медицинского осмотра с обязательным письменным информированным согласием на проведение исследования. Этническая принадлежность индивида учитывалась до третьего поколения. Комплексное

обследование пробандов, их родственников проводились на базе МГК ПНЦ ФГБУ РС (Я) РБ№1-НЦМ и в ходе экспедиционных выездов в улусы. В табл.6 приведена количественная характеристика исследованных групп больных и популяционных выборок.

Таблица 6

Количественная характеристика исследованных выборок

	Группы	Всего обследовано, человек (семей)
1	Больные МД якуты	98(47)
2	Родственники больных, не несущие мутацию	50(47)
3	Популяционная выборка, всего: из них: Центральные якуты Вилюйские якуты Буряты Киргизы Ханты Кеты Русские	678 128 100 100 100 100 50 100
	ИТОГО:	826

Распределение больных в нашем исследовании по половому составу выглядит следующим образом: мужчин - 46, женщин – 52. При численности мужского и женского населения в РС (Я), соответственно 221,4 тыс. (48,6%) и 245,0 тыс. (51,1%) (данные переписи населения 2010г.), различие в распределении по полу не имеет статистической значимости ($p > 0,5$). По этническому составу 98 больных МД якуты из двух групп улусов РС (Я).

Обследование семьи начиналось с осмотра врачом-генетиком и заполнения специально составленного протокола для МД, включающего сроки

проявления признаков заболевания, данные неврологического осмотра, функциональных и инструментальных методов исследования, генеалогическую карту. Особое внимание уделялось установлению кровного родства, национальности, мест рождений пробандов, их родителей. С использованием общепринятой символики составлены родословные 47 семей якутского происхождения, отягощенных МД. Генеалогические карты семей составлялись со слов самих больных, их ближайших родственников, медицинских работников населенных пунктов проживания обследованных. Медицинские сведения дополнялись по записям в картах амбулаторного наблюдения, результатами обследований в стационарах. Для верификации диагноза проводились лабораторные (биохимические), функциональные методы исследования (ЭНМГ, ЭКГ, УЗИ и др.), осмотр специалистов (нейрогенетика, офтальмолога, эндокринолога, психоневролога, кардиолога и др.). Диагноз МД был выставлен согласно современной классификации нервно-мышечных заболеваний (Гринио, Агафонов, 1997; Лобзин, 1998) по МКБ X G 11. и основывался на семейном анамнезе, общепринятых клинических критериях МД, а также данных дополнительных исследований и консультаций специалистов.

2.2. Характеристика исследованных популяционных выборок

Материал проведенного исследования составил 6 популяционных выборок из 10 этнических групп, проживающих на территории Северной Евразии. Этнические группы представлены двумя основными расовыми типами: европеоидный – русские; монголоидный – якуты, буряты, киргизы, ханты, кеты, а также четыремя языками лингвистических семей – алтайской, индоевропейской, уральской, палеазиатской. Лингвистические и антропологические характеристики этнических групп приведены в таблице 7.

Таблица 7

Исследованные этнические группы

Этнос	Языковая принадлежность (семья/группа)	Расовый и антропологический тип	Район проживания
Якуты	Алтайская/тюркская	Монголоидный/ центральноазиатский	Восточная Сибирь
Буряты	Алтайская/монгольская	Монголоидный/ центральноазиатский	Восточная Сибирь
Киргизы	Алтайская/тюркская	Монголоидный/ южносибирский	Средняя Азия
Ханты	Уральская/ обско-угорская	Монголоидный/ уральский	Западная Сибирь
Кеты	палеазиатская/ кетская	Монголоидный/ североазиатский	Западная Сибирь
Русские	Индоевропейская/ славянская	Европеоидный/ восточноевропейский	Восточная Европа, азиатская часть России

В исследование включены индивиды, неметисированные, по крайней мере, в трех поколениях. Национальность и родословная устанавливалась на основании индивидуальных анкет. В табл.8 приведены данные о локализации, численности и географических координатах исследованных популяционных выборок. Выборка якутов представлена двумя территориальными группами – центральные якуты из посёлка Чериктей Усть-Алданского улуса (центральная группа улусов) и виллойские якуты из четырех виллойских улусов (Сунтарский, Верхне-Виллойский, Виллойский, Нюрбинский). Буряты представлены двумя популяциями: из города Улан-Удэ и посёлка Хурамша, расположенными на территории Бурятии.

Таблица 8

Характеристики исследованных популяций

Популяция	Кол-во	Место проживания	Географические координаты
Центральные якуты	128	Респ. Саха(Якутия) Усть-Алданский улус, посёлок Чэриктей, центральная группа улусов	63°12'00"N 131°03'00"E
Виллюйские якуты	100	Респ. Саха(Якутия) виллюйская группа улусов	63°45'00"N 123°27'00"E
Буряты	50	Респ. Бурятия г.Улан-Удэ	51°50'00"N 107°37'00"E
	50	Респ. Бурятия пос. Хурамша	51°38'00"N 106°59'00"E
Киргизы	50	Респ. Киргизия пос. Кегеты	42°42'00"N 75°12'00"E
	50	Респ. Киргизия г.Ош	40°31'46"N 72°47'24"E
Ханты	100	Ханты-мансийский национальный округ (ХМАО), деревня Русскинская	63°15'45.94" N 143°12'41.63"E
Кеты	50	Красноярский край Туруханский район, посёлок Келлог	62°29'00"N 86°17'00"E
Русские	100	Томская область г.Томск	51°38'00"N 106°59'00"E

Популяция хантов из деревни Русскинская Сургутского района Тюменской области. В выборку кетов вошли индивиды из посёлка Келлог Туруханского района Красноярского края. Среднеазиатская популяция представлена двумя выборками киргизов – северные киргизы из посёлка Кегеты, южные киргизы из г.Ош, относящимся к разным родоплеменным группам (населенные пункты располагаются на территории Киргизии). Выборка русских составлена из индивидов, проживающих в городе Томске.

2.3. Молекулярно-генетические методы исследования

В работе использовались современные молекулярно-генетические методы исследования: выделение и типирование ДНК; молекулярно-генетический анализ СТG-повторов гена *DMPK*; анализ однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNP) методом ПЦР-ПДРФ; детекция СТG-повторов методом капиллярного гель-электрофореза в денатурирующих условиях на генетическом анализаторе ABI PRISM 310; анализ динуклеотидных маркеров на генетическом анализаторе ABI PRISM 3730 (Perkin-Elmer), используя стандарты длины фрагментов GeneScan-500 TAMRA и GeneScan- 500 LIZ. Анализ размера фрагментов и генотипирование проводили с помощью программного обеспечения GeneScan Analysis (Perkin-Elmer). Аллели обозначали по длине фрагментов ДНК.

Работа выполнялась в период с 2007 по 2013г. в ЛМГ МГК ПНЦ ГБУ РС (Я) РБ №1-НЦМ и в ОМГ ФГБУ «ЯНЦ КМП» СО РАМН (сбор и выделение ДНК больных с МД и здоровых родственников; молекулярно-генетический анализ нормальных аллелей СТG – повторов гена *DMPK*) и в лаборатории эволюционной генетики ФГБУ «НИИ МГ» СО РАМН (популяционно-генетические исследования). В совокупности исследовано 826 образцов ДНК, в том числе 98 образца ДНК больных с МД и 50 образца ДНК клинически здоровых родственников, а также 678 образцов ДНК здоровых людей различных национальностей.

2.3.1. Выделение ДНК из лейкоцитов крови

ДНК выделяли из 10 мл периферической крови стандартным методом с использованием протеиназы К и последующей фенол-хлороформной экстракцией (Карпищенко, 1999). В качестве консерванта использовали 0,5М ЭДТА. Для выделения ДНК к венозной крови добавляли лизирующий буфер, содержащий 0,32М сахарозы, 1% тритона x 100, 0,001мМ MgCl₂, 0,001мМ трис-

НСI, рН=7,5. Ядра лейкоцитов осаждали центрифугированием при 2600 об/мин. в течение 20 минут. К осадку добавляли 400 мкл буфера для протеиназы К, 10 мкл 20% додецилсульфата Na и 10 мкл протеиназы К до конечной концентрации 20 мг/мл, затем инкубировали 16-20 часов. Дальнейшую протеинизацию проводили последовательной фенольной экстракцией равными объемами фенола, фенол-хлороформа (1:1) и хлороформа. Разделение фаз проводили центрифугированием и отбором водной фазы после каждого этапа. ДНК осаждали добавлением охлажденного 96% этанола и дважды промывали в 70% этаноле. На заключительном этапе ДНК высушивали при комнатной температуре и растворяли в буфере TE. Выделенную ДНК замораживали и хранили при температуре -80°C или -20°C в морозильной камере. Контроль концентрации и чистоты полученной ДНК осуществлялся спектрофотометрическим методом измерения оптической плотности раствора ДНК в проходящем свете с длиной волны 260/280 нм на спектрофотометре фирмы «Nanodrop» (США). Для молекулярно-генетических анализов использована ДНК с концентрацией 100 нг/мкл. Кровь была взята с письменного согласия больных и их родственников с заполнением «Информированного согласия».

2.3.2. Анализ участка СТG-повторов гена миотонинпротеинкиназы.

Молекулярно-генетический анализ СТG-повторов гена *DMPK* у больных с МД якутской национальности и их родственников проводили с использованием праймеров, предложенными Брук и соавт. (Brook et al., 1992) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе GenAmpPCR9600 фирмы «Perkin ELMER» в режиме:

1. Hold 1 – 94°C 4 мин. } 1 цикл
2. Cycl – 94°C 40 сек.
- 62°C 40 сек. } 30 циклов
- 72°C 1 мин. 20 сек.

3. Hold - 72°C 10 мин. } 1 цикл

4. Hold – 4°C 10 мин.

Реакция была выполнена в 10 мкл объеме с образцом ДНК, содержащей реакционный буфер x 10, смесь 1,5 мМ dNTR (G+C), 25 мМ MgCl₂.

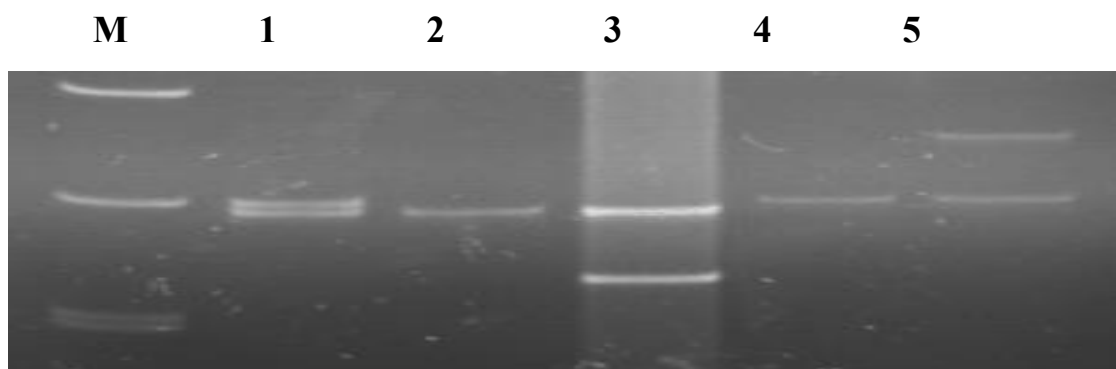
Последовательность праймеров:

МД 101: CTG CCC AGG CCT GCA GTTT

МД 102: GGC TCG AAG GGT CCT TGTA

Аmplицированные фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в 8% полиакриламидном геле (соотношение акриламид:бисакриламид – 29:1,3) в течение 2-3 часов. Полосы ДНК в геле окрашивали флюоресцирующим и интеркалирующим в ДНК красителем - бромистым этидием. Результаты разделения рассматривали в ультрафиолетовом свете. В качестве маркеров использовали пробы ДНК с известным числом повторов. У здоровых индивидов на электрофореграмме выявлялось по 2 аллеля, у больных с выраженной клинической картиной выявляется один лёгкий аллель (тяжелый аллель не виден в связи с большим количеством СТG-повторов и на электрофореграмме он обозначен как «?»).

За весь период работы было обследовано 1286 человек, носительство двух аллелей с нормальным количеством СТG-повторов отмечено у 606 человек, что позволило исключить у этих пациентов диагноз МД. Из всего массива обследованных было отобрано 47 семей (148 индивидов), в которых 98 человек имели диагноз «МД» и 50 родственников были здоровы. Пример электрофореграммы разделения аллелей, несущих разное количество СТG – повторов в гене *DMPK* представлен на рисунке 7.



рUC19/MspI 12,13 12, ? 5,12 13,? 13,21

Рис. 7. Электрофореграмма разделения СТG – аллелей в гене *DMPK* в 8% ПААГ.

Дорожка М - маркер молекулярного веса; дорожка 1 – 12 и 13 СТG-повторов; дорожка 2 – 12,? СТG-повторов; дорожка 3 – 5,12 СТG-повторов; дорожка 4 – 13,? СТG-повторов; дорожка 5 – 13,21 СТG-повторов.

2.3.3. Детекция полиморфных вариантов по шести SNP-маркерам.

Для построения и анализа гаплотипов были использованы шесть однонуклеотидных полиморфных маркеров (SNP), расположенных вдоль всего гена *DMPK*. Физическая и генетическая локализация на хромосоме и генетическая дистанция между соседними маркерами была подобрана с помощью базы UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) (рис.5/табл.8) на основании данных из базы NCBI. Область размером 27000 п.н. охватывает 6 однонуклеотидных полиморфизмов. Генотипирование индивидов осуществляли путем анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДФ) продуктов амплификации полимеразной цепной реакции (ПЦР) специфических участков генома. Последовательность праймеров («BIORON», Германия), условия ПЦР и ПДФ приведены в таблице 1 Приложения.

Общий объем реакционной смеси составил 15 мкл: 0,1-1 мкг геномной ДНК; по 0,2 мкМ оригинального праймера, по 200 мкМ каждого нуклеозидтрифосфата; 0,5 единицы активности ДНК-полимеразы («Силекс»), буфер для ПЦР («Силекс») (500 мМ KCl, 100 мМ Tris-HCl, pH 8,3; 15 мМ

МСI₂; 0,01% желатин), 20-30 мкл минерального масла. Амплификат подвергли гидролизу соответствующей эндонуклеазой (табл.9) при оптимальной для фермента температуре в течение 12 - 24 ч. Рестрикционная смесь включала 5 - 7 мкл амплификата, 1,0-1,2 мкл 10хбуфера для рестрикции, поставляемого фирмой-производителем («Сибэнзим», г. Новосибирск), и 1-5 единиц активности фермента (в зависимости от эффективности его работы). Результаты амплификации фракционировали в 3,5% агарозном геле с бромистым этидием при напряжении 120 - 300 В. в течение 45 - 100 минут и визуализировали в ультрафиолетовом свете с применением компьютерной видеосъемки на приборе BioRad.

Таблица 9

Характеристика ПЦР-ПДРФ исследованных однонуклеотидных локуса DMPK (по данным базы NCBI)

Ref SNP ID (rs)	Полиморфизм	Локализация в гене	Нуклеотидная позиция	Метод генотипирования/фермент
rs2070736	G /T	TEL от интрона	46286714	ПЦР-ПДРФ (DraIII)
rs572634	G /T	Интрон 4	46282503	ПЦР-ПДРФ (AccB1I/HphI)
rs1799894	C /T	Интрон 5	46281745	ПЦР-ПДРФ (AspLEI/HhaI)
rs527221	C /G	Экзон 10	46275976	ПЦР-ПДРФ (Bse1I/BmpI)
rs915915	G /T	Интрон 11	46274972	ПЦР-ПДРФ (Fnu4HI)
	CTG-повтор	Экзон 15	46272976-46285815	
rs10415988	D19S463	15kbCEN	46246704	ПЦР-ПДРФ (TaqI)

Для полиморфного варианта *Dra III* «Т» аллель соответствовал амплифицированному фрагменту длиной 183 п.о., «G» аллель выявлялся по двум фрагментам длиной 158 и 25 п.о. Фрагмент длиной 25 п.о. часто не был виден из-за его относительной лёгкости и, вследствие этого, быстрого выхода из геля. Для сайта *Hha I* «Т» аллель соответствовал амплифицированному

фрагменту длиной 491 п.о., «С» аллель выявлялся по двум фрагментам длиной 419 и 72 п.о. Фрагмент 72 п.о. не был виден, как и в предыдущем случае, ввиду его относительной лёгкости. Для сайта *Vrm I* «G» аллель имел длину 350 п.о., «С» аллель выявлялся по двум фрагментам длиной 299 и 51 п.о. Фрагмент 51 п.о. так же не был виден. «Т» аллель *Fnu 4HI* представлен двумя фрагментами – 127 и 155 п.н., «G» аллель – 282 п.н. Аллели *Hph I* оба представлены двумя фрагментами: «Т» - 124+186 п.н., «G» - 148+186 п.н. *Taq I* включал аллели «А» и «В», длиной 676 и 574 п.н., соответственно.

2.3.4. Анализ СТG- повторов.

В работе были проанализированы тринуклеотидные СТG-повторы, локализованные в при центромерной области гена *DMPK*. Фрагменты геномной ДНК, содержащие тринуклеотидные повторы амплифицировали методом ПЦР в условиях, рекомендованных Н. Pan (Pan, Li et.al., 2002). Последовательности праймеров опубликованы ранее (Pan, Li et.al., 2002). Количество тринуклеотидных повторов устанавливали путём определения длин фрагментов, полученных в результате ПЦР с помощью капиллярного гель-электрофореза. Фрагменты геномной ДНК, содержащие тринуклеотидные повторы амплифицировали методом ПЦР при следующих условиях: 30 циклов реакции, температура отжига праймеров 62°C. Прямые праймеры несли на 5'-конце флуоресцентную метку ТЕТ (4,7,2',7'-тетрахлоро-6-карбоксифлуоресцеин). Фрагменты, полученные при ПЦР разделяли методом капиллярного гель-электрофореза в денатурирующих условиях на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130xl (Perkin-Elmer), используя стандарты длины фрагментов GeneScan-500 и TAMRA. Анализ размера фрагментов и генотипирование проводили с помощью программного обеспечения GeneScan Analysis (Perkin-Elmer). Аллели обозначали по количеству тринуклеотидных СТG-повторов. Генотипирование исследуемых выборок по SNP осуществляли

стандартным методом ПЦР-ПДРФ (последовательности праймеров и условия реакций описаны ранее).

2.3.5. Анализ микросателлитных маркеров в локусе *DMPK*.

При анализе гаплотипа были использованы динуклеотидные маркеры в локусе гена *DMPK*, подобранные с помощью базы UCSC Genome Browser (<http://genome.uscs.edu/index.html>) (табл.10). Физическая и генетическая локализация на хромосоме и генетическая дистанция между соседними маркерами была определена на основании данных (<http://research.marshfieldclinic.org./genetics/>).

Последовательность флуоресцентно-меченых FAM меткой праймеров и условия ПЦР приведены в таблице 2 Приложения. Фрагменты геномной ДНК амплифицировали методом ПЦР при следующих условиях: 30 циклов реакции, температура отжига праймеров 60°C. Общий объем реакционной смеси составляет 15 мкл: 1 мкг геномной ДНК; по 0,5 мкМ оригинального олигопраймера, по 200 мкМ каждого нуклеозидтрифосфата; по 1,5 мкл 25 mM MgCl₂; 0,5 единиц активности ДНК-полимеразы (Силекс); 10x буфера для ПЦР (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 15 mM MCl₂; 0,01% желатин) (Силекс). Результаты амплификации оценивали в автоматическом ДНК – анализаторе ABI Prism 3730 используя стандарты длины фрагментов GeneScan-500 LIZ.

Фрагменты, полученные при ПЦР разделяли методом капиллярного гель-электрофореза в денатурирующих условиях на генетическом анализаторе 3730 DNA Analyzer (Perkin-Elmer), используя стандарты длины фрагментов GeneScan-500 LIZ. Анализ размера фрагментов и генотипирование проводили с помощью программного обеспечения GeneScan Analysis (Perkin-Elmer).

Таблица 10

Микросателлитные маркеры в локусе *DMPK*, использованные для анализа гаплотипа, и их хромосомная позиция на физической карте

Название маркера	Другое название	Хромосомная локализация на физической карте (сМ)	Диапазон длин аллелей, п.н.
D19S408	AFM238vg11	67,37	122-146
D19S903	AFMb039ye9	69,50	132-166
DMPK	DM	70,14	72-129
D19S219	AFM210yg9	70,14	160-190
D19S412	AFM284yg5	70,14	89-113
D19S606	AFMb030we1	72,72	172-190
D19S879	AFMa283yh1	75,41	217-265

2.4. Статистическая обработка результатов

Проверку распределения генотипов по исследованным полиморфным вариантам на соответствие равновесию Харди-Вайнберга (РХВ) проводили с помощью критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность:

$$\chi^2 = \sum \frac{(|N_{obs} - N_{exp}| - 0,5)^2}{N_{exp}},$$

где N_{obs} и N_{exp} – фактическая и ожидаемая численности генотипов.

При оценке соответствия распределения генотипов РХВ в полиалельных системах использовали точный тест Guo и Thomson (Guo & Thomson, 1992), реализованный в программе «Arlequin».

Ожидаемую гетерозиготность полиморфизмов рассчитывали по опубликованным методикам (Животовский, 1984).

$$H_{exp} = 1 - \sum p_i^2,$$

где p_i – частота i -го аллеля (Nei., 1975).

Относительное отклонение наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой рассчитывали по формуле:

$$D = \frac{(H_{obs} - H_{exp})}{H_{exp}},$$

где h_{obs} и h_{exp} – ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность соответственно.

Усреднённую теоретическую гетерозиготность по нескольким локусам определяли как:

$$\bar{H}_{exp} = \sum H_{exp} / L,$$

где L – число локусов.

Частоты гаплотипов в популяциях определялись с помощью EM-алгоритма. У пробандов, больных МД и их родственников гаплотипы также устанавливались на основе анализа сегрегации хромосом, несущих мутацию и нормальных хромосом в родословных.

LD между парами SNPs оценивалось с помощью коэффициента D' , предложенного Левонтином и коэффициента корреляции r^2 Пирсона. Блочная структура определялась посредством алгоритма «Solid spine LD» (Barret et al., 2005), с заданным порогом $D' \geq 0,75$.

Уровень генетического разнообразия (F_{st}) и межпопуляционной дифференциации (G_{st}) вычисляли методом анализа молекулярной вариабельности (AMOVA). Генетическое расстояние между популяциями рассчитывали по методу Нея (Nei, 1987). Филогенетическое древо популяций строили с помощью алгоритма объединения «ближайших соседей» (neighbor joining) (Nei, 1987), реализованного в пакете программ PHYLIP (Felsenstein, 1992). Различия двух сравниваемых величин считали достоверным при достижении уровня значимости $P < 0,05$.

Филогенетический анализ взаимоотношений гаплотипов выстроенных на основе однонуклеотидных полиморфизмов, определяемых по диаллельным маркерам, проводили, конструируя филогенетические деревья (сети)

гаплотипов по алгоритму медианных сетей (Bandelt et al., 1995; 1999), реализованному в программе Network.

Для анализа ассоциации маркеров исследуемых полиморфизмом с МД, сравнивали частоты аллелей и генотипов в группах больных и здоровых индивидов, используя критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность, а также с применением двустороннего точного критерия Фишера. Об ассоциации разных генотипов (или их комбинаций) с заболеваниями судили по величине отношения шансов (odds ratio (OR) и относительного риска заболевания (RR)) с доверительным интервалом (CI) (95% CI) (Pearce, 1993) Отношения шансов (odds ratio (OR) - величина, показывающая, во сколько раз выше вероятность заболеть для индивида с определенным генотипом (или комбинацией генотипов): RR - отношение риска наступления заболевания у лиц с фактором риска (с данным случае, несущих мутантную хромосому) по отношению к контрольной группе

$$OR = (A/B)/(C/D),$$

$$RR = (A/(A+B))/(C/(C+D)),$$

где А – число (процент) людей с данным генотипом (комбинацией генотипов) в группе больных;

С – число (процент) людей с данным генотипом (комбинацией генотипов) в группе здоровых;

В – число (процент) индивидов, не имеющих данного генотипа (комбинации генотипов) в группе больных;

D - число (процент) индивидов, не имеющих данного генотипа (комбинации генотипов) в группе здоровых.

Значения OR и RR >1 указывают на возможную положительную ассоциацию с заболеванием. Обсуждение величин OR и RR проводили при уровне значимости не более 5%

Оценка возраста мутации

При определении возраста мутации вначале была проанализирована степень неравновесия по сцеплению по формуле предложенная Bengtsson и Thomson (1981):

$$\delta = (P_D - P_N) / (1 - P_N),$$

где δ – мера неравновесности сцепления, P_D и P_N – частоты аллеля на хромосомах, несущих мутацию, и на нормальных хромосомах, соответственно с доверительным интервалом (Diaz et al., 2000).

Для расчета возраста мутации использовался подход «генетических часов» (Labuda et al, 1997), оценивающий количество поколений g с момента появления мутации в популяции до настоящего времени, исходя из изменения неравновесия по сцеплению полиморфных маркеров с локусом заболевания за этот период времени (Risch et al, 1995). Если считать, что размывание неравновесия по сцеплению происходило исключительно в результате рекомбинационных событий. То $\delta_0 = (1 - \theta)^g \delta_g$, где δ_g – значение неравновесия по сцеплению в g -том поколении. Поскольку $\delta_0 = 1$,

$$g = \frac{\lg \delta_g}{\lg(1 - \theta)} \quad \text{или} \quad g = \frac{\lg(1 - Q / (1 - P_n))}{\lg(1 - \theta)}$$

где g – число поколений со времени возникновения мутации; Q – доля мутантных хромосом без аллеля гаплотипа основателя; P_N – частота аллеля основателя в популяции; θ – рекомбинационная фракция. Данный алгоритм для расчета возраста мутации впервые описан и применен Risch (Risch et al, 1995).

Возраст мутации вычислялся по формуле $a = g \times c$, где a – возраст мутации, c – средняя продолжительность одного поколения.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакетов статистических программ «Office Microsoft Excel 2007», «Statistica 8.0», «Arlequin», «Haplowiew 4.1», «Network» и пакета программ «PHYLIP». Различия двух сравниваемых величин считалось достоверным при достижении уровня значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА III

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Популяционно-генетический анализ варибельности SNP и СТГ-повторов в гене *DMPK* в популяциях Северной Евразии.

3.1.1. Генетическая варибельность однонуклеотидных полиморфных вариантов в гене *DMPK* в шести популяциях Северной Евразии.

Частоты аллелей, характеристика гетерозиготности и соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга по шести однонуклеотидным полиморфным вариантам гена *DMPK* (rs2070736, rs572634, rs1799894, rs527221, rs915915 и rs10415988) в исследованных популяционных группах представлены в табл. 12. По всем маркерам во всех популяциях распределение генотипов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

При сравнении частот аллелей и генотипов между изученными группами для полиморфного локуса rs2070736 выявлено наименьшее значение частоты минорного аллеля (15%) у кетов и наибольшее (37,3%) - у якутов. По полиморфному локусу rs572634 минимальное значение наблюдается у якутов (9,6%), максимальное - у кетов (36%). По локусу rs1799894 наименьшая частота минорного аллеля выявлена в популяционной выборке якутов (12,1%), наибольшая (45,9%) - в популяции хантов. Разброс аллельных частот по локусу rs527221 выглядел следующим образом: невысокие частоты наблюдались в популяциях бурятов и хантов (3,5% и 7,1% соответственно), а наибольшая частота зафиксирована в популяции кетов (38%). Для rs915915 наибольшее значение (46%) - у кетов. По rs10415988 минимальная частота минорного аллеля (13,2%) характерна для якутов, а у хантов она достигла максимального значения для всех наблюдаемых групп (47,4%).

Таблица 12

Частоты аллелей, гетерозиготность и соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга в популяциях Северной Евразии

Исследуемые группы	SNP в гене DMPK	Частота минорного аллеля	Наблюдаемая гетерозиготность (H_0)	Ожидаемая гетерозиготность (H_e)	Отклонение Х-В (значение χ^2)
Якуты (N=228)	rs2070736	0,373	0.513	0.470	0,447
	rs572634	0,096	0.107	0.127	0,996
	rs1799894	0,121	0.195	0.218	0,096
	rs527221	0,171	0.272	0.284	0,031
	rs915915	0,232	0.382	0.367	0,204
	rs10415988	0,132	0.212	0.231	0,722
Буряты (N=100)	rs2070736	0,355	0,410	0,458	0,377
	rs572634	0,153	0,204	0,259	0,080
	rs1799894	0,278	0,414	0,401	0,998
	rs527221	0,035	0,070	0,068	1,000
	rs915915	0,283	0,343	0,406	0,185
	rs10415988	0,245	0,410	0,370	0,450
Киргизы (N=100)	rs2070736	0,337	0,388	0,447	0,257
	rs572634	0,180	0,237	0,296	0,106
	rs1799894	0,347	0,490	0,453	0,601
	rs527221	0,174	0,284	0,287	1,000
	rs915915	0,335	0,402	0,446	0,429
	rs10415988	0,308	0,434	0,426	1,000
Русские (N=100)	rs2070736	0,240	0,420	0,365	0,226
	rs572634	0,137	0,232	0,236	1,000
	rs1799894	0,449	0,535	0,495	0,575
	rs527221	0,143	0,245	0,245	1,000
	rs915915	0,336	0,402	0,464	0,249
	rs10415988	0,435	0,490	0,492	1,000
Ханты (N=100)	rs2070736	0,311	0,337	0,429	0,054
	rs572634	0,107	0,153	0,191	0,147
	rs1799894	0,459	0,469	0,497	0,695
	rs527221	0,071	0,121	0,131	0,779
	rs915915	0,402	0,392	0,481	0,095
	rs10415988	0,474	0,392	0,499	0,049
Кеты (N=50)	rs2070736	0,150	0,240	0,255	0,013
	rs572634	0,360	0,480	0,461	1,000
	rs1799894	0,330	0,420	0,442	0,904
	rs527221	0,380	0,520	0,471	0,721
	rs915915	0,460	0,460	0,497	1,721
	rs10415988	0,320	0,440	0,435	1,000

Анализ распределения частот аллелей в большинстве исследованных локусов продемонстрировал, в определённой степени, близость изученных

популяций к азиатским, нежели к европейским и африканским (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Так, частота аллеля С в локусе rs10415988 в европейских и африканских популяциях составляет 50-60%, тогда как в азиатских - от 20 до 50%. В исследованных нами группах частота аллелей по этому локусу колеблется от 13 до 47%. По локусу rs527221 разброс частот сравним с мировыми и среди мировых различия между различными этническими группами минимальное (на уровне 5-15%). По локусу rs572634 наиболее высокая частота минорного аллеля наблюдались в популяции кетов (36%) тогда как в остальных изученных популяциях она не превышала 18%. В популяциях, изученных в международном проекте HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) азиатские популяции по этому локусу демонстрировали частоту от 3 до 30%, африканские – в районе 6%, а европейские – от 8 до 12%. В локусе rs1799894 разброс частоты минорного аллеля в наших популяциях был от 12 до 46%. Причем, наиболее высокие значения представлены в популяциях русских (45%) и хантов (46%). Мировые популяции по этому SNP изучены крайне мало (частота минорного аллеля колеблется, по литературным данным, от 7 до 40%) (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Локус rs915915 продемонстрировал незначительный разброс частот минорного аллеля в изученных популяциях – от 23 до 46%. Частота этого аллеля в немногих изученных мировых популяциях колеблется от 20 до 53% что сравнимо с результатами, полученными в нашем исследовании.

При попарном сравнении изученных популяций по частотам исследованных локусов, значимые различия были зафиксированы между популяциями кетов и бурят (по всем шести исследованным локусам), кетов и хантов, бурят и русских (по четырём локусам). Выявляется обособленность кетов, которая, возможно, объясняется малой численностью выборки и высокой частотой близкородственных браков. В таблице 12 представлена также оценка наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности. По наблюдаемой гетерозиготности можно судить о мере генетической изменчивости в популяции. Значительного недостатка или избытка гетерозигот по большинству

локусов в нашем исследовании не зафиксировано (табл.3 Приложения). Наибольший показатель наблюдаемой гетерозиготности обнаружен по локусу rs1799894 в популяционной группе русских (0,535) и наименьший – по локусу rs527221 в группе бурят (0,07). Два из шести исследованных генетических маркеров - rs1799894 и rs10415988 характеризуются очень высоким уровнем теоретически ожидаемой гетерозиготности (от 0,489 до 0,499), что при диаллельном полиморфизме, анализируемом в нашем исследовании, является показателем сильного разнообразия в популяции, близкого к максимальному (0,5). Самый высокий уровень средней ожидаемой гетерозиготности по совокупности шести исследованных генетических маркеров наблюдался в популяции кетов ($H_e=0,427$), а самый низкий – в якутской популяции ($H_e=0,283$). Низкий уровень генетического разнообразия внутри якутского этноса неоднократно показанный разными авторами на разных маркерных системах (мтДНК, У-хромосома, полиморфизм СТГ -повторов в гене *DMPK*) в популяциях Якутии характерен для изолированных этнических групп (Попова и др., 2002; Пузырёв и др., 2001; Pakendorf at al., 2006; Федорова и др., 2005; Харьков и др., 2008), происходящих от небольшого количества предков, что может свидетельствовать о наличии эффекта основателя.

При анализе наблюдаемой гетерозиготности в каждом из изученных локусов, отмечены некоторые особенности. Так, по полиморфному локусу rs527221 самое высокое значение (0,52) было зафиксировано в популяции кетов, а самое низкое (0,07) – в бурятской популяции. Для локуса rs915915 наблюдаемые показатели гетерозиготности оказались близкими во всех популяциях (от 0,343 до 0,46). По полиморфному варианту rs10415988 минимум наблюдаемой гетерозиготности (0,212) зафиксирован в популяционной группе якутов, а максимум – в популяции русских (0,49). По полиморфизму rs2070736 разброс показателя зафиксирован в диапазоне от 0,24 у кетов до 0,513 у якутов. Минимальную наблюдаемую гетерозиготность по локусам rs1799894 и rs572634 продемонстрировала якутская популяция (0,195 и 0,107 соответственно), а максимальную – популяции русских (0,535) и

кетов (0,48). Таким образом, якутская популяция продемонстрировала наименьшую наблюдаемую гетерозиготность по трём из шести исследованным локусам (rs572634, rs1799894 и rs10415988).

Резюмируя особенности вариабельности исследованных SNP в изученных популяционных группах можно отметить, что распределение генотипов во всех популяционных выборках соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга. Анализ распределения частот аллелей в исследованных локусах продемонстрировал близость изученных популяций к азиатским, нежели к европейским и африканским. При попарном сравнении изученных популяций по частотам исследованных локусов, значимые различия по шести исследованным локусам зафиксированы между популяциями кетов и бурят. Самый высокий уровень средней теоретически ожидаемой гетерозиготности по совокупности шести исследованных генетических маркеров наблюдался в популяции кетов (0,43), а самый низкий – в якутской популяции (0,28). При анализе уровня наблюдаемой гетерозиготности максимальное значение было зафиксировано в популяции кетов (0,52) по локусу rs527221, а минимальное – в популяции бурят (0,07) по этому же локусу.

В исследовании популяционных выборок по гену *DMPK* были проанализированы генетические взаимоотношения между всеми изученными популяциями. Количественный показатель подразделённости популяций (F_{st}) определяли среди двух территориальных групп якутов (центральный и вилюйский районы) и шести популяций Северной Евразии (якуты, кеты, русские, киргизы, буряты, ханты). Значение генетической дифференциации популяций по совокупности всех исследуемых SNP-локусов для всех изученных популяционных выборок составило 11,83%. Этот показатель оказался на порядок выше, чем для двух якутских популяций (0,79%), что демонстрирует неоднородность населения популяций Северной Евразии по сравнению с популяциями, проживающими на территории республики Саха.

В работе была показана степень генетической близости между двумя якутскими популяциями, а также между всеми изученными популяциями

Северной Евразии по частотам генотипов исследованных шести SNP-вариантов гена *DMPK*. Для построения дендрограммы генетических расстояний использовали массив данных, в который вошли популяции бурят, киргизов, хантов, кетов и русских, а также две якутские популяции, разделенные по районам проживания: центральные и вилюйские. На рисунке 8 приведена консенсусная дендрограмма, наглядно демонстрирующая генетическую близость якутских выборок и взаимное расположение пяти других исследованных популяций Северной Евразии.

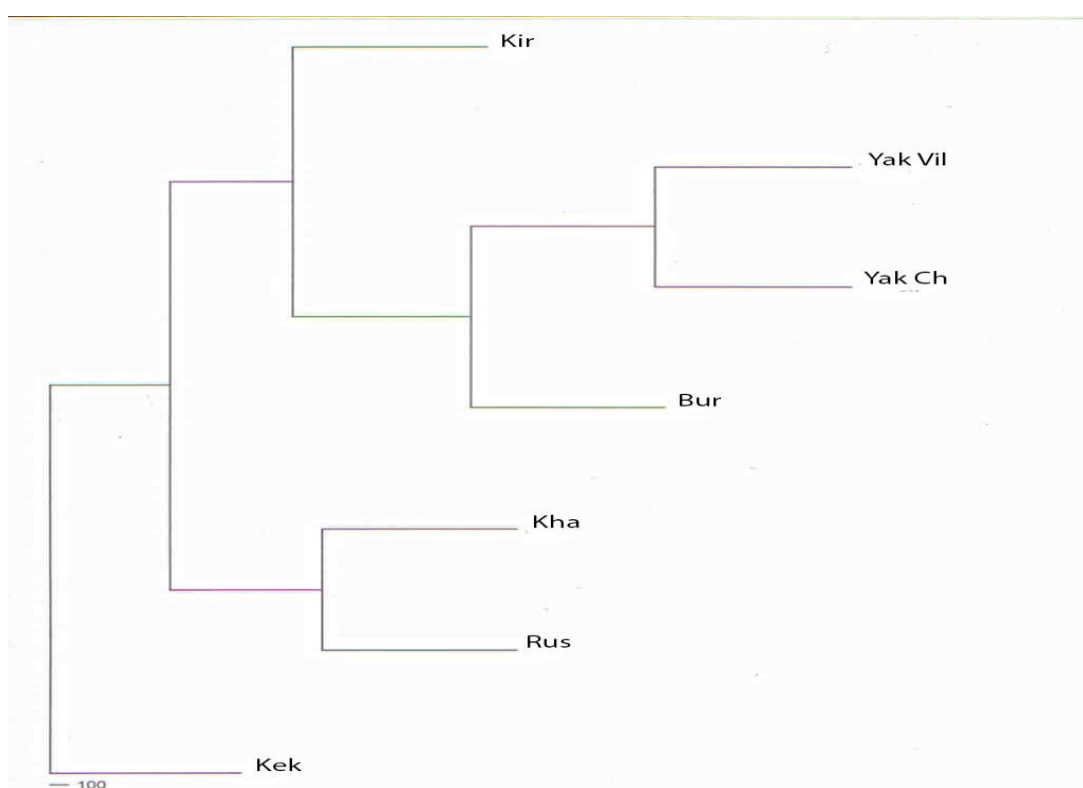


Рис.8. Дендрограмма генетических взаимоотношений между популяциями Северной Евразии по исследованным SNP-маркерам (Kir – киргизы, Yak Vil – якуты вилюйского улуса, Yak Ch-якуты центрального улуса, Bur – буряты, Kha –ханты, Rus – русские, Kek – кеты)

3.1.2. Анализ вариабельности СТГ-повторов в гене *DMPK* в шести популяциях Северной Евразии.

В работе была проанализирована вариабельность СТГ-повторов в центромержной области гена *DMPK* в шести изученных популяционных выборках (якуты, кеты, русские, киргизы, буряты, ханты). Частоты аллелей в шести исследованных популяциях по СТГ-повторам в гене *DMPK* представлены на рис.9. Практически во всех популяциях распределение частот генотипов соответствует равновесию Харди-Вайнберга (сдвиг равновесия наблюдается лишь в популяция кетов, что можно объяснить такими факторами популяционной динамики как дрейф генов или малой численностью выборки). Значения гетерозиготности по тринуклеотидным повторам во всех популяциях близки между собой (табл.4 Приложения).

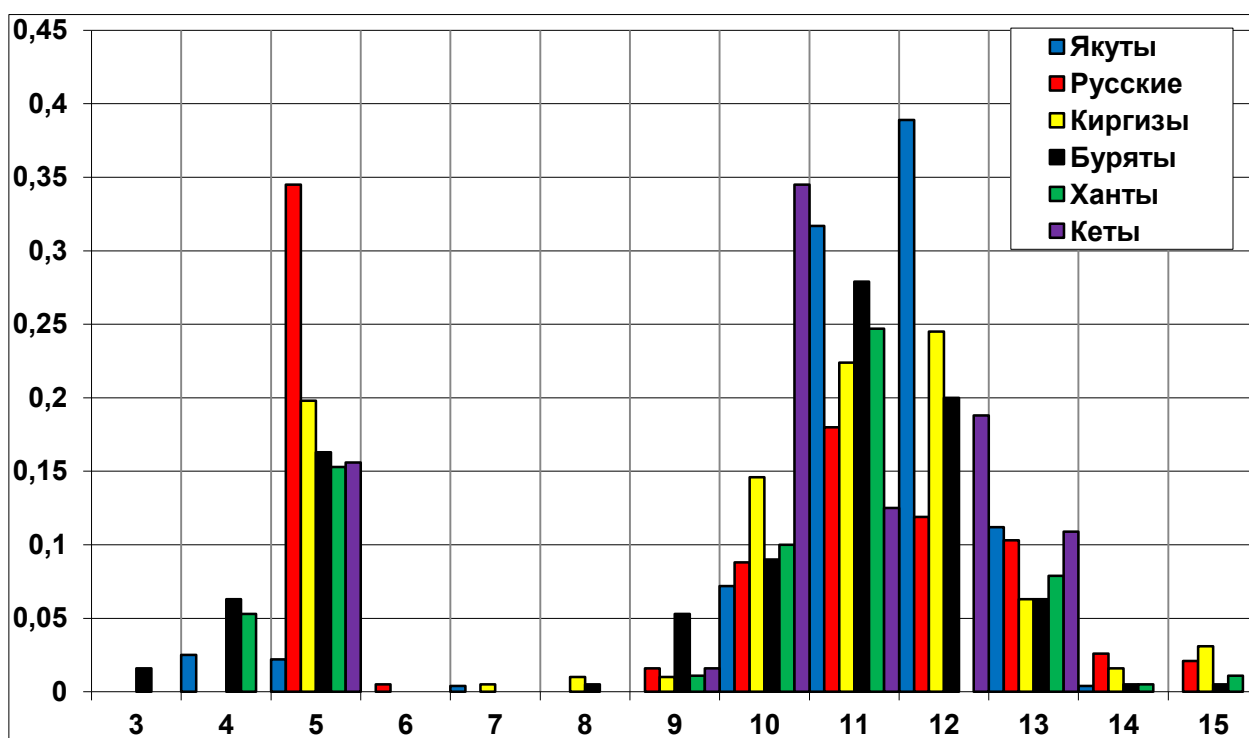


Рис.9. Частота СТГ - аллелей в гене *DMPK* в популяциях Северной Евразии

В шести популяциях нашего исследования было найдено от 8 до 17 аллельных вариантов локуса *DMPK*. Они содержат от 3 до 28 СТG-мотивов, что специфично для каждой группы. Очевидно, что во всех популяциях чаще всего наблюдались аллели, несущие 11,12 и 13 (у якутов, бурят, хантов, киргизов и кетов) и 5 (у русских) повторов, но частоты этих повторов для каждой популяции индивидуальны. Интересно, что аллель (СТG)₅ характерен для русской популяции (как единственной из шести, несущей в своём генофонде большую долю европеоидного компонента). Остальные пять популяций, являющиеся в большей степени монголоидными, характеризуются аллелями, несущими (СТG)₁₁₋₁₂, что хорошо согласуется с литературными данными, демонстрирующими близкие значения по частоте полиморфизма СТG-повторов в популяциях, имеющих различное этническое происхождение. Так, Поповой С.Н. и др. был показан ряд различий в спектрах аллельных частот изученных трёх генов (в том числе и *DMPK*) между разными популяциями (Pорова et al., 2002). У русских, как и в представленном исследовании, чаще всего наблюдался аллель (СТG)₅, у якутов - аллели (СТG)₁₁₋₁₂₋₁₃. Близкие значения наблюдаются в популяции бурят – это аллели с 13,12 и 5 повторами (по нашим данным – с 11,12 и 5). Как и в представленном исследовании, при увеличении доли монголоидного компонента повышается частота встречаемости аллелей (СТG)₁₁₋₁₂. Все шесть популяций продемонстрировали близкие значения уровня генетического разнообразия (H_e) - от 0,7321 у якутов до 0,8403 у хантов. Анализ уровня подразделённости изученных популяций по СТG-повторам зафиксировал значения генетической дифференциации F_{ST} и R_{st} равные 0,0334 и 0,0262 соответственно.

Популяция якутов выделяется из исследованных популяций в силу особенности распределения частот аллелей СТG-повторов, которое может быть охарактеризовано как унимодальное – аллели, содержащие от 11 до 14 повторов составляют 89%, тогда как этот локус в большинстве популяций мира имеет, как правило, бимодальное распределение. По литературным данным схожее по характеру распределение обнаружено в тибетской популяции и у

миштеков - коренных жителей Мексики (Magaña et al., 2011). Частота аллеля (CTG)₅, широко распространенного в европейских популяциях, у якутов составляет всего 3-5%.

Можно представить и ряд других работ отечественных и иностранных авторов, в которых также исследуются частоты тринуклеотидных повторов в гене *DMPK* в разных этнических группах. Так, в работе Culikovic и др. (2002) оценивалась частота заболеваемости МД и диапазон нормальных аллелей в здоровой югославской популяции. Было прогенотипировано 235 здоровых индивидов, найдено 22 аллеля, содержащих от 5 до 29 CTG –повторов, из которых наиболее часто встречались аллели (CTG)₅₋₁₁₋₁₂₋₁₃, что характерно для европеоидов и полностью подтверждается данными нашего исследования. В этой же работе наблюдалась относительно высокая частота «длинных» нормальных аллелей. Проведённое исследование женщин детородного возраста (N=2489) в Корейской популяции (J.-H.Jang et al., 2013) продемонстрировало высокую частоту аллелей, несущих 12 и 13 повторов (0.284 и 0.209 соответственно). Сухомясовой (Сухомясова, 2005) было показано, что структура CTG-повторов в популяции якутов свидетельствует об унимодальном распределении их количества. Результаты нашего сравнительного исследования на более обширной выборке, состоящей из нескольких популяционных групп, позволяют подтвердить это утверждение.

Кроме распределения CTG-повторов в изученных популяциях, в работе также было проанализировано неравновесие по сцеплению шести исследуемых однонуклеотидных полиморфизмов гена *DMPK* (rs2070736, rs572634, rs1799894, rs 527221, rs 915915) с вариабельностью тракта CTG – повторов в гене *DMPK* во всех исследуемых популяционных выборках. Было рассмотрено два варианта сцепления SNP и CTG в каждой популяции отдельно. Во-первых проанализированы возможное сцепление SNP с аллелями, содержащими повторы, встречающиеся с максимальной частотой. Как уже отмечалось выше, популяции различаются между собой по этому показателю (у якутов и киргизов с максимальной частотой встречается 12 повторов, у русских - 5, у бурят и

хантов- 11, у кетов-10). Во-вторых, было проанализировано сцепление исследуемых SNP с аллелями, содержащими повторы, встречающиеся с частотой менее 3%. Полученные в результате анализа блоки сцепления продемонстрированы на рисунке 10.

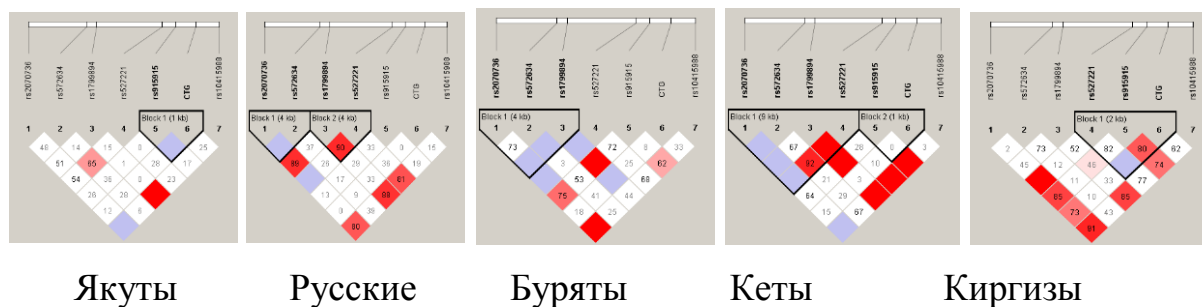


Рис.10. Блоки сцепления CTG-повторов с SNP в гене *DMPK*

Было выявлено, что в популяции кетов наблюдается продолжительный (9 kb) блок сцепления четырёх SNP (rs 2070736 и rs 572634, rs 1799894 и rs 527221 и короткий (1 kb) блок сцепления аллелей, содержащих 10 тринуклеотидных повторов (CTG₍₁₀₎), встречающихся с максимальной частотой (0.3437) с полиморфным вариантом rs 915915. В популяции киргизов наблюдали блок сцепления длиной 2 kb, включающий аллель, встречающийся с максимальной частотой (0.2448) и содержащий 12 CTG-повторов с двумя однонуклеотидными полиморфными вариантами rs 527221 и rs 915915. В якутской популяции наблюдался один непродолжительный блок сцепления (1kb) аллелей, содержащих тринуклеотидные повторы, встречающиеся с частотой менее 3% с полиморфным вариантом rs 915915. В русской популяции не наблюдалось статистически значимой ассоциации количества CTG-повторов с однонуклеотидными полиморфными вариантами в гене *DMPK*, но было выявлено два блока сцепления продолжительностью 8 kb, включающие четыре SNP (rs 2070736 и rs 572634, rs 1799894 и rs 527221). В популяции бурят также не найдена связь количества CTG-повторов и SNP, но наблюдается блок сцепления продолжительностью 4 kb, включающий rs

2070736 и rs 572634, rs 1799894. В популяции хантов блоков сцепления не обнаружено.

В литературе неоднократно встречаются исследования, демонстрирующие связь количества тринуклеотидных повторов с некоторыми SNP, расположенными в этом же гене. Так, в работе Малышевой и др. (1998) было изучено распределение CTG-повторов, а также проведён анализ гаплотипов по полиморфным сайтам *HhaI* и *HinfI* гена мышечной протеинкиназы у жителей Северо-Западного региона России и у больных миотонической дистрофией (Малышева, 2000). Практически все «мутантные» хромосомы имели один и тот же гаплотип по сайтам *HhaI*- и *HinfI*+. Этот же гаплотип был характерен практически для всех хромосом с 15 и более CTG триплетами. В статье Shojaaffar и др. (2008) сделана попытка проверить гипотезу возникновения патологических аллелей в гене *DMPK* из протяжённых нормальных аллелей (Shojaaffar et al., 2008). Исходя из этой гипотезы может существовать связь между распространённостью DM1 и частотой больших размеров нормальных аллелей. Для этого были оценены распределения нормальных аллелей, частоты больших нормальных аллелей и анализ трех биаллельных маркеров в здоровой иранской популяции (200 человек). Существенного нарушения равновесия связей между аллелями различной длины и тремя биаллельными маркерами (*Alu*, *HinfI* и *TaqI*) найдено не было. 23,7% аллелей содержало 5 повторов CTG и 7,2% аллелей имело более 18 повторов CTG. Анализ гаплотипов показал, что 75% аллелей (CTG)₅ и 80% аллелей, содержащих более 18 CTG повторов имели (+ + +) - гаплотип. Частоты SNP- аллелей с аллелями, содержащими более 18 CTG триплетов в иранской популяции схожи с таковыми в Западной Европе и Японии. В работе Basu и др. (2000) с целью выявления общих гаплотипов были изучены длины CTG-повторов и шесть диаллельных маркеров (которые были сцеплены с МД у европеоидов) у 30 пациентов, страдающих МД из восточной Индии. Результаты показали, что 90% экспансии CTG было связано с фоном *DraIII*(-) *HhaI*(-) *Alu*(+) *HinfI*(+) *Fnu4HI*(-) *TaqI*(-) (гаплотип I), аналогично тому, что было

опубликовано для европеоидов и других больных МД (Basu et al., 2000). Однако, у 10% больных с экспансией тринуклеотидных повторов наблюдался фон *DraIII*(+) *HhaI*(+)*Alu*(+)*HinfI*(-)*Fnu4HI*(+)*TaqI*(-) (гаплотип II), Распределение гаплотипов у 52 здоровых индивидов из восточной Индии показало, что соотношение гаплотипов 1:2 было как 23,1:7,7. Гаплотип 2 отсутствует у европеоидов и характерен для людей из восточной Индии. При изучении распределения CTG-повторов в гене *DMPK* у больных миотонической дистрофией и у здоровых лиц из мексиканского населения, 90% больных имели длинные аллели (Magaña et al., 2011). Генотипирование 400 здоровых испытуемых показало наличие 25 различных аллелей, содержащих от 5 до 34 повторов. Наиболее часто встречался аллель с 13 CTG- повторами (38,87%) и частота аллелей, содержащих более 18 CTG- повторов составила 6,7%. Cather и др. (1994) показали, что 99% нестабильных CTG – повторов находится в неравновесии по сцеплению с *Alu*- полиморфизмом, находящимся внутри гена *DMPK*, и это подтверждает, что МД является результатом одной или немногих наследственных мутаций (Cather et al., 1994).

В работе Tishkoff и др. (1998) были проанализированы гаплотипы, состоящие из CTG –повторов и нескольких маркеров, фланкирующих CTG-повторы (*Alu*, *HinfI*,*TaqI*) у здоровых людей из 25 человеческих популяций (5 африканских, 2 - с Ближнего Востока, 3 европейских, 6 - из Восточной Азии, 3 – с бассейна Тихого океана и Австралии и 6 индейцев) и пять видов приматов. Аллели 18-35 (больше нормальных) наблюдались только на северо-востоке Африки и демонстрировали сильное неравновесие по сцеплению с тремя маркерами, фланкирующими CTG-повторы. Найдена ассоциация между нормальными аллелями по CTG-повторами и двумя полиморфизмами (*HinfI* и *Alu*) в гене *DMPK* в популяции южных негроидов. Распределение CTG-повторов в этой популяции отличается от таковой у европеоидов и японцев – длина аллеля с CTG-повторами 19 и более встречаются очень редко (Tishkoff et al., 1998).

Следует отметить, что связь однонуклеотидных полиморфных вариантов с трактом повторов исследователи пытаются найти не только в гене *DMPK*. Так, при изучении МД 2-го типа среди итальянских больных, в гене *ZNF9* было продемонстрировано неравновесие по сцеплению между ССТG-трактом и однонуклеотидным полиморфизмом в первом интроне этого гена (Liquori et al., 2003).

Таким образом, в работе были охарактеризованы шесть популяций по спектру СТG-аллелей гена *DMPK*. Для каждой популяции зафиксировано соответствующее определённое количество СТG-повторов, встречающееся с максимальной частотой. В популяции якутов наблюдается унимодальное распределение - аллели (СТG)₁₁₋₁₄ составляют 89%. Охарактеризован уровень подразделённости F_{ST} и G_{st} популяций по СТG-повторам, равный соответственно 3,3% и 2,6%. Также было продемонстрировано неравновесие по сцеплению длины СТG-аллелей и шести однонуклеотидных полиморфных вариантов, расположенных в гене *DMPK*. Для каждой популяции характерно определённое количество триплетов (от 8 до 17) и определённые блоки сцепления SNP и СТG - повторов. Наиболее интересным представляется найденный в популяции киргизов блок сцепления длиной 2 kb, включающий аллель СТG₍₁₂₎, встречающиеся с максимальной частотой в этой популяции и двух SNP (rs 527221 и rs 915915).

3.2. Характеристика генетической variability локуса *DMPK* у больных миотонической дистрофией и в якутской популяции.

3.2.1. Анализ распределения частот SNP-аллелей и генотипов в локусе *DMPK* в якутских выборках.

Частоты аллелей, характеристика гетерозиготности и соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга по шести однонуклеотидным полиморфным вариантам гена *DMPK* (rs2070736, rs572634,

rs1799894, rs527221, rs915915 и rs10415988) в исследованных якутских представлены в табл. 11. Распределение генотипов в популяции якутов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Таблица 11

Частоты аллелей, гетерозиготность и соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга в якутских выборках

Исследуемые группы	SNP в гене DMPK	Частота минорного аллеля	Наблюдаемая гетерозиготность (H_0)	Ожидаемая гетерозиготность (H_e)	Отклонение Х-В (значение χ^2)
Больные МД (N=87)	rs2070736	0,276	0,526	0,400	-
	rs572634	0,195	0,107	0,169	-
	rs1799894	0,437	0,733	0,487	-
	rs527221	0,104	0,118	0,156	-
	rs915915	0,212	0,280	0,328	-
	rs10415988	0,448	0,776	0,493	-
Здоровые родственники (N=50)	rs2070736	0,350	0,348	0,309	-
	rs572634	0,169	0,126	0,111	-
	rs1799894	0,637	0,278	0,309	-
	rs527221	0,056	0,206	0,229	-
	rs915915	0,377	0,271	0,328	-
	rs10415988	0,703	0,406	0,387	-
Якуты (популяция) (N=228)	rs2070736	0,373	0,513	0,470	0,447
	rs572634	0,096	0,107	0,127	0,996
	rs1799894	0,121	0,195	0,218	0,096
	rs527221	0,171	0,272	0,284	0,031
	rs915915	0,232	0,382	0,367	0,204
	rs10415988	0,132	0,212	0,231	0,722

Наибольшие значения частоты минорного аллеля (70,3%) выявлены для полиморфного локуса rs10415988 у здоровых родственников. Минимальное значение по частоте минорного аллеля зафиксировано также в группе здоровых родственников по локусу rs527221 (5,6%).

Распределение аллелей и генотипов изученных полиморфных локусов гена *DMPK* у больных МД, здоровых родственников и в популяционной выборке якутов приведены в Приложении (таблицы 5-10). Аллель «Т» является предковым аллелем для полиморфного локуса rs2070736. Высокая частота этого аллеля наблюдалась у якутов, больных МД (72,4%). У здоровых

родственников частота этого аллеля была 65%, а в популяционной выборке – 61,9%. Генотип «ТТ» у больных якутов составил 43,7%, у здоровых родственников 34,9% и в популяционной выборке 32,8%. Относительный риск заболевания (RR) в паре (больные МД – здоровые родственники) был равен 1,17 (95% CI, p=0,17), а отношение шансов в паре (больные МД – популяция) (OR) равнялось 1,26 (95% CI, p=0,22). Значимых отличий в частотах аллелей и генотипов между группами не выявлено.

В полиморфном локусе rs572634 высокая частота (83,1%) предкового аллеля «Т» выявлена в группе здоровых родственников, ещё выше (90,4%) - в популяционной выборке якутов. Относительный риск заболевания (RR) был равен 1,3 (95% CI, p=0,16), а отношение шансов (OR) равнялось 1,7 (95% CI, p=0,22). Генотип «ТТ» у больных МД составил 83,9%, здоровых родственников 71,4% и в популяционной выборке 32,8%. Значимых отличий в частотах аллелей и генотипов между группами не выявлено.

В локусе rs1799894 частота аллеля «Т» составила 56,3% у больных МД, 45,2% - у здоровых родственников и 87,3% - в популяционной выборке. Выявлены значимые отличия по частоте аллеля «Т» между больными и популяционной выборкой. Относительный риск для больных МД и их здоровых родственников составил 1,32 (95% CI, p=0,07), а отношение шансов соответствовало 4,99 (95% CI, p=0,000). Генотип «ТТ» с наименьшей частотой (9,7%) наблюдали у здоровых родственников, а с наибольшей (19,8%) - у больных МД якутов.

Частоты предкового аллеля «С» полиморфного локуса rs527221 между больными МД (89,6%) и здоровыми родственниками (94,4%), а также между больными МД и популяционной выборкой якутов (82,9%) значимо не различались. Генотип «СС» наблюдали у больных МД с частотой 73,2%, у здоровых родственников – 79,4%, а в популяционной выборке 86,8%. Относительный риск заболевания RR был равен 1,17 (95% CI, p=0,45), а отношение шансов заболеть (OR) в популяционной выборке равнялись 1,61(95% CI, p=0,08).

В локусе rs915915 наблюдались статистически значимые отличия между больными МД (78,8%) и здоровыми родственниками (62,3%) ($\chi^2 = 13,17$, $P=0,02$), а также между больными и популяционной выборкой (76,8%) ($\chi^2 = 9,11$, $P=0,004$). Отношение шансов (OR), оценивавшееся среди больных МД и популяцией составило 2,59. Показатель RR составил 1,57.

В полиморфном локусе rs10415988 высокая частота (86,4%) предкового аллеля «С» выявлена в популяционной группе. У здоровых родственников она составила 29,7%, а у больных якутов – 55,2%. Относительный риск заболевания (RR) был равен 1,42 (95% CI, $p=0,06$), а отношение шансов (OR) равнялось 3,15 (95% CI, $p=0,01$). Генотип «СС» у больных МД составил 83,9%, здоровых родственников 71,4% и в популяционной выборке 32,8%. Зафиксированы значимые отличия в частотах аллелей между больными и популяционной группой (95% CI, $p=0,01$).

Наибольшее значение наблюдаемой гетерозиготности наблюдалось в группе больных якутов по локусам rs1799894 (0,733) и rs10415988 (0,776). В этой же группе отмечен случай недостатка гетерозигот по локусу rs5726340 (0,107).

Делая краткие выводы по распределению частот аллелей, генотипов и оценивая гетерозиготность, относительный риск заболевания и отношение шансов в изученных выборках, можно отметить следующее. Максимальная и минимальная частота минорного аллеля выявлены в группе здоровых родственников для полиморфного локуса rs10415988 ((70,3%) и для локуса rs527221 (5,6%). При сравнении больных МД с популяционной выборкой якутов значимо ассоциированными с МД локусами оказались rs1799894, rs915915 и rs10415988. Отношение шансов (OR) развития МД у представителей якутской популяции по этим локусам оказались довольно высоки и оценивались как 4,99 (95% CI, $p=0,000$), 2,59 (95% CI, $p=0,004$) и 3,15 (95% CI, $p=0,010$) соответственно.

3.2.2. Структура SNP-гаплотипов в гене *DMPK* в якутских выборках

В задачи исследования входил анализ выявленных гаплотипов по полиморфным однонуклеотидным сайтам гена *DMPK* в изученных выборках представителей якутского этноса. С помощью EM алгоритма в группе больных МД было выявлено 25 гаплотипов, встречающихся с частотой от 0,003 до 0,39 (таблица 11 Приложения). С частотой более 3% наблюдалось лишь три гаплотипа, два из которых - ТТТСТС и ГТССТТ - составили 58% от общего массива данных. С максимальной частотой (38,9%) у больных МД якутов был зафиксирован гаплотип ТТТСТС. При изучении семейных данных больных МД якутов путём анализа родословных были получены сходные результаты (таблица 12 Приложения). Сравнение результатов анализа гаплотипов, осуществленных с помощью двух подходов представлено в таблице 12.

Таблица 12

Частоты SNP-гаплотипов в популяции больных МД якутов, выявленные с помощью двух подходов

Гаплотип у больных МД	Частота гаплотипа, вычисленная с помощью EM алгоритма (%) (N=98)	Частота гаплотипа, вычисленная с помощью анализа семейных данных (%) (N=60)
ТТТСТС	38,9	40,0
ГТССТТ	19,3	18,3
ТТССГТ	5,5	4,2
ТТТСТТ	2,2	6,7
ТТССТС	3,1	5,0
ГТТССГТ	2,7	3,3
ГТССГТ	3,1	3,3

С помощью наблюдения в родословных сегрегации хромосом, несущих мутацию и нормальных хромосом было выявлено 19 гаплотипов в 24 семьях больных МД. Частоты основных гаплотипов не зависимо от способа анализа существенно не изменились. Оба подхода выявили два основных гаплотипа - ТТТСТС и ГТССТТ, характерных для больных МД якутов. Частоты

встречаемости основных гаплотипов среди больных МД якутов составили соответственно 40,0% и 18,3%. При этом, «мажорный» гаплотип ТТТСТС был выявлен на хромосоме с экспансией тринуклеотидных повторов в 54,2% случаев у больных МД, и в 63,3% случаев у пробандов, что ещё раз неоспоримо подтверждает значимость этого гаплотипа в развитии миотонической дистрофии у якутов.

В таблице 13 Приложения представлены 17 из 22 гаплотипов, обнаруженных у здоровых родственников и частоты этих гаплотипов. При сравнении общих гаплотипов у больных МД со здоровыми родственниками достоверных различий выявлено не было.

В популяционной выборке якутов было найдено 26 гаплотипов, частоты которых колебалась от 0,02 до 0,315 (Таблица 14 Приложения). С частотой более 3% было обнаружено 19 гаплотипов, но лишь два из них были основными: с частотой 27,5% зафиксирован гаплотип GTCCGT, и с частотой 31,5% наблюдался гаплотип TTCCGT.

В таблице 13 дана характеристика общих гаплотипов, обнаруженных у больных МД и в популяционной выборке якутов, а также результаты попарного сравнения частот этих гаплотипов. При сравнении группы больных МД и популяционной выборки якутов наблюдали шесть основных общих гаплотипов. По всем общим гаплотипам показаны статистически значимые отличия в частотах встречаемости между исследованными группами. Это гаплотипы ТТТСТС (OR=8,22, 95% CI 4,94–13,70), GTCCTT (OR=3,83, 95% CI 2,04–7,16), TTCCGT (OR=0,09, 95% CI 0,03–0,25), ТТТСТТ (OR=19,93, 95% CI 3,86–137,71), TGCCGT (OR=6,4, 95% CI 1,19–36,51) и GTCCGT (OR=0,09, 95% CI 0,03–0,26). Высокие показатели шанса развития заболевания (OR) были обнаружены для четырёх гаплотипов - «мажорного» гаплотипа ТТТСТС, а также для GTCCTT, ТТТСТТ и TGCCGT. При этом, гаплотип GTCCTT у больных МД был обнаружен с одинаковой частотой (18,3%) как на хромосоме, несущей мутацию, так и на нормальной. Гаплотип TTCCGT наблюдался в два раза чаще на мутантной хромосоме (с частотой 6,7%), чем на хромосоме с

нормальным числом СТG-повторов (с частотой 3,3%). Можно утверждать, что рисковым гаплотипом является лишь гаплотип ТТТСТС, располагающийся в 63,3% случаев на мутантной хромосоме (против 16,6% случаев на хромосоме без мутации) и демонстрирующий высокое значение отношения шансов (OR=8,22). Напротив, показатель отношения шансов оказался ниже нуля для гаплотипов ТТССГТ и GTССГТ, которые могут трактоваться в качестве протективных, учитывая и тот факт, что эти гаплотипы во всех наблюдаемых семьях были только на хромосоме, не несущей мутацию.

Таблица 13

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

Гаплотип	Частота гаплотипа (%)		χ^2	P	OR
	Больные МД (N=60)	Популяция (N=280)			
ТТТСТС*	40,0	7,5	88,09	0,000	8,22
GTССТТ*	18,3	5,5	20,78	0,000	3,83
ТТССГТ*	4,2	31,5	36,22	0,000	0,09
ТТТСТТ*	6,7	0,3	22,97	0,000	19,93
TGCCGT*	3,3	0,5	5,09	0,024	6,4
GTССГТ*	3,3	27,5	31,02	0,000	0,09

Примечание: *- частоты достоверно отличаются ($P \leq 0,05$)

Сравнение полученных гаплотипических данных с мировыми (Pan et al., 2001, Kwon et al., 2010, Nevilli et al., 1994, Yamagata et al., 1998) показывает, что мажорный гаплотип ТТТСТС наблюдается у больных МД в разных странах примерно с такой же частотой, как и в данном исследовании (табл. 14). Еще два гаплотипа (ТТССГТ и GTССГТ) встречались у больных МД разного этнического происхождения с различными частотами. Гаплотип GTССТТ, зафиксированный в нашем исследовании с высокой частотой 18,3%, был характерен только для больных якутов.

Таблица 14

Частоты гаплотипов по 6 SNP-локусам гена *DMPK* у больных МД

	Канада (Neville, 1994)	Япония (Yamagata, 1998)	Тайвань (Pan, 2001)	Корея (Kwon, 2010)	Якуты (данное исследование, 2014)
ТТТСТС	49%	30%	41%	41,4%	40,0%
ГТССТТ	-	-	-	-	18,3%
ТТССГТ	8%	53%	21%	19,7%	4,2%
ГТССГТ	27%	-	11%	20,4%	3,3%
ТТССГТ	-	4,8%	4%	6,6%	-

Таким образом, анализ гаплотипической структуры шести однонуклеотидных полиморфных вариантов гена *DMPK* у больных миотонической дистрофией из якутской популяции выявил структуру гаплотипов по шести SNP у больных МД. Показан с высокой частотой (40,0%) гаплотип ТТТСТС, ассоциированный с болезнью, а также гаплотипы ТТССГТ и ГТССГТ с большой вероятностью играющие протективную роль в отношении МД. Наряду с SNP-гаплотипами, являющимися общими для многих мировых популяций, выявлен встречающийся с высокой частотой уникальный для больных МД якутов гаплотип ГТССТТ.

3.2.3. Структура STR-гаплотипов в гене *DMPK* в якутских выборках

С целью дальнейшего изучения структуры локуса миотонинпротеинкиназы у якутов, был проведен анализ динуклеотидных микросателлитных маркеров, фланкирующих область тринуклеотидных СТG-повторов в гене *DMPK* в двух исследуемых группах (больные МД и популяционная выборка якутов). Физическая и генетическая локализация и генетические расстояния между соседними маркерами были взяты из

генетической базы данных Marshfield. В результате исследования было зафиксировано 14 аллельных вариантов, встречающихся с частотой от 0,005 до 0,655 (табл. 15). Число аллелей по каждому локусу варьировало от 4 до 12.

По локусу D19S908 в популяционной выборке и у больных МД наблюдали 6 аллелей, содержащие от 9 до 14 повторов. По локусу D19S903 в популяционной выборке наблюдали 9 аллелей, содержащие от 1 до 11 повторов, в выборке больных – 7 аллелей (от 1 до 10 повторов). По локусу D19S903 в популяционной выборке наблюдали 4 аллеля, содержащие от 4 до 8 повторов, в выборке больных – 7 аллелей (от 3 до 10 повторов).

При анализе STR-гаплотипов у больных МД с использованием EM-алгоритма было продемонстрировано 114 гаплотипов, частоты которых варьировали от 0,6 до 8,8 %. Подавляющее большинство гаплотипов (76%) наблюдались с частотой менее 0,7%. С максимальной частотой (8,8%) был зафиксирован гаплотип 8-3-6-9-1-2. С помощью наблюдения в родословных сегрегации хромосом, несущих мутацию и нормальных хромосом гаплотип 8-3-6-9-1-2 был выявлен в 11 семьях (45,8%) у 31,9% больных МД. Все STR-гаплотипы, выявленные при анализе семейных данных приведены в таблице 15 Приложения. Результаты гаплотипического анализа с использованием двух подходов позволили выявить один и тот же STR-гаплотип (8-3-6-9-1-2), встречающийся с максимальной частотой в группе больных миотинической дистрофией якутов.

В популяционной выборке наблюдали 123 STR-гаплотипа, встречающихся с частотой от 0,7 до 2,6%.

Для оценки неравновесия по сцеплению (6) между локусами было проведено исследование шести STR-маркеров на 160 хромосомах с мутацией и 154 хромосомах здоровых индивидов из той же якутской популяции. Наибольшие значения показателя неравновесия по сцеплению (6) были получены для маркеров, расположенных дистально по отношению к области СТG-повторов. Ослабление сцепления соответственно, наблюдалось по мере отдаления от области мутации (табл.16).

Таблица 15

Частоты STR-аллелей в локусе *DMPK*

Маркер	D19S408	D19S408	D19S903	D19S903	D19S219	D19S219	D19S412	D19S412	D19S606	D19S606	D19S879	D19S879
Аллель	Болън. MD (N=80)	Попу ляция (N=77)	Болън. MD (N=80)	Попу ляция (N=77)	Болън. MD (N=80)	Попу ляция (N=77)	Болън. MD (N=80)	Попу ляция (N=77)	Болън. MD (N=80)	Попу ляция (N=77)	Болън. MD (N=80)	Попу ляция (N=77)
1			0,062	0,092	0,022	0,01			0,655	0,521	0,178	0,432
2						0,005			0,012	0,021	0,42	0,089
3	0,139		0,427	0,109			0,104	0,279	0,226	0,25	0,098	0,417
4	0,017	0,030	0,011				0,049	0,1	0,065	0,128	0,247	0,031
5	0,206	0,351		0,011	0,017	0,068	0,104	0,158	0,012	0,059	0,052	0,026
6	0,322	0,435		0,016	0,644	0,214	0,033	0,011		0,005	0,006	0,005
7	0,039		0,320	0,413	0,061	0,333	0,049	0,042	0,006	0,005		
8	0,272	0,185	0,135	0,179	0,1	0,125	0,022	0,111	0,024	0,005		
9			0,028	0,103	0,039	0,068	0,637	0,268				
10	0,006		0,017	0,060	0,006	0,026		0,026				
11				0,106	0,067	0,052		0,005				
12					0,017	0,057						
13					0,028	0,031				0,005		
14						0,01						

Примечание: Б – больные, З – здоровые. Выделены значения аллелей, характеризующихся наибольшей неравновесностью сцепления с локусом MD в Якутии,

Показатель неравновесия по сцеплению между аллелями STR-гаплотипа основателя и области СТG-повторов

Аллель	Показатель неравновесия по сцеплению (б) (P(D)-P(N))/(1-P(N))
8	0,0605
3	0,1872
6	0,4930
9	0,4241
1	0,25
2	0,0871

Исходя из полученных результатов, наиболее вероятным предковым гаплотипом по маркерам D19S408, D19S903, D19S219, D19S412, D19S606, D19S879 является гаплотип 8-3-6-9-1-2. По гипотезе полного сцепления данных аллелей с областью мутации, сцепление исследуемых шести локусов с мутантной последовательностью в момент начала экспансии тринуклеотидных повторов было абсолютным. Выявленные гаплотипы хромосом приведены в табл. 17 и выделенная область представляет сохраненную часть гаплотипа основателя.

После выявления основных гаплотипов по SNP и STR-маркерам, были проанализированы совпадения STR-SNP-гаплотипов на мутантных хромосомах у больных МД якутов (Таблица 15 Приложения). В выборке больных МД якутов было обнаружено 10 полных SNP-гаплотипов, встречающихся с высокой частотой и мажорного STR-гаплотипа на мутантной хромосоме. При этом лишь семь вариантов представляли собой полное совпадение мажорного SNP-гаплотипа (TTTCTC) и мажорного STR-гаплотипа (8-3-6-9-1-2). В таблице 18 представлены эти гаплотипы.

Таблица 17

STR-гаплотипы хромосом, несущих мутацию экспансии CTG-повторов
в гене *DMPK*

№ семьи	№ больного	D19S408	D19S903	CTG	D19S219	D19S412	D19S606	D19S879
6	Bol 3434	8	3	m	6	9	1	2
8	Bol 647	8	3	m	6	9	1	2
20	Bol AA791	8	3	m	6	9	1	2
7	Bol 443	8	3	m	6	9	1	2
43	Bol A8840	8	3	m	6	9	1	2
5	Bol 3278	8	3	m	6	9	1	2
38	Bol AA5933	8	3	m	6	9	1	2
45	Bol AA7585	8	3	m	6	9	1	2
10	Bol 547	8	3	m	6	9	1	2
39	Bol AA4752	8	3	m	6	9	1	2
12	Bol AA2508	8	3	m	6	9	1	2
11	Bol 975	8	3	m	6	9	3	1
30	Bol 512	8	3	m	6	9	3	1
1	Bol AA1435	5	3	m	6	9	1	2
9	Bol 4034	5	3	m	6	9	1	2
44	Bol AA3402	6	7	m	6	9	1	4
14	Bol 1186	8	7	m	6	9	3	4
34	Bol 1090	8	7	m	6	9	3	4
28	Bol 420	8	7	m	6	9	3	4
3	Bol AA842	6	7	m	6	3	1	4
15	Bol 1372	6	7	m	6	3	1	4
23	Bol 301	6	7	m	6	3	1	4
4	Bol 2504	5	8	m	6	5	4	1

Примечание: выделенная область представляет сохраненную часть STR-гаплотипа основателя.

Таблица 18

STR-SNP-гаплотипы хромосом, несущих мутацию экспансии CTG-повторов в гене *DMPK*

№ семьи	№ больного	D19S408	D19S903	rs2070736	rs572634	rs1799894	rs527221	rs915915	rs10415988	CTG	D19S219	D19S412	D19S606	D19S879
6	Bol 3434	8	3	T	T	T	C	T	C	m	6	9	1	2
8	Bol 647	8	3	T	T	T	C	T	C	m	6	9	1	2
43	Bol AA8840	8	3	T	T	T	C	T	C	m	6	9	1	2
5	Bol 3278	8	3	T	T	T	C	T	C	m	6	9	1	2
45	Bol AA7585	8	3	T	T	T	C	T	C	m	6	9	1	2
10	Bol 547	8	3	T	T	T	C	T	C	m	6	9	1	2
39	Bol AA4752	8	3	T	T	T	C	T	C	m	6	9	1	2
1	Bol AA1435	5	3	T	T	T	C	T	C	m	6	9	1	2
23	Bol37 (301)	6	7	T	T	T	C	T	C	m	6	3	1	4
4	Bol 2504	5	8	T	T	T	C	T	C	m	6	5	4	1

Примечание: выделенная область представляет сохраненную часть гаплотипа основателя,

Семь полных STR-SNP-гаплотипов несут на хромосоме с экспансией CTG-повторов в гене *DMPK* гаплотип 8-3-T-T-T-C-T-C-6-9-1-2. Это составляет 30,4% от всех полных построенных гаплотипов на хромосоме с мутацией в выборке больных МД. Три гаплотипа демонстрируют не полную сохраненную область гаплотипа-основателя. Полиморфные SNP-варианты находятся значительно ближе к области CTG-повторов чем STR-локусы и, соответственно, меньше подверглись процессу рекомбинации. Поэтому, представляется более обоснованным определение возраста мутации при использовании STR-маркеров, составляющих гаплотип основателя 8-3-6-9-1-2, нежели SNP- маркеров.

3.3. Оценка возраста мутации в гене *DMPK* и популяционно-генетический механизм накопления МД в якутской популяции.

Для оценки возраста мутации в гене *DMPK* применялся один из подходов, основанных на понятии «генетические часы». Этот же подход применялся при расчёте возраста мутации при исследовании у евреев идиопатической торсионной дистонии (Labuda et al., 1997), аутосомно-рецессивного остеопороза (Близнец и др., 2006) и аутосомно-рецессивного эритроцитоза в Чувашии (Вассерман и др., 2007).

Полученные значения числа генераций показаны в табл. 19. Среднее значение числа поколений, прошедших после начала распространения мутации в гене *DMPK* составило 158 со стандартным отклонением 35,24.

Таблица 19

Расчёт возраста мутации

Локус	Аллель	$P(D)$	$P(N)$	$1-P(N)$	Q	$1-Q/(1-P(N))$	θ	$\log(1-\theta)$	g
D19S408	8	0,238	0,182	0,818	0,763	0,068	0,028	-0,012	94,66
D19S903	3	0,288	0,123	0,877	0,836	0,046	0,006	-0,003	510,13
D19S219	6	0,613	0,234	0,766	0,388	0,494	0,003	-0,001	250,83
D19S412	9	0,563	0,240	0,76	0,438	0,424	0,738	-0,582	0,64
D19S606	1	0,7	0,6	0,4	0,3	0,25	0,026	-0,011	52,62
D19S879	2	0,45	0,398	0,603	0,55	0,087	0,053	-0,024	44,82
									Ср.158,95±35,24

Примечание: P_D - частота ассоциированного аллеля среди хромосом с мутацией у больных якутов); P_N -частота ассоциированного аллеля среди хромосом без мутации в популяции якутов); Q – доля мутантных хромосом без аллеля гаплотипа основателя; θ –рекомбинационная фракция; g -число генераций, прошедших со времени возникновения мутации.

Исходя из того, что продолжительность одного поколения примерно 20 лет, время, за которое это произошло, составляет $3179 \pm 704,84$ лет. Период начала распространения мутации уходит, таким образом, вглубь веков и возникновение мутации связано с доэтническим периодом. Рассуждая о происхождении якутского этноса и о том, «откуда начинался» предковый гаплотип, необходимо подробно проследить историю происхождения предковых популяций, населявших район современной Республики Саха в доэтнический период. По мнению исследователей, около 5 тысяч лет назад на территории современной Якутии, а, вероятно, и за ее пределами, существовали несколько близкородственных племен. Наиболее вероятные кандидаты на эту роль – предки современных юкагиров и родственные им палеоазиатские племена. Какая группа древних людей дала начало мутации говорить очень сложно, поскольку данная мутация в других этносах практически не исследовалась.

Сибирский неолит совпадает с так называемым климатическим оптимумом голоцена. В неолитическое время природа Сибири полностью приобрела современный облик. В самых отдаленных сибирских регионах начала осваивается обработка камня (шлифовка, сверление) и впервые появилась керамика. Началось освоение водного транспорта, расцвела наскальная живопись (пример тому - дошедшая до наших дней Томская писаница). У полуоседлых охотников тундры и восточносибирской тайги в это время начинают формироваться экономически самостоятельные семьи и объединения нескольких семей численностью до 21-25 человек. Связанные общим происхождением и экзогамными обычаями, семейно-хозяйственные и родовые коллективы объединялись в племена - высшую социально-территориальную организацию неолита. Региональная периодизация прибайкальского неолита, разработанная А. П. Окладниковым, стала опорной для всей Восточной Сибири. В эпоху развитого неолита исаковская культура сменяется серовской. Сменившие серовцев носители китойской культуры (вторая половина III тысячелетия до н. э.) унаследовали от своих

предшественников приемы изготовления и крашения керамики, но несколько переориентировали свое хозяйство, что отразилось и в производственном инвентаре. Близкие к прибайкальцам по культуре и образу жизни племена обитали в Якутии, Байкальско-ленский этнокультурный ареал включал археологические культуры Прибайкалья, Якутии и крайнего северо-востока. Население Сибири тогда было еще очень редким. Отдельные племена были разделены необитаемой тайгой, тундрой и другими трудно проходимыми пространствами. Но, по сравнению с эпохой палеолита успехи неолитических людей в заселении пустынных ранее пространств были огромными. Неолитические поселения насчитываются не единицами и даже не десятками, а сотнями. Следы весьма древних поселений человека, владевшего луком и стрелами, шлифованным топором, умевшего изготавливать глиняную посуду, обнаруживаются по всей Северной Азии, в том числе вдоль арктических берегов Сибири: на Колыме, Индигирке, в Центральной Чукотке (стоянка на р. Якитикивееме) и у самого Таймырского полуострова. Гуще всего следы неолитических поселений рассеяны в тайге вдоль Ангары и Лены, вокруг Байкала, в районе Читы, в бассейне Амура и в Приморье. Вдоль Лены, Вилюя и Алдана жили полуоседлые рыболовы — охотники Центральной и Северо-Западной Якутии. В новых естественно-географических условиях постепенно наступил конец единообразию хозяйственного уклада, образа жизни и всей культуры древнейшего населения Сибири. Уже в серовское время Прибайкалье превратилось в один из влиятельных центров культуры в Северной и Восточной Азии. Влияние серовской культуры распространилось далеко на север — в Якутию, на запад — в бассейн Среднего Енисея, а также на восток — в Забайкалье. Оно было отмечено не только для районов тайги, но в определенное время выходило за ее границы и вторгалось в степные районы. Речь идет не о простом влиянии одного из первых в Сибири центров культуры эпохи неолита, но и о прямом расселении серовских племен за пределами таежного Прибайкалья. Одновременно, неолитические племена Прибайкалья вступали на территории Забайкалья в тесные контакты с аборигенным

населением Якутии и Приамурья. В результате возникла одна из самых любопытных «гибридных культур» эпохи неолита в Сибири, представленная находками в Шилкинской пещере. Люди, населявшие пещеру, а затем похоронившие здесь же своего умершего сородича, широко использовали в хозяйстве правильные ножевидные пластины, сколотые с конических нуклеусов. С Якутией их сближает керамика и такое специфическое орудие, как плечиковое тесло вилюйского типа.

Исследуя Y-хромосомы жителей Усть-Алдана, было обнаружено, что якутский генофонд довольно однороден. С этой точки зрения, якуты – потомки небольшой группы мигрантов-основателей. Якуты генетически очень близки к эвенкам, с которыми составляют обособленную группу. Ближе всех к этой группе буряты и чукчи. Другие тюркоязычные южносибирские этносы – алтайцы и тувинцы довольно сильно удалены от якутов. Но эти результаты не согласуются с результатами других исследователей, которые сравнивали сибирские этносы по последовательностям митохондриальной ДНК. В этом случае якуты оказываются близки и своим южным тюркоязычным соседям и другим центральноазиатским монголоидным популяциям. Вполне вероятно, что в конце I – начале II тысячелетия нашей эры на этих землях появились тунгусоязычные пришельцы, которые смешались в местным населением, что привело к формированию современных эвенов и эвенков. Позднее на эту же территорию вселились тюркоязычные мигранты, которые ассимилировали и эвенков, и протоюкагиров, внесших в Y-генофонд якутов львиную долю своих генов. Существование этой версии сейчас проверить трудно, ввиду малой численности юкагиров (сейчас их насчитывается около полутора тысяч человек).

Вместе с тем, существует предположение, что представление о якутах как об «отюреченных» юкагирах принципиально неверно. По данным анализа митохондриальной ДНК, геномных последовательностей и биохимических маркеров, как уже было замечено, у якутов много общего с южносибирскими и центральноазиатскими популяциями. Кроме того, значительные

антропологические различия между якутами, с одной стороны, и юкагирами и эвенками, с другой, наглядно свидетельствуют о значительном вкладе пришельцев в формирование якутского этноса. Существует также мнение о связи этногенеза саха с уральскими народами. Статьи об уральском компоненте в составе саха были написаны в свое время Ф.Ф.Васильевым и С.И.Николаевым (Васильев, 1995). В последнее время появились результаты генетических исследований, указывающие на присутствие уральского генотипа в составе саха (Николаев, 2004). Известный советский этнограф Л.Я.Штернберг (Штернберг, 1936) обратил внимание на близкое совпадение элементов материальной и духовной культуры саха и западных финнов, что позволяет предполагать непосредственное соседство в древности этих двух этнических групп. В финской мифологии, как и в якутской, орел высаживает яйца, из которого рождаются шаманы. Величайшее божество неба Укко носит название Аіја, что роднит его с якутским верховным божеством Урун Айыы тойон. К тому же он является родителем шаманов, и его называют дедом, как и якуты при обращении к орлу. К этим параллелям можно отнести своеобразную форму прикрепления тетивы в луке и полное совпадение деталей орнамента на берястяной обшивке лука у саха и у всех финских народов. Поэтому, можно сделать вывод, что многие элементы материальной и духовной культуры саха, связываемые с индоиранским влиянием могли появиться через посредство древних уральцев, непосредственно участвовавших в их этногенезе (Штернберг, 1936). Якутский этнограф Николаев С.И. известный как ярый сторонник аборигенного происхождения народа саха, особое внимание обращал на имеющиеся саха – самодийские параллели, считая саха отуреченными самодийцами (Николаев, 1995). Присутствие праюкагирского (т.е, уральского) фактора в ымыяхтахской культуре учитывается всеми исследователями. В населении бронзового века И.В.Константинов предполагал прямых предков современных юкагиров. Даже встречаются утверждения об уральской принадлежности племен раннего железного века Якутии (Константинов, 1975). Описываемое в якутском фольклоре жилище

автохтонных племен без окон, без дверей и без якутской печи, Ф.Ф.Васильев сравнивает с полуземляночными жилищами угро-самодийцев Севера, вход в которые предполагается через дымовое отверстие. Жилище северян называемые «холомо» он связывает с мансийским термином ма-кол “земляной дом” и селькупским названием полуземлянки со срубом «карамо» (Васильев, 1981). Ф.Ф.Васильев также относит к реликтам древнейших прауральских верований. Юкагирское женское погребение в лодке обнаруженное автором, он также сравнивает с такими погребениями среди ненцев и обских угров, сопоставляет название группы западнокангаласских саха маган с родом маган у лесных энцев. При рассмотрении наконечников стрел, Ф.Ф.Васильев подметил близость многих типов к селькупским и ненецким (Васильев, 1982). По якутскому фольклору родоначальники кобьяйских родов куокуй и тыайа легендарные Куокуйа и Тыайа происходили из воинственных майаатов. Майааты во главе Манан Мэкчэ обитали и при впадении реки Тукээн в Вилюй, т.е. в районе Верхневилуйского района (Николаев, 1995). Эвенкийский и якутский фольклор достаточно однозначно рисуют гибель маятов от голода и других причин. Предположение В.А.Туголукова о том, что часть ваяндов (маятов), живя среди якутов, объякутилась, получает подтверждение генеологической линией предков некоторых современных саха (Туголуков, 1985). Считается, что этноним ваянд (маят) произошел от эвенкийского ваянда - "пришедшие убивать". Ваянды (маяты) и нерумняли были единой этнографической группой смешанного тунгусо-самодийского происхождения. Они имели общее, объединяющее их имя Булэн, записанное русскими как "буляши". Буляши имели свой язык, употребляли в пищу сырое мясо и татуировали лицо, что характерно для самодийцев, а не для тунгусов. Этноним буляши представляет собой русскую транскрипцию эвенкийского термина булэсэл//булэшэл - "враги", от булэн - "враг" (Туголуков, 1979). Этим термином эвены обозначают именно юкагиров.

Крайне близкое совпадение комплекса культовых обрядов у якутов и финнов позволяет предполагать непосредственное в древности их соседство. К

изучению этногенеза саха в последнее время весьма активно стали привлекаться и генетические исследования. Так, линия N3 Y-хромосом обнаружена по всей территории Северной Евразии, в том числе во всех популяциях Якутии (якуты, эвенки, эвены, юкагиры, долганы), в Южной Сибири (буряты, тофалары, тувинцы), Монголии, на Чукотке (чукчи, эскимосы), Камчатке (коряки, ительмены), в регионе р.Амур (негидальцы, орононы, ульчи), в Западной Сибири (ханты, ненцы, энцы), у народов финно-угорской языковой группы (финны, эстонцы, саами, мари, мордва) и славян (русские, украинцы, словаки) (Харьков, 2008). Для того, чтобы проверить гипотезу о древней уралоязычной основе юкагиров на более высоком уровне разрешения, С.А.Федорова провела сравнение митохондриальных ГВСI-линий юкагиров с линиями популяций Западной Сибири. Хотя С.А.Федоровой не получено прямых доказательств непосредственных генетических связей юкагиров с уралоязычными этносами Западной Сибири, она полагает, что анализ дополнительных маркеров линий митохондриальных гаплогрупп C, D и Z1, а также гаплогруппы Q Y-хромосомы позволит в будущем найти более яркие свидетельства древних контактов юкагиров с уральцами (Федорова, 2008). Другой группой генетиков сходство структуры генофонда саха и эвенков объясняется общностью их происхождения из единой предковой популяции. Следовательно, эти популяции подверглись ассимиляции со стороны тунгусов, потом более поздних тюркоязычных мигрантов. Претендентами на роль популяции донора, очевидно, являются юкагиры, точнее праюкагиры и родственными им палеоазиатские племена, проживавшие на территории Якутии (Туголуков, 1979). Ф.Ф.Васильев и А.И.Гоголев утверждают о двухкомпонентности влияния угро-самодийских этносов на тюркоязычных предков саха. Так, археологические культуры Южной Сибири и Прибайкалья имеют ощутимый вклад уральских традиций. К другому разряду сложности можно отнести вопрос о присутствии местного, центральноякутского автохтонного уральского этнического субстрата (Васильев, 1994).

Таким образом, доэтническая история современного населения Якутии остаётся дискуссионной. Разными авторами прослеживаются несколько возможных вариантов формирования структуры предкового генофонда якутов. Исследование произошедших в геноме за тысячелетия изменений и оценка давности событий, зафиксированных в нуклеотидных последовательностях изучаемого этноса, возможно, прольёт свет на этот вопрос.

На сегодняшний день известны несколько работ, в которых проводилась «оценка» возраста мутации при различных заболеваниях, распространенных в якутской популяции. По методу генетической археологии вычислен возраст распространения мутантного гена спиноцеребеллярной атаксии 1-го типа (SCA1) двумя исследователями. В работе В.Л. Осаковского, с использованием трех микросателлитных локусов, было показано, что сменилось 37 поколений после предка, внесшего мутацию, и возраст мутации составляет 915-1110 лет (Осаковский и др., 2004). Гурьев П.И. (Гурьев 2004), по литературным данным рассмотрел два случая неравновесного сцепления у якутов: между распределением HLA-антигенами, а также мутантным геном *SCA1*. По результатам было заключено, что при *SCA1* количество поколений, отделяющее нас от момента распространения мутации колеблется от 20 (500 лет) до 107(2675 лет) со средним случаем 60 (1500 лет). Появление основателя с гаплотипом *HLA-A\B17* в популяции якутов соответствует 70 поколениям (1750 лет) (Гурьев, 2004). Надо отметить, что результаты для *SCA1* были получены при использовании разных наборов микросателлитных маркеров в разных популяционных выборках.

Подсчитан возраст двух новых мутаций у якутов: 4582insT в гене *CUL7* и G5741→A в гене *NAG* равный 13,7 и 37,7 поколениями или 1645±248,25 и 1052±640,25 год, соответственно (Максимова, 2009).

Наиболее вероятный «возраст» начала экспансии гаплотипа основателя с мутацией q. – 3179(INS1+1G>A) в гене *CJB2*, приводящий к нейросенсорной несиндромальной тугоухости в популяции якутов, составил 800 лет (Барашков,

2010). Время распространения мутации с.806С>Т в гене *CYB5R3* при наследственной энзимопатической метгемоглобинемии в Якутии составило 285 ± 135 лет, период начала распространения мутации соответствует концу XVII – началу XVIII века ($1715 \text{ год} \pm 135 \text{ лет}$) (Галеева, 2013).

Все описанные данные можно объединить в два периода массового заселения предками якутов территории современной Якутии в XI - XII веках (Гоголев, 2000) на основе оценки возраста СЦА1, нейросенсорной тугоухости, SCOP синдрома, в XVII – XVIII веках – ЗМ синдрома и НЭМ. Все это подводит к мысли о том, что в этногенезе якутов приняли участие какие то древние отуреченные группы индоиранского происхождения. Возможно, ими были роды, связанные с пазыркцами Алтая. Физический тип последних отличался от окружающего их европейского населения более заметной монголоидной примесью. Кроме того, для сакской мифологии, оказавшей огромное воздействие на пазыркцев, характерны параллели в большей степени с ведийской (Алексеев, 1997).

Найденные единственные мутации в генах *ОФМД*, ЗМ-синдром и новый синдром низкорослости с колбочковой дисфункцией сетчатки, артофией зрительных нервов и пельгеровской аномалией лейкоцитов и выявленный «гаплотип основателя» в локусах генов *PABPN1*, *CUL7*, *NAG* по данным STR-локусов являются доказательством дрейфа генов и «гаплотипа основателя» в якутской популяции (Максимова, 2009). Низкий уровень генетического разнообразия в якутской популяции по сравнению другими популяциями Евразии показан на анализе линий митохондриальной ДНК (Федорова и др., 2003), Y-хромосомы (Пузырев и др., 2003, Харьков и др., 2008, Федорова, 2008). По составу линий митохондриальной ДНК популяции Якутии наиболее близки к популяциям Южной Сибири. Частота мажорной гаплогруппы N3 составляет от 71% в популяции северных якутов до 93% у вилюйских якутов. В целом, по обеим маркерным системам в пространстве главных компонент популяции Якутии и Южной Сибири занимают промежуточное положение между популяциями Западной Сибири и Дальнего Востока. Результаты

изучения спектра генетических маркеров в популяции якутов свидетельствуют о том, что у коренного населения Якутии существует незначительная подразделённость, высокий уровень изоляции, миграционный приток, ограниченный территорией Якутии, интенсивный рост популяции за счет высокой рождаемости (Пузырев, Максимова, 2008).

Таким образом, обобщая все изложенные исследования и факты, можно предположить, что основными факторами накопления наследственных заболеваний, в том числе и миотонической дистрофии, у якутов являются географическая изолированность, небольшая численность предковых популяций, высокая рождаемость (Федорова, 1999), и, как следствие этих процессов, дрейф генов, приведший к распространению «гаплотипа основателя».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наследственные болезни нервной системы (НБНС) в структуре наследственных заболеваний составляют значительную часть. Ведущее место в структуре генетической патологии в Республике Саха (Якутия) занимают именно такие НБНС, молекулярным механизмом развития которых является экспансии тринуклеотидных повторов. Выделено пять форм наследственной патологии, названных «якутскими» наследственными болезнями, имеющие высокую распространенность у якутов в сравнении с мировым народонаселением. Три из них относятся к заболеваниям нервной системы с динамическим типом наследования: спиноцеребеллярная атаксия I-го типа (Кузьмина, Коротов, 1994, Платонов, 2003, Брахфогель, 2000, Платонов, 2004), миотоническая дистрофия (Сухомясова, 2005), окулофарингеальная мышечная дистрофия (Максимова, 2009). МД занимает второе место по частоте распространения среди названных расстройств.

Настоящее исследование локуса *DMPK* в Северо-азиатских популяциях продемонстрировало генетические взаимоотношения между всеми изученными популяциями. Значение генетической дифференциации популяций по совокупности всех исследуемых SNP-локусов для северо-азиатских выборок составило 11,83 %, что оказалось на порядок выше, чем для двух якутских популяций (0,79%), что демонстрирует неоднородность населения популяций Северной Евразии по сравнению с популяциями, проживающими на территории республики Саха.

В работе были охарактеризованы шесть популяций Северной Евразии по спектру СТG – аллелей гена *DMPK*. Для каждой популяции зафиксировано соответствующее определенное количество СТG-повторов, встречающееся с максимальной частотой. В популяции якутов наблюдалось унимодальное распределение - 89% СТG – аллелей состояли из 11-14 триплетов. Был охарактеризован уровень подразделённости (F_{ST} и R_{st}) изученных популяций по СТG-повторам, равный соответственно 3,3% и 2,6%. Продемонстрировано

неравновесие по сцеплению длины СТG-аллелей и шести однонуклеотидных полиморфных вариантов, расположенных в гене *DMPK*.

В исследовании также дана характеристика генетической variability локуса *DMPK* у больных миотонической дистрофией и в якутской популяции. При сравнении больных МД с популяционной выборкой якутов по частотам аллелей, достоверно ассоциированными с МД локусами оказались rs1799894, rs915915 и rs10415988. Отношение шансов (OR) развития МД у представителей якутской популяции по этим локусам оказались довольно высоки и оценивались как 4,99 (95% CI, p=0,000), 2,59 (95% CI, p=0,004) и 3,15 (95% CI, p=0,010) соответственно. Наибольшее значение гетерозиготности наблюдалось в группе больных якутов по локусам rs1799894 (0,733) и rs10415988 (0,776). В этой же группе отмечен случай недостатка гетерозигот по локусу rs572634.

Анализ гаплотипической структуры шести однонуклеотидных полиморфных вариантов гена *DMPK* у больных миотонической дистрофией из якутской популяции выявил структуру гаплотипов по шести SNP у больных МД. С высокой частотой (40,0%) показан гаплотип ТТТСТС, ассоциированный с болезнью, а также гаплотипы ТТССГТ и GTССГТ с большой вероятностью играющие протективную роль в отношении МД. Наряду с SNP-гаплотипами, являющимися общими для многих мировых популяций, выявлен встречающийся с высокой частотой уникальный для больных МД якутов гаплотип GTССТТ.

Для выяснения вопроса о происхождении и структуре мутации в гене миотонинпротеинкиназы, было проанализировано шесть микросателлитных маркеров, фланкирующих область экспансии СТG-повторов в гене *DMPK*. В результате проведённого исследования, был выявлен гаплотип 8-3-6-9-1-2, встречающийся с наибольшей частотой, который рассматривался в дальнейшем в качестве гаплотипа основателя. После выявления основных гаплотипов по SNP и STR-маркерам, были проанализированы совпадения мажорных STR-SNP-гаплотипов на мутантных хромосомах у больных МД якутов. Было

показано семь полных STR-SNP-гаплотипов (8-3-T-T-T-C-T-C-6-9-1-2) на хромосоме с экспансией CTG-повторов в гене *DMPK*, что составило 30,4% от всех полных построенных гаплотипов на хромосоме с мутацией в выборке больных МД.

Применяя подход, основанный на понятии «генетические часы» был оценен возраст мутации в гене *DMPK*. Среднее значение числа поколений, прошедших после начала распространения мутации в гене *DMPK* составило $158 \pm 35,24$. Исходя из того, что продолжительность одного поколения примерно 20 лет, время, за которое произошло это событие, составляет $3179 \pm 704,84$ лет. Период начала распространения мутации уходит, таким образом, вглубь веков и возникновение мутации связано с доэтническим периодом формирования популяций. Анализ литературных данных позволяет сделать предположение, что мутация является очень древней и распространилась среди якутов прежде всего благодаря эффекту основателя.

ВЫВОДЫ

1. Оценка уровня генетической дифференциации якутских популяций демонстрирует однородность якутского этноса ($F_{st} = 0,79\%$) по сравнению с популяциями Северной Евразии ($F_{st} = 11,83\%$). Анализ изученных популяций по спектру СТГ-аллелей гена *DMPK* в большинстве случаев зафиксировал бимодальное распределение СТГ-повторов, встречающееся с максимальной частотой, тогда как в популяции якутов наблюдалось унимодальное распределение - аллели (СТГ)₁₁₋₁₄ составили 89%.

2. Анализ SNP-маркеров в локусе *DMPK* выявил два основных SNP-гаплотипа у больных МД. Первый из них (ТТТСТС), встречающийся с частотой 40%, является общим для якутов и всех ранее исследованных популяций. Второй гаплотип (GTCСТТ, 18,3 %) встречается только у якутов и не выявлен среди больных МД из других популяций. Данные гаплотипы также с высокой частотой обнаружены среди здоровых родственников больных (23,8% и 15,8%, соответственно), но очень редко встречаются в общей популяции якутов (7,5% и 5,5%, соответственно).

3. Анализ гаплотипов по STR-маркерам, фланкирующим область СТГ-повторов в гене *DMPK* у больных МД якутов было продемонстрировано 114 гаплотипов, частоты которых варьировали от 0,6 до 8,6%. В популяционной выборке наблюдали 123 гаплотипа с частотой от 0,7 до 2,6%. С максимальной частотой у больных был показан гаплотип 8-3-6-9-1-2, который был оценен как предковый.

4. Оценка возраста мутации МД у якутов и популяционно-генетических механизмов накопления заболевания показала, что мутация возникла $3179 \pm 704,84$ лет назад в доэтнический период и основным механизмом накопления МД в якутской популяции является эффект основателя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, А.Н. Древняя Якутия. Неолит и эпоха бронзы. Новосибирск: Изд-во Института археологии и этнографии СО РАН, 1996.а). - 143 с.
2. Алексеев, А.Н. Древняя Якутия. Железный век и эпоха средневековья. Новосибирск: Изд-во Института археологии и этнографии СО РАН, 1996.б). 53-59 с.
3. Алексеенко, Е.А. Кеты. Историко-этнографические очерки. Л., 1967.
4. Алтухов, Ю.П. Популяционные системы и их структурные компоненты. Генетическая стабильность и изменчивость / Алтухов Ю.П., Рычков Ю.Г. // Журнал общей биологии – 1970.– Т. 31, - № 5. - С. 507-525.
5. Алтухов, Ю.П. Генетические процессы в популяциях / Ю.П. Алтухов. – М., Наука, 1989. - 328 с.
6. Ахмадеева, Л.Р. Миотоническая дистрофия в Республике Башкортостан // автореф. дисс. ...канд.мед.наук: 14.00.13 / Ахмадеева Лейла Ринатовна. – Пермь, 1997. - 28с.
7. Банщикова, Е.С. Особенности клинического течения и морфофункциональное состояние эритроцитов у детей с наследственной энзимопенической метгемоглобинемией: автореф. дисс. ... канд. мед. наук: 03.0 / Банщикова Елена Семеновна.– Томск, 2002. - 25 с.
8. Барашков, Н.А. Молекулярно-генетическое изучение наследственной несиндромальной сенсоневральной глухоты в Республике Саха (Якутия): автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Барашков Николай Алексеевич.– Уфа, 2007. - 23с.
9. Барашков, Н.А. Реконструкция гаплотпа основателя с мутацией q.-3179(IVS1+1G>A) в гене GJB2, приводящей к аутосомно-рецессивной глухоте типа 1А в популяции якутов / Н.А. Барашков, С.А. Федорова, Л.У. Джемилева и др. // Медицинская генетика. - 2010. - №11. - С.21.
10. Бочков, Н.П. Клиническая генетика / Н.П. Бочков // М., ГЭОТАР-МЕД, 2004. - 480 с.

11. Блинец, Е.А. Популяционная частота и возраст мутации с.807+5G>A в гене TCIRGI, являющееся причиной аутосомно-рецессивного остеопороза в Чувашии / Е.А. Блинец, Р.А. Зинченко, С.М. Тверская и др. // Медицинская генетика. - 2006. - Т.5, - №9. - С. 9-14.
12. Боева, С.Б. Антропогенетическое обследование коренного населения Якутской АССР в связи с вопросами этногенеза якутов: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Боева С Б. – М.:МГУ, 1988. - 24 с.
13. Брагина, Д.Г. Этнические и этнокультурные процессы в Республике Саха (Якутия): 70-90 гг. XX века / Д.Г. Брагина. – Новосибирск: Наука, 2005. - 208 с.
14. Брахфогель, И.Ф. Молекулярно-генетическая характеристика спинномозжечковой атаксии I типа в Якутии: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Брахфогель Ирина Феликсовна. – Томск, 2000. - 24 с.
15. Васильев, Ф.Ф. Об этнонимах «кыргыз», «хоро» и «тумат»: к вопросу о ранней этнической истории якутов / Ф.Ф. Васильев // Сибирь в прошлом, настоящем и будущем. - Вып.3. Новосибирск, 1981.
16. Васильев, Ф.Ф. Южные предки якутов по материалам археологических раскопок (домонгольский период) / Ф.Ф. Васильев // Проблемы археологии и перспективы изучения древних культур Сибири и Дальнего Востока. Якутск, 1982.
17. Васильев, Ф.Ф. К вопросу об уральском компоненте в этнической культуре якутов / Ф.Ф. Васильев // Этнос: традиции и современность. Якутск, 1994. - С.16.
18. Васильева, Т.Н. Дистрофическая миотония (патогенез, ранняя и дифференциальная диагностика, лечение): Дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.13 / Васильева Татьяна Николаевна. – СПб., 1996. - 216 с.
19. Вассерман, Н.Н. «Возраст» мутации Arg200Trp в гене VHL, приводящей к развитию аутосомно-рецессивного эритроцитоза в Чувашии / Н.Н. Вассерман, Р.А. Зинченко, А.В. Поляков // Медицинская генетика. - 2007. - Т.6, - №9. - С.31-36.

20. Галеева, Н.М. Популяционная частота и возраст мутации с.806>Т в гене СУВ5R3, являющейся причиной наследственной метгемоглобинемии первого типа в Якутии / Н.М. Галеева, М.И. Воевода, М.Г. Спиридонова и др. // Генетика. - 2013. - Т.49 - №4. - С. 523-530.
21. Гинтер, Е.К. Популяционная генетика и медицина. / Е.К. Гинтер // Вестник РАМН.– 2001. - № 10. - С. 25-31.
22. Гинтер, Е.К. Медицинская генетика: Учебник / Е.К. Гинтер.– М.: Медицина, 2003.- 448 с.
23. Гинтер, Е.К. Перспективы развития медицинской генетики / Е.К. Гинтер // Медицинская генетика.– 2007. - Т.6, - №1(55). - С. 3-9.
24. Гинтер, Е.К. Наследственные болезни в российской популяции. / Е.К. Гинтер, Р.А. Зинченко // Вестник ВОГиС.– 2006. - Т.10, - № 1. - С. 106-125.
25. Гоголев, А.И.. Якуты: проблемы этногенеза и формирования культуры / А.И. Гоголев.– Якутск.: Нац.изд-во РС(Я), 1993. - С. 123-126, 136.
26. Гоголев, А.И. Историческая этнография якутов: Учебн. Пособие / А.И. Гоголев.– Якутск, - 2004.
27. Гоголев, А.И. История Якутии (Обзор исторических событий до начала XX в.) / А.И. Гоголев.– Якутск: Изд-во Якутского ун-та, 2000. - С. 201.
28. Горбунова, В.Н. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. / В.Н. Горбунова, Баранов В.С. // Спб.: «Специальная литература», 1997. - 287с.
29. Горбунова, В.Н. Молекулярная неврология. Ч.1. Заболевания нервно-мышечной системы / В.Н. Горбунова, Савельева-Васильева Е.А., Красильников В.В. // СПб.: «Интермедика», 2000. - 320 с.
30. Горбунова, В.Н. Молекулярная неврология. Ч.2. Заболевания координаторной, пирамидной и экстрапирамидной систем. Болезни экспансии / В.Н. Горбунова, Савельева-Васильева Е.А., Красильников В.В. // СПб.: «Интермедика», 2002. - 364с.
31. Гринио, Л.П. Миопатии. / Л. П. Гринио, Б.В. Агафонов. – М.: Медицина, 1997. 216 с.

32. Гурьев, И.П. К вопросу о происхождении якутов с точки зрения генетической археологии / И.П. Гурьев // Генетика. – 2004. -Т.40. - №4. С. 560-564.
33. Данилова, А.Л. Генетико-демографический анализ сельских популяций РС (Я) / Данилова А.Л., Кучер А.Н., Максимова Н.Р. и др. // Наука и образование.– 2005. - №2 (38). - С. 98-103.
34. Дульзон, А.П. Кетский язык / А.П. Дульзон– Томск, 1968.
35. Захарова, Ф.А. Клинико-биохимические особенности эритропоэза и наследственной энзимопенической метгемоглобинемии в Якутии: автореф. дисс. ... канд. мед. наук / Захарова Федора А.– М., 1982. - 16 с.
36. Зинченко, Р.А. Эпидемиология наследственных болезней в российских популяциях: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.15 / Зинченко Рена Абульфазовна.– М., 2001. - 45 с.
37. Иванов, В. Н. Якуты. (Народы и религии мира. Энциклопедия.) / В.Н. Иванов– М., 2000. - 665-667 с.
38. Иллариошкин, С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии / С.Н. Иллариошкин, И.А. Иванова - Смоленская, Е.Д. Маркова // М.: МИА, 2002. - 591 с.
39. Иллариошкин, С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование / С.Н. Иллариошкин // М.: Медицинское информационное агентство, 2004. - 207 с.
40. Коротов, М.Н. К вопросу о распространенности наследственных дегенеративных заболеваний нервной системы на территории Республики Саха / М.Н. Коротов, З.М. Кузьмина // Актуальные вопросы здоровья населения Республики Саха.– Якутск, 1994. С.132-134.
41. Коротов, М.Н. Миотоническая дистрофия в Республике Саха (Якутия) / М.Н. Коротов, З.М. Кузьмина // Материалы рос. съезда мед. генетиков – Курск, 2000. -Ч.1. - С. 31-32.
42. Константинов, И.В. Происхождение якутского народа и его культуры / И.В. Константинов // Якутия и ее соседи в древности (труды Приленской

- археологической экспедиции.– Якутск: Изд. ЯФСОАН СССР, 1975. - С. 138-140.
43. Константинов, И.В. Происхождение якутского народа и его культура / И.В. Константинов.– Якутск: ИГИ АН РС (Я), 2003. - 92 с.
44. Кляшторный, С.Г. Древнетюркская цивилизация: диахронические связи и синхронические аспекты / С.Г. Кляшторный // Советская тюркология. – 1987. - № 3. - С. 61.
45. Ксенофонов, Г.В. Ураанхай-сахалар. Очерки по древней истории якутов / Г.В. Ксенофонов. – В 2 кн.- Якутск: Национ. книжное изд. РС (Я), 1992. - 203-213 с.
46. Кучер, А.Н. Популяционная структура коренного и пришлого населения Сибирского региона /А.Н.Кучер // Медицинская генетика. – 2002. - Т.1. - №.6. - С. 262-270.
47. Кучер А.Н. Генетико-демографическое изучение народонаселения Республики Саха (Якутия) / А.Н. Кучер, А.Л. Данилова, Л.А. Конева и др. //Якутский медицинский журнал.– 2005. - №2. - С. 4-12.
48. Лобзин, В.С. Нервно-мышечные болезни / В.С. Лобзин, Л.А. Сайкова, А.Г. Шиман.– СПб.: Гиппократ, 1998. - 224 с.
49. Маак, Р.К. Вилюйский округ / Р.К. Маак.– 2-е изд.,–М.: «Яна», 1994. - 250 с.
50. Магжанов, Р.В. Клинико-генетический анализ наследственных заболеваний нервной системы в популяции Башкирской АССР: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.13 / Магжанов Рим Валеевич.– М., 1988. - 45с.
51. Малышева, О.В. Изучение аллельного полиморфизма и анализ гаплотипов гена мышечной протеинкиназы у жителей северо-западного региона России и у больных миотонической дистрофией / О.В. Малышева, Т.Э. Иващенко, Т.Н. Васильева и др. // Генетика.– 1998. - Т. 34. - № 2. - С. 295-299.
52. Малышева, О.В. Молекулярно-генетический анализ генов IT-15 и DMPK в популяциях и в семьях с миотонической дистрофией и хореей Гентингтона: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.15 / Малышева Ольга Викторовна – СПб., 2000. - 20 с.

53. Максимова, Н.Р. Клиническая характеристика 3-М синдрома у 43 якутских пациентов и подходы к ДНК-диагностике в Республике Саха (Якутии) / Н.Р. Максимова, А.Н. Ноговицына, И.А. Николаева и др. // Медицинская генетика. – 2007. - №12. - С. 35-38.
54. Максимова, Н.Р. Этноспецифические наследственные болезни у якутов / Н.Р. Максимова, В.П. Пузырев // «Здоровье детей на Севере»: Тез. межрегиональной науч.-практ. конф. - Якутск: ЯНЦ СО РАМН, 2008. - С. 91-94.
55. Максимова, Н.Р. Клинико-генеалогическая и молекулярно-генетическая характеристика этноспецифичных форм наследственной патологии у якутов: автореф. дисс. ...докт. мед. наук: 03.00.15 / Максимова Надежда Романовна. – Томск, 2009. - с.
56. Маркова, Е.Д., Распространенность наследственных заболеваний нервной системы в различных популяциях / Е.Д. Маркова, Р.В. Магжанов Р.В. // Журнал невропатологии и психиатрии. – 1990. - Т.90. - Вып. 9. - С.113-119.
57. Мамедова, Р.А. Медико - и популяционно-генетическое описание Архангельской области / Р.А. Мамедова, Г.И. Ельчинова, Е.А. Старцева Е.А. и др. // Генетика. – 1996. - Т.32. - №6. - С. 837-841.
58. Медицинские лабораторные технологии: Справочник / Под ред. А.И. Карпищенко. Т.2. – СПб.: Интермедика, 1999. - 604 с.
59. Молодин В.И. История и культура хантов / В.И. Молодин, Н.В. Лукина, В.М. Кулемзин и др. – Томск, 1995. - 161 с.
60. Мочанов, Ю.А. Древнейший палеолит Диринга (археологический возраст памятника) и проблемы внутропической прародины человечества / Ю.А. Мочанов. – Якутск: ЯФ СО АН СССР, 1988. - 35 с.
61. Миллер, Г.Ф. Описание сибирского царства и всех происшедших в нем дел от начала, а особливо от покорения его Российской державе по сии времена / Г.Ф. Миллер. – М.: Либерия, 1998. - Кн. 1. - 12-19 с.

62. Мутовин, Г.Р. Клиническая генетика. Геномика и протеомика наследственной патологии : учеб. пособие / Г.Р. Мутовин.– 3-е изд., перераб. и доп. 2010. - 832 с.
63. Мухаметова, Р.Р. Распространенность миотонической дистрофии в Республике Башкортостан / Р.Р. Мухаметова, Е.В. Сайфуллина // Сб. статей по материалам XII Российского конгресса молодых ученых с международным участием / под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича – Томск: СибГМУ.-2011. - С.104.
64. Назаренко, Л.П. Эпидемиология наследственных болезней и особенности медико-генетического консультирования / Л.П. Назаренко // Медицинская генетика.– 2004. - Т.3 - №3. - С. 133-138.
65. Назаренко, Л.П. Распространенность моногенных наследственных болезней среди сельского населения Республики Саха (Якутия) / Л.П. Назаренко, А.Н. Ноговицына, О.А. Салюкова, М.Н. Филимонова / Медико-генетическое исследование населения Республики Саха(Якутия): Сб. научн. труд. / Под ред. Пузырева В.П.– Якутск: Изд-во ЯФ СО РАН, 2002. - С.92-114.
66. Народы Западной Сибири: Ханты. Манси. Селькупы. Ненцы. Энцы. Нганасаны. Кеты / Отв. ред. И.Н. Гемуев. М.: Наука. 2005.- 805 с.
67. Наследственные болезни в популяциях человека / Под ред. Гинтера Е.К. – М.: Медицина, 2002.- 304 с.
68. Наследственные болезни нервной системы / Под ред. Ю.Е. Вельтищева. – М.: Медицина. 1998. - 496 с.
69. Народы России. Энциклопедия / гл. ред. В.А.Тишков. – М., Большая Российская энциклопедия. 1994. - 479 с.
70. Нимаев, Д.Д. Буряты: этногенез и этническая история / Д.Д. Нимаев. – Улан-Удэ: Издательско- полиграфический комплекс ВСГАКИ, 2000. - 190с.
71. Николаев, С.И.-Сомоготто. Происхождение народа саха / С.И. Николаев – Сомоготто.– Якутск: НИПК «Сахаполиграфиздат», 1995. - 112 с.

72. Николаев, В. С. Погребальные комплексы кочевников юга Средней Сибири в XII–XIV веках. Усть-Талькинская культура / В.С. Николаев. – Владивосток; Иркутск: Издательство института географии СО РАН, 2004.
73. Ноговицына, А.Н. Отягощенность населения Республики Саха (Якутия) наследственной патологией и анализ работы региональной медико-генетической консультации: автореф. дисс. ... канд. мед. наук: 03.00.15 / Ноговицына Анна Николаевна.– Томск, 2001. - 24 с.
74. Нестеров, Л.Н. Миотоническая дистрофия / Л.Н. Нестерева, Г.П. Сущева, С.Я. Вяткина, И.М. Нестерова // Журн. невропатол. и психиатр. , 1983. - №11. - Вып. 6. - С. 1636-1641.
75. Об итогах Всероссийской переписи населения 2010 года по Республике Саха (Якутия). Госкомстат РС (Я). Якутск, 2012. - 42 с.
76. Окладников, А.П. История и культура Бурятии / А.П. Окладников. – Улан-Удэ: Бурят. Кн. изд-во, 1976. - 458 с.
77. Окладников, А.П. Очерки из истории западных бурятмонголов / А.П. Окладников.– Л., 1937.
78. Осаковский, В.Л. Оценка возраста мутантной хромосомы по гену SCA1 в якутской популяции. / В.Л. Осаковский, А.Ю. Шатунов, Ф.А. Платонов, Л.Г. Гольдфарб // Якутский медицинский журнал.– 2004. - №2(6). - С.63.
79. Парникова, А.С. Расселение якутов в XVII-начале XX.вв. / А.С.Парникова. Якутск: Якутское книжное изд-во, 1971.- 140-144 с.
80. Перепелов, А.В. Эпидемиология и клинико-генетический анализ наследственных болезней нервной системы в популяциях Мордовии: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.15 / Перепелов Александр Васильевич.– М., 1997. - 16 с.
81. Платонов, Ф.А. Спиноцеребеллярная атаксия первого типа в Якутии: распространенность и клинико-генетические сопоставления / Ф.А. Платонов, С.Н. Иллариошкин, С.К. Кононова и др. // Медицинская генетика.– 2004. - Т.5. - С. 242-248.

82. Платонов, Ф.А. Наследственная мозжечковая атаксия в Якутии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.13 / Платонов Федор Алексеевич. – М., 2003. - 49 с.
83. Попова, С.Н.,. Анализ аллельного полиморфизма триплетных повторов (CTG)_n и (CAG)_n в генах DM, DRPLA и SCA1 в различных популяциях России / С.Н. Попова, П.А. Сломинский, С.Н. Галушкин и др. // Генетика. – 2002. Т- 38. - №11. - С.1549-1553.
84. Пузырев, В.П. Патологическая анатомия генома человека / В.П. Пузырев. В.А. Степанов.– Новосибирск, 1997. - 224 с.
85. Пузырев, В.П. Генетика мультифакториальных заболеваний: между прошлым и будущим / В.П. Пузырев // Медицинская генетика. – 2003. - Т.2 - № 12. - С. 498-508.
86. Пузырев, В.П. Генетико-эпидемиологическое исследование наследственной патологии в Западной Сибири / В.П. Пузырев, Л.П. Назаренко. – Томск: STT, 2000. - 187 с.
87. Пузырев, В.П.,. Линии мтДНК и Y-хромосомы в популяции якутов / В.П. Пузырев, В.А. Степанов, М.В. Голубенко и др. // Генетика. – 2003. - Т. 39. - № 7. С. - 975-981.
88. Серошевский, В.Л. Якуты. Опыт этнографического исследования / В.Л. Серошевский.– 2-е изд.,– М., 1993. - 197-199 с.
89. Сломинский, П.А. Нормальный полиморфизм повтора (CTG)_n в гене митонинпротеинкиназы (DM) на хромосоме 19q13.3 в популяциях восточной Европы / П.А. Сломинский, С.Н. Попова, М.И. Шадрина и др. // Генетика.– 2000. - Т. 36. - № 7. - С. 980-985.
90. Сломинский, П.А. Анализ экспансии триплетного (CTG)_n у больных миотонической дистрофией из Башкирии / П.А. Сломинский, С.Н. Попова, Р.И. Фатхлисламова и др. // Генетика.– 2000. -Т. 36. - №6. - С. 844 - 848.
91. Степанов, В.А. Этногеномика населения Северной Евразии / В.А. Степанов.– Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2002. - 244 с.

92. Сухомясова, А.Л. Аутосомно-доминантная миотоническая дистрофия в Республике Саха (Якутия): автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.15 / Сухомясова Айталипа Лукична.– Томск, 2005. - 22 с.
93. Тарская, Л.А. Структура и разнообразие наследственной патологии в Республике Саха (Якутия) /Л.А. Тарская, Р.А. Зинченко, Г.И. Ельчинова и др. // Генетика.– 2004. - Т. 40. - № 11. - С. 1530-1539.
94. Токарев, С.А. Происхождение якутской народности / С.А. Токарев // Краткие сообщения Института истории материальной культуры АН СССР.– 1941. - Вып.9. - С.229.
95. Токарев, С. А. К постановке проблем этногенеза / С.А. Токарев // Советская этнография.– 1949. - № 3. - С. 12-36.
96. Туголуков В.А. Кто вы, юкагиры? / В.А. Туголуков.– М.: Наука, 1979. - 152 с.
97. Тучков, А.Г. Народы сибиря: История и традиционная культура / А.Г. Тучков.– Томск. Изд.Ветер, 2008. - 115-123 с.
98. Фатхлисламова, Р.И. Молекулярно-генетическое изучение миотонической дистрофии в Башкортостане: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07 / Фатхлисламова Р.И.– Уфа, 1999. - 105 с.
99. Федорова, Е.Н. Население Якутии: прошлое и настоящее (геодемографическое исследование) / Е.Н. Федорова.– 2-е изд., испр. и доп., Новосибирск: Наука, 1999. - 207 с.
100. Федорова, С.А. Генетические портреты Республики Саха (Якутия): анализ линий митохондриальной ДНК и Y-хромосомы / С.А. Федоров /Отв.ред. М.И. Томский.– Якутск: Изд-во ЯНЦ СО РАН, 2008. - С. 235.
101. Федорова С.А. Полиморфизм (СТG)-повторов гена миотонинпротеинкиназы в популяциях Республики Саха(Якутия) и Средней Азии / С.А. Федорова, Р.И. Хусаинова, И.А. Кутуев и др. // Молекулярная биология.– 2005а). - Т.39. - №3. - С.385-393.

102. Федорова, С.А. Анализ линий митохондриальной ДНК в популяции якутов / С.А. Федорова, М.А. Бермишева, Р.И. Виллемс и др. // Молекулярная биология.– 2003. - Т. 37. - № 4. - С. 643-653.
103. Федорова, С.А. Аллельный полиморфизм гена миотонинпротеинкиназы в популяциях населения Республики Саха (Якутия) / С.А. Федорова, А.Л. Сухомясова, И.А. Николаева и др. // Наука и образование.– 2005(6). - Т.38. - № 2. - С. 59-65.
104. Фефелова, В.В. Изучение распределения антигенов системы HLA у коренных народностей Сибири как основа для анализа этногенеза популяций / В.В. Фефелова, Г.С. Высоцкая // Препринт ВЦ СО АН СССР. - № 12.- Красноярск, 1987. - С. 17.
105. Харьков, В.Н. Происхождение якутов: анализ гаплотипов Y-хромосомы / В.Н. Харьков, В.А. Степанов, О.В. Медведев и др. // Молекулярная биология.– 2008. - Т. 42. - №2. - С. 226-237.
106. Харпер, П.С. Практическое медико-генетическое консультирование / П.С. Харпер // Пер. с англ. М.: Медицина, 1984. - 304 с.
107. Хидиятова, И.М. Эпидемиология и молекулярно-генетические основы наследственных заболеваний нервной системы в Республике Башкортостан: авторефер. дисс....докт.биол.наук: 03.000.15 / Хидиятова Ирина Михайловна.– Уфа. 2008. - 3 с.
108. Хитринская, И.Ю. Генетическое своеобразие населения Якутии по данным аутосомных локусов / И.Ю. Хитринская, В.А. Степанов, В.П. Пузырев и др. // Молекулярная биология.– 2003. - Т. 37. - №2. - С. 234-239.
109. Шнайдер, Н.А. Клинико - генетическая гетерогенность дистрофической миотонии /Н.А. Шнайдер, Е.А. Козулина, Д.В. Дмитриенко // Международный неврологический журнал.– 2007. - Т.3.- №13.
110. Штернберг, Л.Я. Культ орла у сибирских народов / Л.Я. Штернберг // Первобытная религия.– Л., 1936. - 114-115 с.
111. Ушницкий, В.В. Происхождение саха: история вопроса /В.В. Ушницкий // Научные исследования– Тувы, 2014.

112. Яковлева, С.Я. Дефицит 21-гидроксилазы надпочечников: распространенность генетических маркеров у детей коренных народностей Крайнего Севера и организация скрининг - диагностики в Республике Саха (Якутия): автореф. дисс. ...канд.мед.наук: 14.00.09 / Яковлева Светлана Яновна.– СПб., 2008. - 23 с.
113. Acton, R.T. DMPK - associated myotonic dystrophy and CTG repeats in Alabama African Americans / R.T. Acton, C.A. Rivers, B. Watson B. [et al] // Clin. Genet.– 2007.– Vol. 72, №5.– P. 448-453.
114. Altshuler, D. Genetic Mapping in Human Disease / D. Altshuler , M.J. Daly, E.S. Lander // Science.– November 2008.– Vol. 322 no. 5903.– P. 881-888.
115. Armas, P. Dissecting CNBP, a zinc-finger protein required for neural crest development, in its structural and functional domains / P. Armas, T.H. Agüero, M. Borgognone [et al] // J. Mol. Biol.– 2008.– Vol. 382, № 4.– P. 1043-1056.
116. Arsenault, M-E. Clinical characteristics of myotonic dystrophy type 1 patients with small CTG expansions / M-E Arsenault, C. Prevost, A. Lescault A. [et al] // J. Mathieu Neurology.– 2006. Vol.– 66, №8.– P. 1248-1250.
117. Arsenault, M. E. Clinical characteristics of myotonic dystrophy type 1 patients with small CTG expansions / M. E. Arsenault, C. Prevost, A. Lescault [et al] // Neurology.– 2006.– Vol. 66.– P. 1248-1250.
118. Ashizawa, T. Characteristics of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic dystrophy / T. Ashizawa, M. Anvret, M. Baiget [et al] // Am. J. Hum. Genet.– 1994a)– V. 54.– P. 414-423.
119. Ashizawa, T. Effect of the sex of myotonic dystrophy patients on the unstable triplet repeat in their affected offspring / T. Ashizawa, P.W. Dunne, P.A. Ward [et al] // Neurology.– 1994b)– V.44.– P.120-122.
120. Ashizawa, T. Anticipation in myotonic dystrophy. II. Complex relationship between clinical findings and structure of the GCT repeat / T. Ashizawa, J.R. Dubel, P.W. Dunne [et al] // Neurology.– 1992.– V.42.– P.1877-1883.
121. Bachinski, L.L. Confirmation of DM2 (CCTG)_n expansion mutation in PROMM/PDM patients of different European origins: a single shared haplotype

- indicates ancestral founder effects / L.L. Bachinski, B. Udd, G. Meola [et al] // *Am. J. Hum. Genet.*– 2003.– Vol.73.– P.835-848.
122. Barrett, J.C. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps / J.C. Barrett, B. Fry, J. Maller [et al] // *Bioinformatics.*– 2005.– Vol.21.– P.263-265.
123. Barbosa, J. Plasma insulin in patients with myotonic dystrophy and their relatives / J. Barbosa, F.Q. Nuttall, W. Kennedy [et al] // *Medicine.*– 1974.– V. 53.– P.307.
124. Basu, P. Molecular anatomy of CTG expansion in myotonin protein kinase gene among myotonic dystrophy patients from Eastern India / P. Basu, P.K. Gangopadhaya, S.C. Mukherjee [et al] // *Hum. Mut.*– 2000.– P.368.
125. Basu, P. Haplotype analysis of genomic polymorphisms in and around the myotonic dystrophy locus in diverse populations of India / P. Basu, P.P. Majumder, S. Roychoudhury // *Hum. Genet.*– 2001.– Vol.108.– P.310-317.
126. Boucher, C.A. A novel homeodomain-encoding gene is associated with a large CpG island interrupted by the myotonic dystrophy unstable (CTG)_n repeat / C.A. Boucher, S.K. King, N. Carey [et al] // *Hum. Mol. Genet.*– 1995.– Vol. 4.– P. 1919-1925.
127. Buxton, J. Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy / J. Buxton, P. Shelbourne, J. Davies [et al] // *Nature.*– 1992.– Vol. 355.– P. 547-548.
128. Braida, C. Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients / C. Braida, R.K.A. Stefanatos, B. Adam [et al] // *Hum. Molec. Genet.*– 2010.– Vol. 19.– P. 1399-1412.
129. Brook, J.D. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. / J.D. Brook, M.E. McCurrach, H.G. Harley [et al] // *Cell.*– 1992.– Vol. 68.– P. 799-808.

130. Brouwer, J.R. Microsatellite repeat instability and neurological disease. / J.R. Brouwer, R. Willemsen and B.A. Oostra / *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*.– 2009.– Vol. 31.– P. 71-83.
131. Brunner, H.G. Genetic linkage with chromosome 19 but not chromosome 17 in a family with myotonic dystrophy associated with hereditary motor and sensory neuropathy. /H.G. Brunner, F. Spaans, H.J. Smeets [et al] // *Neurology*.– 1991 – Vol. 41.– P. 80-84.*Genet.* 2007. Vol. 52 (2). P. 123-128.
132. Brunner, H.G. Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele site on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM) / H.G. Brunner, H.T. Bruggenwirth, W. Nillesen [et al] // *Am. J. Hum. Genet.*– 1993.– Vol. 53.– P. 1016-1023.
133. Campbell, C. Congenital myotonic dystrophy: assisted ventilation duration and outcome / C. Campbell, R. Sherlock, P. Jacob [et al] // *Pediatrics*.– 2004.– V.113.– P. 811-816.
134. Charlet, B.N. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing / B.N. Charlet, R.S. Savkur, G. Singh [et al] // *Mol. Cell*.– 2002.– Vol. 10.– P. 45-53.
135. Cho, D. H. Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF / D.H. Cho, C.P. Thienes, S.E. Mahoney [et al] // *Molec. Cell*.– 2005.– №20: P.– 483-489.
136. Cooper, T. A. A reversal of misfortune for myotonic dystrophy? / T.A. Cooper // *New Eng. J. Med.*– 2006.– 355:– P. 1825-1827.
137. Croft S.B. A Role for RNA Localization in the Human Neuromuscular Disease Myotonic Dystrophy: Dissertation... for the Degree of Doctor of Philosophy. Austin, 2009. P.20.
138. Crubezy, E. Human evolution in Siberia: from frozen bodies to ancient DNA / Crubezy E., Amory S., Keyser C. et al. // *BMC Evolutionary Biology*.– 2010. 10:25, doi 10.1186/1471-2148-10-25.
139. Culjkovic, B. Culjkovic B., Stojkovic O., Vukosavic S. et al. CTG repeat polymorphism in DMPK gene in healthy Yugoslav population / B. Culjkovic, O.

- Stojkovic, S. Vukosavic [et al] // *Acta Neurol. Scand.*– 2002.– Vol. 105.– P. 55-58.
140. Cummings C.J., Zoghbi H.Y. Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology // *Annu Rev Genomics Hum. Genet.* 2000. 1. P. 281-328.
141. Day, J.W. Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum / J.W. Day, K. Ricker, J.F. Jacobsen // *Neurology.*– 2003.– Vol. 60.– P. 657-664.
142. Di Rienzo, A. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations / A. Di Rienzo, A.C. Peterson, J.C. Garza [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci.*– 1994.– Vol. 91.– P. 3166-3170.
143. Ebralidze, A. RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy / A. Ebralidze, Y. Wang, V. Petkova [et al] // *Science.*– 2004.– 303.– P. 383-387.
144. Eiberg, H. Indication of linkage between the PEPD locus and the C3-DM-Le-Lu linkage group and support for assignment of this linkage group to chromosome no. 19 / H. Eiberg, J. Mohr, L. Staub Nielsen // *Clin. Genet.*– 1983.– P. 23: 228.
145. Emery, A. E. N. *Neuromuscular Disorders:* / A.E.N. Emery // *Clinical and Molecular Genetics.* Chichester-New York-Weinheim- Brisbane-Singapore-Toronto.– 1998.– P. 322–355.
146. Finsterer, J. Myotonic dystrophy type 2 / J. Finsterer // *Eur. J. Neurol.*– 2002.– Vol. 9.– P. 441-447.
147. Foiry, L. Msh3 is a limiting factor in the formation of intergenerational CTG expansions in DM1 transgenic mice / L. Foiry, L. Dong, C. Savouret [et al] // *Hum. Genet.*– 2006, 119:– P. 520-526.
148. Freitas, S. R. S. Analysis of the DMPK gene CTG repeat in healthy Brazilians / S.R.S. Freitas, P.H. Cabello, Rodrigo Soares Moura-Neto2 [et al] // *Genetics and Molecular Biology.*– 2007.– Vol. 30, №1.– P. 14-16.

149. Fu, Y-H. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy / Y-H Fu, A. Pizzuti, R. Jr. Fenwick [et al] // *Science*.– 1992.– Vol. 255.– P. 1256-1258.
150. Fu, Y.- H. Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy / Y.H. Fu, D.L. Friedman, S. Richards et al. // *Science*.– 1993.– Vol. 260.– P. 235-238.
151. Frisch, R. Effect of triplet repeat expansion on chromatin structure and expression of DMPK and neighboring genes, SIX5 and DMWD, in myotonic dystrophy / R. Frisch, K.R. Singleton, P.A. Moses [et al] // *Molec. Genet. Metab.*– 2001, 74:– P. 281-291.
152. Gagnon, C. Towards an integrative approach to the management of myotonic dystrophy type 1 / C. Gagnon, L. Noreau, R. Moxley [et al] // *J. Neurol Neurosurg*.– 2007; 78– P. 800-806.
153. GeneBank, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>.
154. Gennarelli, M. CTG repeats distribution and Alu insertion polymorphism at myotonic dystrophy (DM) gene in Amhara and Oromo populations of Ethiopia / M. Gennarelli , M. Pavoni, F. Cruciani F. // *Hum. Genet.*– 1999.– Vol. 105. P.– 165-167.
155. Goldman, A. New founder haplotypes at the myotonic dystrophy locus in Southern Africa. / A. Goldman , M. Ramsay , T. Jenkins // *Am. J. Hum. Genet.*– 1995.– Vol. 56.– P. 1373-1378.
156. Groenen, P. J. T. A. Constitutive and regulated modes of splicing produce six major myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) isoforms with distinct properties / P.J.T.A. Groenen, D. G., Wansink, Coerwinkel, M., van den Broek, W. et al. // *Hum. Molec. Genet.*– 2000.– Vol. 9.– P. 605-616.
157. Guo S. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles / S. Guo, E. Thomson // *Biometrics*.– 1992.– Vol. 48.– P.361-372.
158. Hamshere, M.G. Transcriptional abnormality in myotonic dystrophy affects DMPK but not neighboring genes / M. G. Hamshere, E.E.Newman, M. Alwazzan M [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.– 1997.– Vol. 94.– P. 7394-7399.

159. Harley, H.G. Localisation of the myotonic dystrophy locus to 19q13.2-1913.3 and its relationship to twelve polymorphic loci on 19q / H.G. Harley, K.V. Walsh, S. A. Rundle [et al] // *Hum. Gen.*– 1991.– Vol. 87, №1.– P. 73-80.
160. Harley, H.G. Detection of linkage disequilibrium between the myotonic dystrophy locus and a new polymorphic DNA marker. / H.G. Harley, I.D. Brook, J. Floyd [et al] // *Am. J. Hum. Genet.*– 1991.– Vol. 49.– P. 68-75.
161. Harley, H.G. Unstable Dna-Sequence in Myotonic-Dystrophy / H.G. Harley, S.A. Rundle, W. Reardon [et al] // *Lancet.*– 1992.– Vol. 339.– P. 1125-1128.
162. Harley, H.G. Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy /. H.G. Harley, J.D. Brook, S. A. Rundle [et al] // *Nature.*– 1992.– Vol. 355.– P. 545-546.
163. de Haro, M. MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1 / M. de Haro, I. Al-Ramahi, B. De Gouyon // *Hum. Mol. Genet.*– 2006.– Vol. 15.– P. 2138-2145.
164. Harper, P.S. *Myotonic Dystrophy* / P.S. Harper // London: W.B.Saunders Company.– 1989.– P. 384.
165. Harper, P.S. Anticipation of myotonic dystrophy, new light on an old problem / P.S. Harper, S.M .Harley, W.Reardon [et al] // *Am. J. Hum. Genet.*– 1992.– Vol. 51.– P. 10-16.
166. Harper, P.S. *Myotonic Dystrophy* / P.S. Harper. // 3rd edn. WB Saunders Co. London.– 2001.
167. Harper, P.S. *Myotonic dystrophy: present management, future therapy* / P.S. Harper, B. Van Engelen, B. Eymard [et al] // New York Oxford University Press.– 2004.– P. 251.
168. Held, M. A patient with muscle pain after a journey to the tropics. Myocardial involvement in proximal myotonic myopathy / M. Held, C. Schneider, K. Fleischer [et al] // *Dtsch. Med. Wochenschr.*– 1998.– Vol. 123.– P. 1201-1206.

169. Imbert, G. Genetics Instabilities and Hereditary Neurological Disorders / G. Imbert, Y. Feng, D.L. Nelson [et al] // Eds Wells R.D., Warren S.T. San Diego: Academic Press.– 1998.– P. 27-53.
170. Imbert, G. FMR1 and mutations in fragile X syndrome: Molecular biology, biochemistry, and genetics / G. Imbert, Y. Feng, D.L. Nelson // Genetic instabilities and hereditary neurological diseases.– 1998.– P. 27-53.
171. Imbert, G. Origin of the expansion mutation in myotonic dystrophy / G. Imbert, Kretz, K. Johnson [et al] // Nat. Genet.– 1993.– Vol. 4.– P. 72-76.
172. Jang, J.-H. Frequence of DMPK mutation carriers in Korean women of childbearing age / J-H Jang, J.W. Lee, E-H Cho [et al] // Clinical Genetics.– 2014.– V.86, №4.– P.389-399.
173. Jansen, G. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice / G. Jansen, P.J.T.A. Groenen, D. Bachner [et al] // Nat. Genet.– 1996.– Vol. 13.– P. 316-324.
174. Jansen, G. Structural organization and developmental expression pattern of the mouse WD-repeat gene DMR-N9 immediately upstream of the myotonic dystrophy locus /G. Jansen, D. Bachner, M. Coerwinkel [et al] // Hum. Mol. Genet.– 1995.– Vol. 4.– P. 843-852.
175. Junghans R.P. Does (CUG)_n repeat in DMPK mRNA .paint. chromosome 19 to suppress distant genes to create the diverse phenotype of myotonic dystrophy/ A new hypothesis of long-range cis autosomal inactivation / R.P. Junghans, A. Ebralidze, B. Tiwari // Neurogenetics.– 2001.– Vol. 3.– P. 59-67.
176. Jansen, G. Characterization of the myotonic dystrophy region predicts multiple protein isoform-encoding mRNAs. / G. Jansen, M. Mahadevan, C. Amemiya [et al] // Nat. Genet.– 1992.– Vol. 1.– P.21-27
177. Jack Puymurat. Unusual Prevalence of DM 1 in Quebec.– 2011.
178. Kakourou, G. Preimplantation genetic diagnosis for myotonic dystrophy type 1 in the UK / G. Kakourou, S. Dhanjal, T. Mamas // Neuromuscular Disorders.– 2008.– Vol. 18.– Issue 2.– P. 131-136.

179. Kanadia, R.N. Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly (CUG) model for myotonic dystrophy / R.N. Kanadia, J. Shin, Y. Yuan [et al] // *Proc. Nat. Acad. Sci.*– 2006. 103.– P.11748-11753.
180. Kaliman, P. Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1 / P. Kaliman, E. Llagostera // *Cell*– 2008.– Vol. 20, № 11.– P. 1935-1941.
181. Koebis, M. Alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1 / M. Koebis, N. Ohsawa, Y. Kino [et al] // *Genes Cells*– 2011.– Vol. 16, № 9.– P. 961-972.
182. Koshelev, M. Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1/ M. Koshelev, S. Sarma, R.E. Price [et al] // *Hum. Mol. Genet.*– 2010. Vol. 19, №6.– P. 1066-1075.
183. Klesert, T.R. Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP / T.R. Klesert, A.D. Otten, T.D. Bird [et al] // *Nat. Genet.*– 1997.– Vol. 16.– P. 402-406.
184. Krahe, R. Effect of myotonic dystrophy trinucleotide repeat expansion on DMPK transcription and processing / R. Krahe, T. Ashizawa, C. Abbruzzese [et al] // *Genomics*– 1995.– Vol. 28.– P. 1-14.
185. Krndija, D. Haploptype analysis of the Serbian population. / D. Krndija, D. Savic, J. Mladenovic [et al] // *Acta Neurol. Scand.*– 2005.– Vol. 111, № 94.– P.274-177.
186. Kurihara, T. New classification and treatment for myotonic disorders / T. Kurihara // *Int. Med.*– 2005.– Vol. 44, № 10.– P. 1027-1032.
187. Kwon, M. J. Haplotype analysis of the Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1) Locus in the Korean Population / M.J. Kwon, S.-T. Lee, B.J. Kim [et al] // *Annals of Clinical & laboratory Science*– 2010.– Vol. 40.– P. 156-162.
188. Laan, M. Demographic history and linkage disequilibrium in human populations / M. Laan, S. Paabo // *Nat Genet.*– 1997.– Vol. 17.– P. 435-438.

189. Labuda D., Zietkiewicz E., Labuda M. The genetic clock and age of the found effect in growing populations: a lesson from French Canadians and Ashkenazim// *Am. J. Hum. Genet.*, 1997. V 61. P.768-771.
190. Lavedan, C. Myotonic dystrophy: size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism / C. Lavedan, H. Hoffman-Radvanyi, P. Shelbourne [et al] // *Am. J. Hum. Genet.*– 1993.– Vol. 52.– P. 875-883.
191. La Spada, A.R. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy / A.R. La Spada, E.M. Wilson, D.B. Lubahn [et al] // *Nature* – 1991.– №352.– P.77-79.
192. Lee, J.E. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy / J.E. Lee and T.A. Cooper // *Biochem. Soc. Trans.*– 2009.– Vol. 37.– P. 1281-1286.
193. Lin, X. Failure of MBNL1-dependent postnatal splicing transitions in myotonic dystrophy / X. Lin, J.W. Miller, A. Mankodi [et al] // *Hum. Molec. Genet.*– 2006.– Vol. 15– P. 2087-2097.
194. Liquori, C.L. Myotonic Dystrophy Type 2: Human founder haplotype and evolutionary conservation of the repeat tract. / C.L. Liquori, Y. Ikeda, M. Weatherspoon [et al] // *Am. J. Hum. Genet.*– 2003.– Vol. 73.– P. 849-862.
195. Liquori, C.L. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9 / C.L. Liquori, K. Ricker, M.L. Moseley // *Science* – 2001.– Vol. 293.– P. 864-867.
196. Le Ber I. A non-DM1, non-DM2 multisystem myotonic disorder with frontotemporal dementia: phenotype and suggestive mapping of the DM3 locus to chromosome 15q21-24 / I. Le Ber, M. Martinez, D. Champion [et al] // *Brain.*– 2004.– Vol. 127.– P. 1979-1992.
197. Lopez de Munain A., Cobo A.M., Saenz A. et al. Frequency of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic dystrophy // *Genet. Epidemiol.*– 1996.– Vol.13.– P. 483-487.

198. Lopez de Munain, A. Prevalence of myotonic dystrophy in Guipuzcoa (Basque Country, Spain) / A. Lopez de Munain, A. Blanco, J.I. Emparanza [et al] // *Neurology*.– 1993.– Vol. 43.– P. 1573-1576.
199. Machuca-Tzili, L. Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review / L. Machuca-Tzili, D. Brook, D. Hilton-Jones // *Muscle Nerve*.– 2005.– Vol.32.– P. 1-18.
200. Machuca-Tzili, L. Flies deficient in muscleblind protein model features of myotonic dystrophy with altered splice forms of Z-band associated transcripts / L. Machuca-Tzili, H. Thorpe, T.E. Robinson [et al] // *Hum. Genet.* – 2006.– P. 487-499.
201. Madenovic, J. Epidemiology of myotonic dystrophy type 1 (Steinert disease) in Belgrade (Serbia) / J. Madenovic, T. Pekmezovic, S. Todorovic [et al] // *Clin. Neurol. Neurosurg.*– 2006.108– P. 757-760.
202. Magaña, J.J. Distribution of CTG repeats at the DMPK gene in myotonic dystrophy patients and healthy individuals from the Mexican population / J.J. Magaña, P. Corfes - Reynosa, R. Escobar - Cedillo [et al] // *Mol. Biol. Rep.*– 2011.– Vol. 3, №2.– P. 1341-1346.
203. Magee, A.C. Reproductive counseling for women with myotonic dystrophy / A.C. Magee, A.E. Hughes, A. Kidd [et al] // *J. Med. Genet.*– 2002.– Vol. 39.– P. 15.
204. Magee A. The epidemiology of myotonic dystrophy in Northern Ireland / A. Magee, N.C. Nevin // *Community Genet.*– 1999.– Vol. 2.– P. 179-183.
205. Mahadevan, M.S. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene / M. Mahadevan, C. Tsilfidis, L. Sabourin [et al] // *Science*.– 1992.– Vol. 255.– P. 1253-1255.
206. Mahadevan, M. S. Structure and genomic sequence of the myotonic dystrophy (DM kinase) gene / M.S. Mahadevan, C. Amemiya, G. Jansen [et al] // *Hum. Molec. Genet.*– 1993.– Vol. 2.– P. 299-304.

207. Mahadevan, M. S. Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy / M.S. Mahadevan, R.S. Yadava, Q. Yu [et al] // *Nature Genet.*– 2006.– Vol. 38.– P. 1066-1070.
208. Mahadevan, M.S. Characterization and polymerase chain reaction (PCR) detection of an Alu deletion polymorphism in total linkage disequilibrium with myotonic dystrophy / M.S. Mahadevan, M.S. Shriver, M.A. Foitzik [et al] // *Genomics.*– 1993.– Vol. 15.– P. 446-448.
209. Mankodi, A. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat / A. Mankodi, E. Logigian, L. Callahan [et al] // *Science.*– 2000.– Vol. 289.– P. 1769-1773.
210. Mankodi, A. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. / A. Mankodi, M.P. Takahashi, H. Jiang // *Mol. Cell.*– 2002.– Vol. 10.– P. 35-44.
211. Mankodi, A. Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2 / A. Mankodi, C.R. Urbinati, Q.P. Yuan [et al] // *Hum. Mol. Genet.*– 2001.– Vol. 10.– P. 2165-2170.
212. Margolis J. M., B. G. Schoser, et al. DM2 intronic expansions: evidence for CCUG accumulation without flanking sequence or effects on ZNF9 mRNA processing or protein expression // *Hum Mol Genet.* 2006. Vol.15(11). P.1808-1815.
213. Martorell, L. Prenatal diagnosis in myotonic dystrophy type 1. Thirteen years of experience: implications for reproductive counselling in DM1 families / L. Martorell, A.M. Cobo, M. Baiget [et al] // *Prenat. Diagn.*– 2007.– Vol. 27, №1– P. 68-72.
214. Martorell, L. Frequency and stability of the myotonic dystrophy type 1 premutation / L. Martorell, D.G. Monckton, A. Sanchez [et al] // *Neurology.*– 2001.– Vol. 56.– P. 328-335.
215. Marshfield linkage map, URL: <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/>

216. Mathieu, J. A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy / J. Mathieu, P. Allard, L. Potvin [et al] // *Neurology*.– 1999.– Vol. 52.– P. 1658.
217. Mathieu, J. Genealogical reconstruction of myotonic dystrophy in the Saguenay-Lac-Saint-Jean area (Quebec, Canada) / J. Mathieu, M. De Braekeber, C. Prevost // *Neurology*.– 1990.– Vol. 40.– P. 839-842.
218. Mathieu, J. Epidemiological surveillance of myotonic dystrophy type 1: A 25-year population-based study / J. Mathieu, C. Prevost // *Neuromuscular Disorders*.– 2012.– Vol. 22.– P. 974-979.
219. McCurrach, M. E. Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member / M.E. McCurrach, H.G. Harley, A.J. Buckler [et al] // *Cell*.– 1992.– Vol. 68.– P. 799-808.
220. Mladenovic, J. Epidemiology of myotonic dystrophy type 1 (Steinert disease) in Belgrade (Serbia) / J. Mladenovic, T. Pekmezovic, S. Todorovic [et. al] // *Clin. Neurol. Neurosurg*.– 2006.– Vol.108.– P. 757-760.
221. Medica, I. Patients with primary cataract as a genetic pool of DMPK protomutation / I. Medica, N. Teran, M. Volk [et al] // *J. Hum. Genet*.– 2007.– Vol. 52.– P. 123-128.
222. Meola, G. Clinical and genetic heterogeneity in myotonic dystrophies / G. Meola // *Arch. Phys. Med. Rehabil*.– 2002.– Vol. 83.– P. 724-726.
223. Meola, G. Executive dysfunction and avoidant personality trait in myotonic dystrophy type 1 (DM-1) and in proximal myotonic myopathy (PROMM/DM-2) / G. Meola, V. Sansone, D. Perani [et al] // *Neuromuscul. Disord*.– 2003.– Vol. 13.– P. 813-821.
224. Mounsey, J.P. Modulation of skeletal muscle sodium channels by human myotonin protein kinase / J.P. Mounsey, P. Xu, J.E.III John [et al] // *J. Clin. Invest*.– 1995.– Vol. 95.– P. 2379-2384.

225. Morgenlander J.C. Myotonic dystrophy / J.C. Morgenlander, J.M. Massey // *Semin. Neurol.*– 1991.– Vol. 11.– P. 236-243.
226. Musova, Z. Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene / Z. Musova, R. Mazanec, A. Krepelova [et al] // *Am. J. Med. Genet.*– 2009.– Vol. 149A.– P. 1365-1374.
227. Nevilli, G. (CTG)_n triplet mutation and phenotype manifestations in myotonic dystrophy patients / G. Nevilli, M. Gennarelli, E. Menegazzo [et al] // *Biochem. Med. Metab. Biol.*– 1993.– Vol. 50.– P. 85- 92.
228. Nevilli, C.E. High resolution genetic analysis suggests one ancestral predisposing haplotype for the origin of the myotonic dystrophy mutation / C.E. Nevilli, M.S. Mahadevan, J.M. Barcelo [et al] // *Hum. Mol. Genet.*– 1994.– Vol. 3.– P. 45-51.
229. Nevilli, G. North Eurasian origin of the myotonic dystrophy mutation / G. Nevilli, G. Spedini, G. Destro-Bisol [et al] // *Hum. Mutat.*– 1994.– Vol. 4.– P. 79-81.
230. Nei, M. *Molecular evolutionary genetics* / Nei M // N. Y.:Colombia Univ. Press.– 1987.
231. NCBI, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>
232. NCBI, URL : <http://www.hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>
233. Norwood, F.L.M. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population / F.L.M. Norwood, C. Chris Harling, F. Patrick [et al] // *Brain.*– 2009– P. 3175-3186.
234. O'brien, S. J. The cheetah is depauperate in genetic variation / S.J. O'brien, D.E. Wildt, D. Goldman [et al] // *Science.*– 1983.– P. 459-462.
235. O'Coilain, D.F. Transgenic overexpression of human DMPK accumulates into hypertrophic cardiomyopathy, myotonic myopathy and hypotension traits of myotonic dystrophy / D.F. O'Coilain, C. Perez-Terzic, S. Reyes // *Hum. Mol. Genet.*– 2004.– Vol. 13, № 20.– P. 2505-2518.
236. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM) (ноябрь 2008) URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
237. Orengo, J.P. Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy /

- J.P. Orengo, P. Chambon, D. Metzger [et al] // Proc Natl. Acad. Sci. U S A.– 2008.– Vol. 105, №7– P. 2646-2651.
238. Otten, A.D. Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure / A.D. Otten, S.J. Tapscott // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1995.– Vol. 92.– P. 5465-5469.
239. Oude, Ophuis R.J. DMPK protein isoforms are differentially expressed in myogenic and neural cell lineages / R.J. Oude Ophuis, S.A. Mulders van R.E. Herpen [et al] // Muscle Nerve.– 2009.– Vol. 40.– P. 545-555.
240. Pakendorf, B. Investigating the effects of prehistoric migrations in Siberia: genetic variation and the origins of Yakuts / B. Pakendorf, I. Novgorodov, V. Osakovskij [et al] // Hum. Genet.– 2006.– Vol. 120.– P. 334-353.
241. Paiva.A.M. Influence of sequence context and length on the structure and stability of triplet repeat DNA oligomers / A.M. Paiva and R.D. Sheardy // Biochemistry.– 2004.– P. 14218-14227.
242. Pan, H. Haplotype analysis of the myotonic dystrophy type 1 (DM1) locus in Taiwan: implications for low prevalence and founder mutations of Taiwanese myotonic dystrophy type 1 / H. Pan, H. Lin, W. Ku [et al] // Eur. J. Hum. Genet.– 2001.– Vol .9.– P. 638-641.
243. Perseghin, G. Contribution of Abnormal Insulin Secretion and Insulin Resistance to the Pathogenesis of Type 2 Diabetes in Myotonic Dystrophy / G. Perseghin, A. Caumo, C. Arcelloni [et al] // Diabetes Care.– 2003.– Vol .26.– P.2112-2118.
244. Popova, S.N. Polymorphism of trinucleotide repeats in loci DM, DRPLA and SCA1 in East European populations / S,N. Popova, P.A. Slominsky, E.A. Pocheshnova [et al] // Eur. J. Hum. Genet.– 2001.– Vol. 9.– P. 829-835.
245. Potaman, V.N. Length-dependent structure formation in Friedreich ataxia (GAA)_n. (TTC)_n repeats at neutral pH / V. N. Potaman, E.A. Oussatcheva, Y.L. Lyubchenko [et al] // Nucleic Acids Res.– 2004.– Vol. 32.– P. 1224-1231.

246. Priyadarshi, S. Effects of uremic serum on isolated cardiac myocyte calcium cycling and contractile function /S. Priyadarshi // *Kidney Int.*– 2001.– Vol. 60, №6.– P. 2367-2376.
247. Ranum, L.P. Dominantly inherited, non-coding microsatellite expansion disorders. / L.P. Ranum, J.W. Day // *Curr. Opin. Genet.*– 2002.– Vol.12.– P. 266-271.
248. Ranum, L.P. Myotonic dystrophy: clinical and molecular parallels between myotonic dystrophy type 1 and type 2 / L.P. Ranum, J.W Day // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*– 2002.– Vol. 2.– P. 465-470.
249. Ranum, L.P. Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus / L.P. Ranum, J.W. Day // *Am. J. Hum. Genet.*– 2004.– Vol. 74.– P. 793-804.
250. Ranum, L.P Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. / L.P. Ranum, P. F. Rasmussen, K. A. Benzow [et al] // *Nature Genet.*– 1998.– Vol. 19.– P. 196-198.
251. Risch N., de Leon D., Ozelius L., et al. Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population // *Nat. Genet.* 1995. V. 9. P. 152–159.
252. Roberts R, Timchenko NA, Miller JW, Reddy S, Caskey CT, Swanson MS, Timchenko LT. Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997. 94(24). P.13221–13226
253. Rubinsztein, D.S., Myotonic dystrophy CTG repeats and the associated insertion/deletion polymorphism in human and primate populations / D.S. Rubinsztein, J. Leggo, W. Amos [et. al] // *Hum. Molec. Genet.*– 1994. 3.– P. 2031-2035.
254. Rudnik-Schoneborn, S. Outcome in pregnancies complicated by myotonic dystrophy: a study of 31 patients and review of the literature / S. Rudnik-Schoneborn, K. Zerres // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*– 2004.– Vol. 114.– P. 44-53.

255. Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // *MolBiol. Evol.*– 1987. Vol. 4, №4.– P. 406-425.
256. Sakamoto, N. Sticky DNA, self-association properties of long GAA.TTC repeats in R.R.Y triplex structures from Friedreich's ataxia / N. Sakamoto, P.D. Chastain, P. Parniewski [et al] // *Mol. Cell.*– 1999.– Vol. 3.– P. 465-475.
257. Sakamoto, N. Sticky DNA, a self-associated complex formed at long GAA.TTC repeats in intron 1 of the frataxin gene, inhibits transcription / N. Sakamoto, K. Ohshima, L. Montermini [et al.] // *J. Biol. Chem.*– 2001.– Vol. 276.– P. 27171-27177.
258. Sato, S. Identification of transcriptional targets for Six5: implication for the pathogenesis of myotonic dystrophy type 1 / S. Sato, M. Nakamura, D.H. Cho [et al] // *Hum. Mol. Genet.*– 2002.– Vol. 11.– P. 1045-1058.
259. Seffield, V.C. Use of isolated inbred human population for identification of disease genes / V.C. Seffield, E.M. Stone, R. Carmi // *TIG.*– 1998.– Vol. 14, № 10.– P. 391-396.
260. Segel, R. Prevalence of myotonic dystrophy in Israeli Jewish communities: inter-community variation and founder permutations / R. Segel, S. Silverstein, I. Lerer et al. // *Am. J. Med. Genet.*– 2003.– Vol. 119A.– P. 273-278.
261. Schoser, B. Homozygosity for CCTG mutation in myotonic dystrophy type 2 / B. Schoser, W. Kress, M. C. Walter [et al] // *Brain.*– 2004.– Vol. 127.– P. 1868-1877.
262. Schoser, B. Myotonic dystrophies 1 and 2: complex diseases with complex mechanisms / B. Schoser, L. Timchenko // *Curr. Genomics.*– 2010.– Vol. 11, №2.– P. 77-90.
263. Shaw, D.J. Housman and J.D. Brook , Genomic organization and transcriptional units at the myotonic dystrophy locus / D.J. Shaw, M. McCurrach, S.A. Rundle [et al] // *Genomics.*– 1993.– Vol. 18.– P. 673-679.

264. Shojasaffar, B. CTG expansion & haplotype analysis in DM1 gene in healthy Iranian population. / B. Shojasaffar, N. Moradin, K. Kahrizi [et al] // *Can. J. Neurol. Sci.*– 2008.– Vol. 35, №2.– P. 216-219.
265. Shriver, M.D. VNTR allele frequency distributions under a stepwise mutation model: A computer simulation approach / M.D. Shriver, L. Jin, R. Chakraborty[et al] // *Genetics.*– 1993.– Vol. 134– P. 983-993.
266. Siciliano, G. Epidemiology of myotonic dystrophy in Italy: re-appraisal after genetic diagnosis / G. Siciliano, M.L. Manca, M. Gennarelli [et al] // *Clin. Genet.*– 2001.– Vol. 59.– P. 344-349.
267. Sohmiya, M. A case of myotonic dystrophy (MD) associated with glucose-induced hyperinsulinemia followed by reactive hypoglycemia and increased number of cytosine-thymine-guanine (CTG) trinucleotide repeats in MD gene / M. Sohmiya, K. Yamauchi, K. Koshimura [et al] // *Endocr. J.*– 2000.– Vol. 47.– P. 277-283.
268. Suominen, T. Population frequency of myotonic dystrophy: higher than expected frequency of myotonic dystrophy type 2 (DM2) mutation in Finland / T. Suominen, L.L. Bachinski, S. Auvinen [et al] // *Eur. J. Hum. Genet.*– 2011.
269. Tapscott, S.J. Deconstructing myotonic dystrophy / S.J. Tapscott // *Science.*– 2000.– Vol. 289.– P.1701-1702.
270. Tishkoff, S.A. A global haplotype analysis of the myotonic dystrophy locus, implications for the evolution of modern humans and for the origin of myotonic dystrophy mutations / S.A. Tishkoff , A. Goldman, F. Calafell [et. al] // *Am. J. Hum. Genet.*– 1998.– Vol. 62.– P. 1389-1402.
271. Tishkoff, S.A. Implications of biogeography of human populations for “race” and medicine / S.A. Tishkoff, K.D. Kidd // *Nature Genet.*– 2004.– Supp. Vol. 36.– P. 21-27.
272. Timchenko, L.T. Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy / L.T. Timchenko, N.A. Timchenko, C.T. Caskey [et al] // *Hum. Mol. Genet.*– 1996.– Vol. 5.– P.115-121.

273. Timchenko, L.T. Myotonic dystrophy: The Role of RNA CUG Triplet Repeats / L.T. Timchenko // *Am. J. Hum. Genet.*– 1999.– Vol. 64.– P. 360-364.
274. Timchenko, N.A. Molecular Basis for Impaired Muscle Differentiation in Myotonic Dystrophy / N.A. Timchenko, P. Iakova, Z. Cai [et al] // *Molecular and Cellular Biology*.– 2001.– Vol. 21, № 20.– P. 6927-6938.
275. Turner, C. / C. Turner, D. Hilton-Jones // *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*.– 2010.– Vol. 81.– P. 358-367.
276. Tweerasasawat, S. CTG repeat lengths of the gene in myotonic dystrophy patients compared to healthy controls in Thailand / S. Tweerasasawat, C. Papsing, T. Pulkes // *J. Clin. Neurosci.*– 2011.– Vol. 17, №12.– P. 1520-1520.
277. Udd, B. 140th ENMC International Workshop: Myotonic Dystrophy DM2/PROMM and other myotonic dystrophies with guidelines on management / B. Udd, G. Meola, R. Krahe [et al] // *Neuromuscul Disord.*– 2006.– Vol. 16.– P. 403-13.
278. UCSC Genome Browser on Human May – 2004, URL:<http://genome.ucsc.edu/index.html>.
279. Valaperta, R. Identification and Characterization of DM1 Patients by a New Diagnostic Certified Assay: Neuromuscular and Cardiac Assessments / R. Valaperta, V. Sansone, F. Lombardi [et al] // *BioMed Research International*.– 2013.– Vol. 6.– P.23-34
280. Vetcher, A.A. Sticky DNA formation in vivo alters the plasmid dimer/monomer ratio / A.A. Vetcher and R.D. Wells // *J. Biol. Chem.*,– 2004.– Vol. 279.– P. 6434-6443.
281. Vignaud, A. Progressive skeletal muscle weakness in transgenic mice expressing CTG expansions is associated with the activation of the ubiquitin-proteasome pathway. / A. Vignaud, A. Ferry, A. Huguet [et al] // *Neuromuscul. Disord.*– 2010.– Vol. 20.– P. 319-325.

282. Wansink, D.G. Transgenic mouse models for myotonic dystrophy type 1 (DM1) / D.G. Wansink and B. Wieringa // *Cytogenet Genome Res.*– 2003.– Vol. 100.– P. 230-242.
283. Warf, M.B. MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin / M.B. Warf and J.A. Berglund // *T. RNA.*– 2007.– Vol. 13.– P. 2238-2251.
284. Wheeler, T.M. Myotonic dystrophy: RNA-mediated muscle disease / T.M. Wheeler and C.A. Thornton // *Curr. Opin. Neurol.*– 2007.– Vol. 20.– P. 572-576.
285. Wright, A.F. Population chois in mapping genes for complex disease / A.F. Wright, A.D. Carothers, M. Parastu // *Nature Genet.*, 1999. Vol. 23. P. 397-404.
286. Wu, Z. Clinical, familial and hereditary analysis of myotonic dystrophy / Z. Wu, J. Yang, J. Cao [et al] // *J. Cent. South. Univ. (Med. Sci)*– 2011.– Vol. 36, №6.– P. 520-524.
287. Yamagata, H. Expansion of unstable DNA region in Japanese myotonic dystrophy patients / H. Yamagata, T. Miki, M. Nakagawa [et. al] // *Lancet.*– 1992.– Vol. 339.– P. 692-693.
288. Yamagata. H. Association of CTG repeats and the 1-kb Alu insertion/deletion polymorphism at the myotonin protein kinase gene in the Japanese population suggests a common Eurasian origin of the myotonic dystrophy mutation / H. Yamagata, T. Miki, M. Nakagawa [et al] // *Hum. Genet.*– 1996.– Vol. 97.– P.145-147.
289. Yamagata, H. Molecular analysis of two pre-mutations in myotonic dystrophy / H. Yamagata, M. Kinoshita, T. Komori [et al] // *Clin. Genet.*– 1998.– Vol. 54.– P. 354-357.
290. Yamagata, H. Further evidence for a major ancient mutation underlying myotonic dystrophy from linkage disequilibrium studies in the Japanese population / H. Yamagata, M. Nakagawa, K. Johnson [et al] // *Hum. Genet.*– 1998.– Vol. 43.– P. 246-249.

291. Yotova, V. Anatomy of founder effect: myotonic dystrophy in Northeastern Quebec / V. Yotova, D. Labuda, E. Zietkiewicz // Hum. Genet.– 2005.– Vol. 177, №2-3.– P. 177-187.
292. Zerylnick, C. Normal variation at the myotonic dystrophy locus in global human populations / C. Zerylnick, A. Torroni, S.L. Sherman [et. al] // Am. J. Hum. Genet.,– 1995.– Vol. 56.– P.123 -130.
293. Zunz, E. Myotonic dystrophy-no evidence for preferential transmission of the mutated allele: a prenatal analysis / E. Zunz, D. Abeliovich, G.J. Harlern // Am. Journal of medical Genetics Part A.– 2004.– Vol. 127 A,№1.– P. 50-53.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1 Приложения

Последовательность олигонуклеотидных праймеров и условия ПЦР по SNP-локусам гена DMPK

Ген	Поли-морфизм/мутация	Локализация в гене	Структура праймеров	Температура отжига праймеров, (°C)	Эндонуклеаза рестрикции	Продукты гидролиза/амплификата п, н,		Литература
						Предковый аллель	Мутантный аллель	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
DMPK	rs 2070736	TEL от 1 экзона	F: 5`- AGGGCCCCTCATCAAAGTCCACGG-3` R: 5`-ACGGTTCTGCAGAGTGGAAGT -3`	60 55	<i>DraIII</i>	183	158	Neville et al.,1994
	rs 572634	Интрон 4	F: 5`-TCATGCCAGTCTTTCATCCTT-3` R: 5`-AACTCATCTCCAGCTGCCCGCATGGCTTGGTACAG-3`	65	<i>HphI</i>	186	148/124	Neville et al.,1994
	rs1799894	Интрон 5	F: 5-GACCTGCTGACACTCCTGAGC-3` R:5`-GTGCCTTCCATCCCTCATCAG-3`	60	<i>HhaI</i>	491	419	Neville et al.,1994
	rs527221	Экзон 10	F: 5`-CTGCAGAAGGTTTAGAAAGAGC-3` R: 5`-TCATCCTGTGGGACACCGAGG-3`	60 55	<i>BpmI</i>	350	299	Neville et al.,1994
	rs 915915	Интрон 11	F: 5`- AGCCACAGGCAGCCTTAAGC-3` R: 5`- TCCGGGGAAGGGCACACATGA-3`	63	<i>Fsp4HI</i>	284	156/128	Neville et al.,1994
	rs10415988	D19S4 63	F: 5`-TCTAGAACACAGGCAAATAATGT-3` R: 5`-ATCTAAATGCTAAGTGCCAAGTGT-3`	64	<i>TagI</i>	676	574	Neville et al.,1994

Таблица 2 Приложения

Последовательность олигонуклеотидных праймеров и условия ПЦР
для шести STR-маркеров в гене *DMPK*

Ген	Маркер	Структура праймеров	Длина фрагмента/ п.н.	Температура отжига праймеров (°C)	Способ детекции	Источник
1	2	3	4	5	6	7
<i>DMPK</i>	D19S408	F(FAM): 5`- TCTATGGGGTGGTGCC-3` R: 5`-GCCTCTTAGAGTTTTGGGAG -3`	122-146	60	Прямой	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
	S19S903	F(FAM): 5`-ACCGCACTCCACCCTG-3` R: 5`-TCCTCCTGTGAGATCC-3`	146-166	60	Прямой	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
	D19S219	F(FAM): 5-GTGAGCCAAGATTGTGC-3` R:5`-GACTATTTCTGAGACAGATTC-3`	160-190	60	Прямой	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
	D19S412	F(FAM): 5`-TGAGCGACAGAATGAGA-3` R: 5`-ACATCTTACTGAATGCTTG-3`	89-113	60	Прямой	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
	D19S606	F(FAM): 5`-AGGGCTGGGACCTCAC-3` R: 5`-CCAACACACTGTCTGC-3`	172-190	60	Прямой	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
	D19S879	F(FAM): 5`-CTGAGTGTGAATGAGGCAAC-3` R: 5`-AGGCCAGAGGACTGATTG-3`	251-265	60	Прямой	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

Таблица 3 Приложения

Относительное отклонение наблюдаемой гетерозиготности
в изученных группах

Исследуемые группы	SNP в гене DMPK	Относительное отклонение наблюдаемой гетерозиготности (D)
Якуты (N=228)	rs2070736	0,09
	rs572634	-0,15
	rs1799894	-0,11
	rs527221	-0,04
	rs915915	0,04
	rs10415988	-0,08
Буряты (N=100)	rs2070736	-0,10
	rs572634	-0,20
	rs1799894	0,03
	rs527221	0,03
	rs915915	-0,16
	rs10415988	0,11
Киргизы (N=100)	rs2070736	-0,13
	rs572634	-0,20
	rs1799894	0,08
	rs527221	-0,01
	rs915915	-0,10
	rs10415988	0,02
Русские (N=100)	rs2070736	0,15
	rs572634	-0,02
	rs1799894	0,08
	rs527221	0
	rs915915	-0,13
	rs10415988	0
Ханты (N=100)	rs2070736	-0,21
	rs572634	-0,20
	rs1799894	-0,06
	rs527221	-0,08
	rs915915	-0,19
	rs10415988	-0,21
Кеты (N=50)	rs2070736	-0,06
	rs572634	0,04
	rs1799894	-0,05
	rs527221	0,10
	rs915915	-0,07
	rs10415988	0,01
Больные МД (N=87)	rs2070736	0,31
	rs572634	-0,37
	rs1799894	0,5
	rs527221	-0,24
	rs915915	-0,15
	rs10415988	0,57
Здоровые родственники (N=52)	rs2070736	0,13
	rs572634	0,14
	rs1799894	-0,01
	rs527221	-0,01
	rs915915	-0,17
	rs10415988	-0,05

Таблица 4 Приложения

Наблюдаемая, ожидаемая гетерозиготность и значения отклонения от равновесия Харди-Вайнберга по СТG-повторам в гене *DMPK* в популяциях Северной Евразии

Исследуемые группы	Отклонение от равновесия Х-В (значение P)	Наблюдаемая гетерозиготность (H_0)	Ожидаемая гетерозиготность (H_e)
Якуты (N=228)	0,72312 ± 0,00041	0,71942	0,73205
Буряты (N=100)	0,89498 ± 0,00022	0,77895	0,83982
Киргизы (N=100)	0,90239 ± 0,00020	0,79167	0,82793
Русские (N=100)	0,46388 ± 0,00026	0,75258	0,81652
Ханты (N=100)	0,18700 ± 0,00025	0,80000	0,84027
Кеты (N=50)	0,02248 ± 0,00015	0,65625	0,80506

Таблица 5 Приложения

Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта rs2070736 гена *DMPK* у больных МД, здоровых родственников и в популяционной выборке якутов

	Больные(N=87)	Здоровые родственники(N=50)	Популяционная выборка(N=228)
T	126 (72,4%)	66 (66,0%)	286 (61,9%)
G	48 (27,6%)	34 (34,0%)	170 (37,3%)
OR (CI: 95%)	-	-	1,26
RR (CI: 95%)	-	1,17	-
χ^2 (p)	-	1,81(p=0,17)	0,447 (p=0,22)
TT	38 (43,7%)	18 (34,9%)	75 (32,8%)
TG+GG	48 (56,3%)	34 (63,1%)	153 (67,2%)
χ^2 (p)	-	0,56 (p=0,4)	0,006 (p=0,7)

Примечание: OR - отношение шансов, RR –относительный риск заболевания, CI: 95% - 95% доверительный интервал, χ^2 - хи-квадрат, P – уровень значимости хи-квадрат (P<0,05), жирным шрифтом выделен предковый аллель.

Таблица 6 Приложения

Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта rs572634 гена *DMPK* у больных МД, здоровых родственников и в популяционной выборке якутов

	Больные(N=87)	Здоровые родственники(N=50)	Популяционная выборка(N=228)
T	140 (80,5%)	84 (84%)	412 (90,4%)
G	34 (19,5%)	16(16%)	44 (9,6%)
OR (CI: 95%)		-	1,7
RR (CI: 95%)		1,30	-
χ^2 (p)		1,95 (p=0,16)	1,49 (p=0,22)
TT	73 (83,9%)	38 (71,4%)	75 (32,8%)
TG+GG	14 (16,1%)	14 (28,6%)	153 (67,2%)
χ^2 (p)		1,57 (p=0,2)	1,05(p=0,2)

Примечание: OR - отношение шансов, RR –относительный риск заболевания, CI: 95% - 95% доверительный интервал, χ^2 - хи-квадрат, P – уровень значимости хи-квадрат (P<0,05), жирным шрифтом выделен предковый аллель.

Таблица 7 Приложения

Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта rs1799894 гена *DMPK* у больных МД, здоровых родственников и в популяционной выборке якутов

	Больные(N=87)	Здоровые родственники(N=50)	Популяционная выборка(N=228)
T	98 (56,3%)	36 (36%)	398(87,3%)
C	76 (43,7%)	64 (64%)	58 (12,7)
OR (CI: 95%)		-	4,99
RR (CI: 95%)		1,32	-
χ^2 (p)		3,19 (p=0,07)	17,52 (p=0,00002)
TT	17 (19,8%)	5 (9,7%)	45 (19,6%)
TG+GG	69 (80,2%)	47 (90,3%)	183 (80,4%)
χ^2 (p)		2,08(p=0,15)	0,02(p=0,8)

Примечание: OR - отношение шансов, RR –относительный риск заболевания, CI: 95% - 95% доверительный интервал, χ^2 - хи-квадрат, P – уровень значимости хи-квадрат (P<0,05), жирным шрифтом выделен предковый аллель.

Таблица 8 Приложения

Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта rs527221 гена *DMPK* у больных МД, здоровых родственников и в популяционной выборке якутов

	Больные(N=87)	Здоровые родственники(N=50)	Популяционная выборка(N=228)
C	156 (89,6%)	93 (93%)	378 (82,9%)
G	18 (10,4%)	7 (7%)	78 (17,1)
OR (CI: 95%)		-	1,61
RR (CI: 95%)		1,17	-
χ^2 (p)		0,57 (p=0,45)	3,06 (p=0,08)
CC	63 (73,2%)	41 (79,4%)	198 (86,8%)
CG+GG	24 (26,8%)	11 (20,6%)	30 (13,2%)
χ^2 (p)		0,44 (p=0,5)	0,39 (p=0,53)

Примечание: OR - отношение шансов, RR –относительный риск заболевания, CI: 95% - 95% доверительный интервал, χ^2 - хи-квадрат, P – уровень значимости хи-квадрат (P<0,05), жирным шрифтом выделен предковый аллель.

Таблица 9 Приложения

Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта rs915915 гена *DMPK* у больных МД, здоровых родственников и в популяционной выборке якутов

	Больные(N=87)	Здоровые родственники(N=50)	Популяционная выборка(N=228)
T	137 (78,8%)	63 (63%)	350 (76,8%)
G	37 (21,2%)	37 (37%)	106 (23,2%)
OR (CI: 95%)		-	2,59
RR (CI: 95%)		1,57	-
χ^2 (p)		3,17 (p=0,02)	9,11 (p=0,004)
TT	50 (58,1%)	26 (49,2%)	82 (35,8%)
TG+GG	36 (41,9%)	26 (50,8%)	146 (64,2%)
χ^2 (p)		0,82(p=0,36)	19,83(p=0,000)

Примечание: OR - отношение шансов, RR –относительный риск заболевания, CI: 95% - 95% доверительный интервал, χ^2 - хи-квадрат, P – уровень значимости хи-квадрат (P<0,05), жирным шрифтом выделен предковый аллель.

Таблица 10 Приложения

Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта rs10415988 гена *DMPK* у больных МД, здоровых родственников и в популяционной выборке якутов

	Больные(N=87)	Здоровые родственники(N=50)	Популяционная выборка(N=228)
C	96 (55,2%)	27 (27%)	396 (86,8%)
T	78 (44,8%)	73 (73%)	60 (13,2%)
OR (CI: 95%)		-	3,15
RR (CI: 95%)		1,42	-
χ^2 (p)		1,62 (p=0,06)	5,06 (p=0,01)
CC	73 (83,9%)	37 (71,4%)	75 (32,8%)
CT+TT	19 (16,1%)	15 (28,6%)	153 (67,2%)
χ^2 (p)		1,55(p=0,21)	0,24(p=0,62)

Примечание: OR - отношение шансов, RR –относительный риск заболевания, CI: 95% - 95% доверительный интервал, χ^2 - хи-квадрат, P – уровень значимости хи-квадрат (P<0,05), жирным шрифтом выделен предковый аллель.

Таблица 11 Приложения

SNP-гаплотипы, выявленные у больных МД якутов
(с помощью EM алгоритма)

№	Гаплотип	Частота гаплотипа
1	TGCMCTC	0,00298
2	TTCNGTT	0,005198
3	GTCNGTT	0,005208
4	TTCNGTC	0,00522
5	TGTNCGT	0,005376
6	TTTNGTT	0,005615
7	GTTNCTC	0,005879
8	GTTMCTC	0,006147
9	TGCNNGT	0,010232
10	TTTNCGT	0,010771
11	TGTMCGC	0,011226
12	TGCMCGT	0,014809
13	GGCNCTT	0,018088
14	GTCNCTC	0,020477
15	TGCNGTT	0,020622
16	TTTMCTT	0,022203
17	TTTMGGC	0,02603
18	GTTMCGT	0,027448
19	TTCMCGC	0,027606
20	GTCNCGT	0,030744
21	TTCMCTC	0,030821
22	TTCNCTT	0,039424
23	TTCNCGT	0,054508
24	GTCMCTT	0,193301
25	TTTMCTC	0,389781

Таблица 12 Приложения

SNP-гаплотипы, выявленные у больных МД якутов
(с помощью анализа семейных данных)

№	Гаплотип	Частота гаплотипа
1	TGCMCTC	0,00298
2	TTCNGTT	0,005198
3	GTCNGTT	0,005208
4	TTCNGTC	0,00522
5	TGTNCGT	0,005376
6	TTTNGTT	0,005615
7	GTTNCTC	0,005879
8	GTTMCTC	0,006147
9	TGCNGGT	0,010232
10	TTTNCGT	0,010771
11	TGTMCGC	0,011226
12	TGCMCGT	0,014809
13	GGCNCTT	0,018088
14	GTCNCTC	0,020477
15	TGCNGTT	0,020622
16	TTTMCTT	0,022203
17	TTTMGGC	0,02603
18	GTTMCGT	0,027448
19	TTCMCGC	0,027606
20	GTCNCGT	0,030744
21	TTCMCTC	0,030821
22	TTCNCTT	0,039424
23	TTCNCGT	0,054508
24	GTCMCTT	0,193301
25	TTTMCTC	0,389781

Таблица 13 Приложения

SNP-гаплотипы здоровых родственников и их частоты

№	Гаплотип	Частота гаплотипа (%)
1	TTTCTC	23,8
2	GTCCTT	15,8
3	TTCCTT	9,2
4	TTCCGT	9,1
5	GTCCGT	10,1
6	GTCCTC	1,2
7	GTTCGT	5,4
8	TTTCTT	2,3
9	GTCGGT	2,6
10	TGCGTT	4,4
11	TTCCGC	1,1
12	GGCCTC	1,1
13	TTCGTC	1,2
14	GGCCGT	1,9
15	TGCGGT	2,8
16	TGCCTT	1,1
17	TGCCGT	2,9

Таблица 14 Приложения

SNP-гаплотипы, выявленные в якутской популяции

N	Гаплотип	Частота гаплотипа
1	TGCGGC	0,001584
2	TGCGTT	0,001786
3	TTTGTC	0,001822
4	TTTGGT	0,002002
5	TTTCTT	0,002918
6	GTTGGC	0,004534
7	TTCGTC	0,004686
8	TTCCGC	0,005235
9	GTCCTC	0,005298
10	TGCCGT	0,005326
11	TTTCGT	0,005951
12	GTCGGC	0,006758
13	TTCGTT	0,006811
14	GTTCGC	0,007291
15	TTTCGC	0,00732
16	GTCCGC	0,008981
17	TTTGTT	0,009355
18	TGTGGC	0,009852
19	GTCGGT	0,018689
20	TTCGGT	0,049191
21	TGCGGT	0,05288
22	GTCCTT	0,054892
23	TTCTT	0,062001
24	TTTCTC	0,07457
25	GTCCGT	0,275331
26	TTCCGT	0,314936

Таблица 15 Приложения

SNP-STR-гаплотипы, выявленные у больных МД якутов

N	Семья	Родство	SNP-гаплотип	STR-гаплотип	Совпадение
1	6	пробанд	T-T-T-C-T-C	8 3 6 m 9 1 2	да
2	8	пробанд	T-T-T-C-T-C	8 3 6 m 9 1 2	да
3	20	дочь	T/G-T-C-C-T-C/T	8 3 6 m 9 1 2	нет
4	7	сын	T-T-T/C-C-T-C/T	8 3 6 m 9 1 2	нет
5	43	мать	T-T-T-C-T-C	8 3 6 m 9 1 2	да
6	5	пробанд	T-T-T-C-T-C	8 3 6 m 9 1 2	да
7	38	пробанд	T-T-T/C-G/C-G-T/C	8 3 6 m 9 1 2	нет
8	45	племянник	T-T-T-C-T-C	8 3 6 m 9 1 2	да
9	10	сибс	T-T-T-C-T-C	8 3 6 m 9 1 2	да
10	39	пробанд	T-T-T-C-T-C	8 3 6 m 9 1 2	да
11	12	мать	T/G-T-T/C-C-T/G-T/C	8 3 6 m 9 1 2	нет
12	11	дочь	T-T-T-C-T-T	8 3 6 m 9 3 1	да
13	30	пробанд	T/G-T-T/C-C-G-T/C	8 3 6 m 9 3 1	нет
14	1	пробанд	T-T-T-C-T-C	5 3 6 m 9 1 2	да
15	9	пробанд	T-T-T/C-C-T-T/C	5 3 6 m 9 1 2	нет
16	44	мать	T-T-T-G-T/G-T/C	6 7 6 m 9 1 4	нет
17	14	пробанд	T/G-T-T/C-C-T-T/C	8 7 6 m 9 3 4	нет
18	34	пробанд	T-T-T/C-C-T-T/C	8 7 6 m 9 3 4	нет
19	28	пробанд	G-T-C-C-T-C	8 7 6 m 9 3 4	да
20	3	сибс	T-T-C-C-T-C	6 7 6 m 3 1 4	да
21	15	пробанд	T/G-T/G-T/C-C-T-T/C	6 7 6 m 3 1 4	нет
22	23	пробанд	T-T-T-C-T-C	6 7 6 m 3 1 4	да
23	4	пробанд	T-T-T-C-T-C	5 8 6 m 5 4 1	да

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит глубокоуважаемого академика РАМН, директора ФГБНУ «НИИ МГ» Валерия Павловича Пузырева за любезно предоставленную возможность защиты диссертационной работы в стенах одного из престижных институтов медицинской генетики в России. Автор выражает искреннюю благодарность за помощь в написании работы, советы и критические замечания научному руководителю д-ру биол. наук, проф. Вадиму Анатольевичу Степанову. Автор выражает благодарность ученому секретарю диссертационного совета канд. биол. наук, Ирине Юрьевне Хитринской за методическую помощь в подготовке документов к защите. Автор выражает огромную благодарность сотрудникам лабораторий эволюционной и популяционной генетики НИИ медицинской генетики за методическую помощь и ценные советы при обсуждении результатов работы. Особую благодарность автор выражает научному сотруднику, канд. биол. наук Марии Геннадьевне Сваровской за оказанную помощь и поддержку в течение всей работы. Автор выражает искреннюю признательность и слова благодарности заведующей медико-генетической консультации ПНЦ ГБУ РС(Я) РБ№1-НЦМ канд. мед. наук Айтилине Лукичне Сухомясовой, сотрудникам отдела молекулярной генетики ФГБНУ «ЯНЦ КМП» д-ру мед. наук Надежде Романовне Максимовой, канд. мед. наук Анне Николаевне Ноговицыной, врачам-генетикам медико-генетической консультации, за участие в научно-исследовательской работе и организационную помощь.