

УДК 616-056.76:616.15-008.1

## ПОПУЛЯЦИОННАЯ ЧАСТОТА И ВОЗРАСТ МУТАЦИИ с.806С>Т В ГЕНЕ *CYB5R3*, ЯВЛЯЮЩЕЙСЯ ПРИЧИНОЙ НАСЛЕДСТВЕННОЙ МЕТГЕМОГЛОБИНИИ ПЕРВОГО ТИПА В ЯКУТИИ

© 2013 г. Н. М. Галеева<sup>1</sup>, М. И. Воевода<sup>2</sup>, М. Г. Спиридонова<sup>3</sup>, В. А. Степанов<sup>3</sup>, А. В. Поляков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Медико-генетический научный центр Российской академии медицинских наук, Москва 115478  
e-mail: nelia82@mail.ru

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт терапии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск 630089  
e-mail: mvoevoda@yandex.ru

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Томск 634050  
e-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 21.05.2012 г.

Наследственная метгемоглобинемия первого типа (наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия, НЭМ) – аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся резким снижением активности растворимой формы NADH-цитохром-b5-редуктазы и клинически проявляющееся цианозом кожных покровов и слизистых оболочек. Молекулярно-генетической причиной заболевания в Якутии является мутация с.806С>Т в гене *CYB5R3*, накопление которой обусловлено “эффектом основателя”. В настоящей работе на основе анализа неравновесия по сцеплению 13 микросателлитных маркеров, фланкирующих ген *CYB5R3*, с заболеванием установлен гаплотип хромосомы основателя. Определено время распространения данной мутации в Якутии, которое составило  $285 \pm 135$  лет. Установлена частота гетерозиготного носительства мутации с.806С>Т в гене *CYB5R3*, составившая 55 на 1000 здоровых якутов и рассчитана частота наследственной метгемоглобинемии первого типа в Якутии (1 на 1250 якутов).

DOI: 10.7868/S0016675813030065

Наследственная метгемоглобинемия первого типа (наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия, НЭМ), метгемоглобинемия Гибсона, – аутосомно-рецессивное заболевание, которое характеризуется резким снижением активности растворимой формы NADH-цитохром-b5-редуктазы в эритроцитах (меньше 10%) и умеренным – в других клетках (20–60%) [1]. Клинически проявляется цианозом кожных покровов и слизистых оболочек, головной болью, быстрой утомляемостью, одышкой [2]. Наряду с первым типом в мире часто встречается второй тип заболевания, характеризующийся резким снижением активности или инактивацией растворимой и мембрано-связанной форм данного фермента во всех тканях организма и клинически помимо цианоза – задержкой интеллектуального развития, микроцефалией, нарушением развития нервной системы [3, 4].

В настоящее время описано более 50 мутаций в гене *CYB5R3*, из них около 30 приводят к первому типу заболевания. По данным мировой литературы, первый тип чаще ассоциирован с миссенс-мутациями, которые равномерно распределены в гене *CYB5R3*. При втором типе в гене *CYB5R3* вы-

являют нонсенс-мутации, мутации со сдвигом рамки считывания, крупные делеции и мутации сайта сплайсинга. Также для проявления того или иного типа заболевания важна комбинация мутаций у конкретного пациента.

Единичные случаи НЭМ встречаются в популяциях различных стран мира. Широкое распространение заболевание имеет на территории Аляски среди эскимосов и индейцев племени ингалик, относящихся к народу атапаска, проживающих в долинах рек Кускоквим и Юкон [5]. В России проблема данного заболевания наиболее остро стоит в Республике Саха (Якутия), где частота заболевания среди коренного населения составляет 1 : 5677 [6].

Генетические исследования коренного населения Якутии выявили пониженное генетическое разнообразие якутов вследствие выраженного эффекта основателя, особенно заметного в наследовании унитарных линий Y-хромосомы и мтДНК [7, 8]. Выделяют четыре основные этнографические группы якутов: центральные якуты Лено-Амгинского междуречья (проживающие между Леной, нижним Алданом и Амгой, а также на прилегающем левобережье Лены), олёкмин-

**Таблица 1.** Последовательности праймеров для амплификации полиморфных маркеров, фланкирующих ген *CYB5R3*

Фрагмент ДНК	Последовательность праймеров
D22S276	F-AACAAATATGAAGTACTTCTTACCAC R-CTGCTCTTTAAGTTTCTTGACCTC
D22S1179	F-AAATAGAAATGTGTATCTGTACATGC R-GAGCCTCAGGGAATCTATGACTC
D22S418	F-ACAGAGAGGAATTGGAATCCCAC R-AAGTGAGTGGCTTGCCCAAAGC
D22S1178	F-GGAGGGCAGTGAAAATACCTCAC R-CTGGTATTTGTGGAGCATCTTGTC
D22S1177	F-ATCCTCTCAGTTGTGCTATCACC R-AAGCAGGTGAAAATCCTGCTCTC
D22S1156	F-GTAGTCACACGAGGCAGAGGC R-AGACACACTGGCCCGATTGTC
D22S272	F-CTGAGTTTTGTTTGCCTGGCAC R-AATGCACGACCCACCTAAAGGC
D22S284	F-ATGGGTATTTAACTTCTCTACACAG R-GCTCTCTTGAGGTCGTTACATCA
D22S1140	F-TGCTGGCACTGTCTCTGTCTAC R-CAGGCAGGGTCTCTGGTGTAC
D22S274	F-TTGATGCTGCAATGAGCCGAGAT R-TTCATAGATAGTCACATTTCAAGTGA
D22S928	F-TTGCTCCAGTTTTTCTCTCTCC R-ATGGTTATGAAGATGGCTAGTAC
D22S1141	F-GTCTGGAAGTGTCTGCGAGTTC R-AGAAGGATACACAGGCCGTCTC
D22S692	F-GGCAATAGAGCAAACTTCCCATC R-CGGTGGACTAGCCAATATCCTC

ские (в бассейне Олёкмы), вилюйские (в бассейне Вилюя), северные (в тундровой зоне бассейнов рек Анабар, Оленёк, Колыма, Яна, Индигирка). Наибольшая частота больных метгемоглобинемией наблюдается у представителей вилюйской группы якутов [9].

В 2006 г. была определена молекулярно-генетическая причина НЭМ в Якутии – мутация с.806С>Т в гене *CYB5R3*. Анализ гаплотипов хромосом больных выявил влияние эффекта основателя на накопление мутации в данной популяции [10].

Цель данной работы – определение возраста мутации с.806С>Т и оценка частоты ее носительства у представителей различных групп якутов и других географически близких популяциях.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выявления аллелей, ассоциированных с заболеванием, а также для оценки возраста мутации были использованы образцы ДНК 16 больных и 8 здоровых родственников из 16 семей с НЭМ. Для исследования частоты гетерозиготного носительства мутации с.806С>Т в гене *CYB5R3*, а также для определения популяционных частот аллелей маркеров, выбранных для изучения возраста данной мутации, использовали образцы ДНК 433 якутов, 32 коряков, 39 канадских эскимосов и 49 чукчей. Все индивидуумы считают себя коренными представителями соответствующих этнографических групп. Все образцы ДНК были получены с информированного согласия исследуемых лиц.

Амплификацию необходимых фрагментов ДНК проводили методом ПЦР на программируемом термоциклере МС2 фирмы “ДНК-технология” (Россия) в объеме 25 мкл и 15 мкл реакционной смеси следующего состава: 0.1–1.0 мкг геномной ДНК; по 0.25 мкМ каждого оригинального олигопраймера; по 200 мкМ каждого нуклеозидтрифосфата; 1.0 ед. активности ДНК-полимеразы Biotaq (“БиоМастер”); буфер для ПЦР (67 мМ трис-НСI; 16.6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.01% твин-20; рН 8.8); 20–30 мкл минерального масла. Концентрация MgCl<sub>2</sub> в реакциях варьировала от 1.6 до 4 мМ, длина полученных фрагментов составляла от 86 до 142 пн, отжиг праймеров проводился при температуре от 63 до 65°C. Последовательности праймеров указаны в табл. 1.

Анализ гаплотипов хромосом, несущих мутацию с.806С>Т в гене *CYB5R3*, проводили с использованием 13 полиморфных маркеров, фланкировавших ген *CYB5R3* в области размером 10.19 сМ по карте Marshfield (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). 12 полиморфных маркеров содержали СА-повторы и один – АТАГ-повторы. Все маркеры были выбраны с помощью портала NCBI, их генетическая локализация на хромосоме была оценена с помощью карты Marshfield того же портала.

Для быстрой идентификации мутации с.806С>Т в гене *CYB5R3* была разработана скрининговая тест-система, в основе которой лежит мультиплексная пробозависимая лигазная реакция с последующей амплификацией (Multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA). В основе метода лежит гибридизация MLPA-проб с исследуемой последовательностью ДНК, их “сшивание” с помощью фермента лигазы и последующая амплификация продуктов лигазной реакции методом ПЦР. Каждая проба состоит как минимум из двух фрагментов: комплементарных исследуемой последовательности ДНК и ПЦР-праймеру. Также в одну из проб добавляли некомплементарную вставку для удобства последующей

регистрации продуктов реакции. Для идентификации мутации с.806С>Т использовали три MLPA-пробы:

1) общую обратную пробу MLPDIA R (GCTGGTGTGCTGATGTGTGGCCGATGCGATCCGATGCCTTCATG),

2) пробу на норму MLPDIA NF (GTTCG-TACGTGAATCGCGGTACGGCGGCCACCC-CCAGGAGGAGCC) и

3) на мутацию MLPDIA MF (GTTCGTACGT-GAATCGCGGTACCCACCCCCAGAGGAGGA-GCT).

Длина амплифицированных фрагментов составляла 90 пн в норме и 83 пн при мутации.

Дизайн праймеров для маркеров, фланкирующих ген *CYB5R3*, олигонуклеотидных проб для лигирования и универсальных праймеров осуществлен в лаборатории ДНК-диагностики МГНЦ РАМН, синтез — в ООО “Синтол” (Москва), ЗАО “Евроген” (Москва).

Лигирование необходимых фрагментов ДНК проводили на программируемом термоциклере MC2 фирмы “ДНК-технология” (Россия) в 5 мкл объема реакционной смеси следующего состава: 1× реакционный буфер (20 мМ трис-НСl (рН 7.5), 20 мМ КCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Igepal, 0.01 мМ гАТР, 1 мМ ДТТ), по 5 фМ каждой из трех специфичных проб, 0.04 ед. активности термофильной ДНК-лигазы Pfu (“Stratagene”), 0.1–1.0 мкг геномной ДНК, 20–30 мкл минерального масла.

Лигазная реакция осуществлялась в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C – 5 мин, затем лигирование при 63°C – 1 ч.

Для анализа электрофоретической подвижности амплификационных фрагментов, содержащих СА- и АТАG-повторы, использовали 8%-ный гель с соотношением акриламид : бисакриламид – 29 : 1.3. Регистрацию продуктов ПЦР после лигирования проводили с помощью ПДАФ-анализа в 7%-ном геле с соотношением акриламид : бисакриламид – 29 : 1.

Для выявления аллелей, ассоциированных с НЭМ, проводили семейный анализ полиморфных маркеров и определяли гаплотипы, характерные для хромосом, несущих мутацию с.806С>Т. При сравнении частот аллелей в хромосомах с мутацией и в популяционных хромосомах использовали точный критерий Фишера и  $\chi^2$ -тест для двупольной таблицы. Для оценки неравновесности по сцеплению для полиморфных маркеров в группе больных использовали формулу, предложенную Bengtsson и Thomson [11]:

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

где  $\delta$  – мера неравновесности сцепления,  $P_D$  – частота ассоциированного аллеля среди хромосом с

мутацией,  $P_N$  – частота этого же аллеля среди хромосом без мутации.

Для расчета возраста мутации применяли один из подходов, основанный на понятии “генетических часов” [12], использующий изменение неравновесия по сцеплению полиморфных маркеров с локусом заболевания с момента появления мутации в популяции до настоящего времени. В момент возникновения мутации в популяции неравновесие по сцеплению полиморфных маркеров с локусом заболевания полное ( $\delta_0 = 1$ ). Поскольку со временем из поколения в поколение оно постепенно уменьшается (размывается), можно вычислить то количество поколений, за которое произошло наблюдаемое уменьшение значения  $\delta$ .

Если считать, что размывание неравновесия по сцеплению происходило исключительно в результате рекомбинационных событий, то  $\delta_g = (1 - \theta)^g \delta_0$ , где  $\delta_g$  – значение неравновесия по сцеплению в  $g$ -том поколении. Поскольку  $\delta_0 = 1$ ,

$$g = \frac{\lg \delta_g}{\lg(1 - \theta)}$$

или

$$g = \frac{\lg[1 - Q/(1 - P_N)]}{\lg(1 - \theta)}, \quad (2)$$

где  $g$  – число поколений со времени возникновения мутации;  $Q$  – доля мутантных хромосом без аллеля гаплотипа основателя;  $P_N$  – частота аллеля основателя в популяции;  $\theta$  – рекомбинационная фракция.

Алгоритм, использующий формулу (2) для расчета возраста мутации, впервые был описан и применен Risch et al. [13].

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В предыдущем исследовании [10] для больных из Якутии было выявлено статистически достоверное неравновесие по сцеплению по маркерам D22S418, D22S1179, D22S1178, D22S276, тесно сцепленных с геном заболевания. У 31 из 32 больных был обнаружен один и тот же гаплотип 4-4-1-5 по этим маркерам в гомозиготном состоянии. Такое неравновесие по сцеплению объясняется, скорее всего, эффектом основателя, а высокая частота мутантных хромосом в популяции – дрейфом генов.

У одного больного для двух маркеров – D22S1178, D22S276, расположенных на расстоянии 48.19 и 47.31 сМ от гена в сторону теломеры, было

**Таблица 2.** Аллельные частоты микросателлитных маркеров из области гена *CYB5R3* на хромосомах с мутацией (мут.) и хромосомах популяционной (поп.) выборки якутов

Ал- лель	D22S692		D22S1177		D22S1156		D22S272		D22S284		D22S1140		D22S274		D22S928		D22S1141	
	мут.	поп.	мут.	поп.	мут.	поп.	мут.	поп.	мут.	поп.	мут.	поп.	мут.	поп.	мут.	поп.	мут.	поп.
1		7.5	15.6	9.2		0.8	8.8	16.4		1.75	5.9	20.8	5.9	13.3		0.9		3.3
2	12.5	31.9		5		0.8	8.8	6									20.6	23.3
3	12.5	22.5		11.7	20.6	72.5			3.1	17.5							2.9	11.7
4	<b>71.9</b>	25.6	15.6	52.5			5.9	21.5	3.1	0.9		0.8					64.7	55
5	3.1	12.5	3.1	10		6.7	<b>76.5</b>	44	3.1	7		4.2	8.1				5.9	3.3
6			6.3	8.3	<b>79.4</b>	17.5		3.5		45.6	<b>91.2</b>	35	<b>61.7</b>	20	34.4	18.9	5.9	1.7
7			<b>59.4</b>	3.3						13.2		2.9	8.8	21.7				0.9
8								6		7.9		37.5	2.9	12.5				0.8
9						1.7		0.9	<b>90.7</b>	6.15			11.8	24.2				
10								0.9				1.7	8.8	5				
11								0.9						0.8				
12														0.8		0.9		
13														1.7	34.4	23.5		
14															31.2	43.2		
15																	1.8	
16																	2.7	
17																		

Примечание. Полужирным шрифтом выделены значения частот аллелей, характеризующихся наибольшей неравновесностью сцепления с локусом НЭМ.

выявлено одно рекомбинационное событие на хромосоме с мутацией с.806С>Т.

В данном исследовании был проведен анализ еще для девяти дополнительных микросателлитных маркеров, четыре из которых расположены в сторону центромеры от гена и пять – в сторону теломеры, в семьях с НЭМ и в популяционной выборке.

Популяционную выборку составили хромосомы 60 здоровых неродственных якутов и не являющихся родственниками больных.

Результаты анализа для маркеров D22S692, D22S1177, D22S1156, D22S272, D22S284, D22S1140, D22S274, D22S928, D22S1141 в виде аллельных частот среди хромосом, несущих мутацию, и хромосом популяционной выборки якутов представлены в табл. 2.

При определении аллельного состава гаплотипа основателя по маркерам D22S692, D22S1177, D22S1156, D22S272, D22S284, D22S1140, D22S274, D22S928, D22S1141 руководствовались следующим: поскольку в момент появления в популяции мутации формируется полное неравновесие по сцеплению этой мутации с аллелями маркеров, в результате составляющими гаплотип основателя, и данное неравновесие в результате рекомбинаций размывается с течением времени,

в настоящее время аллели из гаплотипа основателя должны характеризоваться максимальной неравновесностью сцепления с локусом заболевания по сравнению с другими аллелями маркеров. Поэтому мы определили значения  $\delta$  и применили точный критерий Фишера и  $\chi^2$ -тест для двупольной таблицы (см. раздел “Материалы и методы”) для каждого аллеля всех исследованных маркеров, и при определении предкового аллеля учитывали наибольшее положительное значение  $\delta$  и наименьшее  $p$ .

Для аллелей 4, 7, 6, 5, 9, 6 и 6 по маркерам D22S692, D22S1177, D22S1156, D22S272, D22S284, D22S1140, D22S274 соответственно было выявлено статистически достоверное неравновесие по сцеплению ( $p < 0.05$ ), а по маркерам D22S928 и D22S1141 ни для одного аллеля статистически достоверное неравновесие по сцеплению выявлено не было ( $p > 0.05$ ). Наиболее значимые результаты представлены в табл. 3.

Учитывая данные, полученные в предыдущей работе [10], а именно гаплотип 4-4-1-5 на хромосомах больных по маркерам D22S418, D22S1179, D22S1178, D22S276 соответственно, наиболее вероятный гаплотип хромосомы основателя 4-7-6-5-9-4-4-1-5-6-6 по маркерам D22S692-D22S1177-D22S1156-D22S272-D22S284-D22S276-D22S1178-D22S418-D22S1179-D22S1140-D22S274.

“Возраст” мутации

Для оценки возраста мутации с.806С>Т в гене *CYB5R3* в Якутии была использована формула, впервые примененная для расчета возраста мутации при исследовании идиопатической торзионной дистонии у евреев ашкенази [13].

Все выявленные гаплотипы хромосом с мутацией представлены в табл. 4, выделенная область представляет собой сохраненную часть гаплотипа основателя.

При расчете возраста не учитывались данные по маркерам D22S418, D22S1179, D22S1178, D22S276, D22S284 и D22S1140, поскольку для них не было выявлено или выявлено малое количество рекомбинационных событий на хромосомах с мутацией.

Также при определении возраста мутации не учитывались данные по маркерам D22S928 и D22S1141, так как для них не было выявлено статистически достоверное неравновесие по сцеплению ( $p > 0.05$ ). Полученные значения числа поколений показаны в табл. 5.

Таким образом, при расчете по формуле, применяемой Risch et al. [13], среднее значение числа поколений составило 11.4 со среднеквадратическим отклонением 5.4 поколений (табл. 5).

Исходя из того, что средняя продолжительность одного поколения составляет 25 лет, время, за которое произошло накопление мутации в Якутии, — около  $285 \pm 135$  лет. Учитывая, что средний год рождения всех больных 2000, то период начала распространения мутации соответствует концу XVII—началу XVIII века ( $1715 \text{ год} \pm 135 \text{ лет}$ ).

Популяционная частота НЭМ в Якутии

В данном исследовании был проведен анализ частоты гетерозиготного носительства мутации с.806С>Т у представителей центральной (Усть-Алданский улус), вилюйской и северной групп якутов. В ходе работы была исследована ДНК 433 здоровых якутов. В результате среди 33 северных якутов было обнаружено два гетерозиготных носителя, среди 270 центральных якутов — 16 и среди 130 вилюйских якутов — шесть гетерозиготных носителей. При попарном сравнении трех выборок методом  $\chi^2$  статистически достоверных различий между ними не выявлено. По этой причине авторы сочли возможным объединить три выборки, и частота гетерозиготного носительства мутации с.806С>Т в гене *CYB5R3* составила 55 на 1000 здоровых якутов.

Анализ частоты гетерозиготного носительства мутации с.806С>Т был проведен в двух географически близких якутской популяциях коряков и чукчей, а также среди представителей канадских эскимосов. В данных популяциях мутация не обнаружена.

Таблица 3. Неравновесие по сцеплению аллелей маркеров с локусом НЭМ среди якутов

Маркер	Аллель	<i>p</i>	$\delta \pm 90\% \text{ ДИ}$
D22S692	4	<0.001*	0.64 ± 0.18
D22S1177	7	2.86e <sup>-12</sup>	0.58 ± 0.15
D22S1156	6	3.7e <sup>-11</sup>	0.75 ± 0.14
D22S272	5	0.0009	0.58 ± 0.22
D22S284	9	1.03e <sup>-20</sup>	0.9 ± 0.09
<i>CYB5R3</i>	с.806С>Т		
D22S1140	6	2.47e <sup>-9</sup>	0.86 ± 0.13
D22S274	6	0.0000066	0.52 ± 0.17
D22S928	6	0.307	0.2 ± 0.18
D22S1141	4	0.33	0.22 ± 0.33

Примечание. *p* — значения для двустороннего варианта точного критерия Фишера, звездочкой отмечена ошибка по распределению  $\chi^2$ ,  $\delta$  — мера неравновесности сцепления аллелей полиморфных маркеров с локусом заболевания. ДИ — доверительный интервал. Полужирным шрифтом выделены маркеры с уровнем значимости  $p < 0.01$ .

ОБСУЖДЕНИЕ

НЭМ имеет широкое распространение в Якутии, обусловленное накоплением единственной мутации с.806С>Т в гене *CYB5R3* в результате эффекта основателя. В настоящей работе на основе анализа неравновесия по сцеплению аллелей 13 микросателлитных маркеров, фланкирующих ген *CYB5R3*, с заболеванием установлен гаплотип хромосомы основателя и оценено время распространения данной мутации в Якутии. Наиболее вероятным представляется гаплотип основателя 4-7-6-5-9-4-4-1-5-6-6 по маркерам D22S692-D22S1177-D22S1156-D22S272-D22S284-D22S276-D22S1178-D22S418-D22S1179-D22S1140-D22S274.

Время начала распространения мутации с.806С>Т в Якутии составило, по нашим данным,  $285 \pm 135$  лет. Период начала распространения мутации соответствует концу XVII—началу XVIII века ( $1715 \text{ год} \pm 135 \text{ лет}$ ).

На сегодняшний день известно несколько работ, в которых проводилась оценка возраста мутаций при различных болезнях, распространенных среди коренного населения Якутии. Наиболее вероятный “возраст” начала экспансии гаплотипа основателя с мутацией q. — 3179 (IVS1+1G>A) в гене *GJB2*, приводящей к нейросенсорной несиндромальной тугоухости, в популяции якутов составил 800 лет [14]. Возраста мутаций с.4582insT в гене *CUL7*, ответственном за развитие ЗМ-синдрома, и с.G5741>A в гене *NAG*, ответственном за развитие SCOP синдрома, равны соответственно 342.5 и 945 лет [15]. Полученные результаты можно разделить на две группы: возраст в районе 900 лет

Таблица 4. Полные гаплотипы всех хромосом с мутацией с.806С>Т в гене *CYB5R3*

Пробанд	D22S692	D22S1177	D221156	D22S272	D22S284	D22S276	D22S1178	<i>CYB5R3</i>	D22S418	D22S1179	D22S1140	D22S274	D22S928	D22S1141
сМ	41.42	42.81	44.32	45.82	46.42	47.31	48.19	48.19	48.19	48.19	49.37	51.54	52.08	52.61
2027	4	7	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	6	6	4
938	4	7	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	6	6	4
870AA	4	7	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	6	6	4
539	4	7	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	6	6	4
2567	4/5	7	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	6	6	4
938	4	4	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	6	6	4
870AA	3	4	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	6	6	4
2567	5/4	6	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	6	6	4
271	4	7	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	6	14	2
271	4	7	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	6	14	2
1594	4	7	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	7/1	14	4
539	4	7	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	9	15	4
3797	4	7	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	1	14	2
3797	4	7	6	5	9	4	4	mut	1	5	1	10	14	5
1592	4	7	6	5	9	4/5	4/1	mut	1	5	7	6	6	4
161		7	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	9	14	2
161		7	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	9	14	4
1844	4	7	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	8	6/15	4
348	4/3	7/1	6/3	5/2	9	4	4	mut	1	5	6	6/10	15/14	5
221	2/3	1	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	6	4/15	4
87AA	3	1/4	6/3	5	9	4	4	mut	1	5	6	6/7	5	6
221	3/2	1	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	7	15/4	6
1594	4	6	6	5	9	4	4	mut	1	5	6	1/7	14	4
1229	4	1	3	5	9	4	4	mut	1	5	6	6	15	2
1229	2	7	3	2	9	4	4	mut	1	5	6	6	6	4
87AA	2	4/1	3/6	1	9	4	4	mut	1	5	6	7/5	14	3
348	3/4	1/7	3/6	2/5	9	4	4	mut	1	5	6	10/5	14/15	4
2027	4	7	3	2	9	4	4	mut	1	5	1	9	15	4
1844	4	7	3	2	9	4	4	mut	1	5	6	6	15/6	4
1163	4	4/5	3/6	1/4	3/5	4	4	mut	1	5	6	6	15	4
1163	4	5/4	6/3	4/1	5/3	4	4	mut	1	5	6	6	15	4
1592	4	4	6	1	4	5/4	1/4	mut	1	5	6	6	14	2

Примечание. Полужирным шрифтом выделены аллели, принадлежащие гаплотипу основателя. Координаты маркеров указаны в сМ по карте Marshfield.

(q. – 3179 (IVS+1G>A) в гене *GJB2* и с.G5741>A в гене *NAG*) и 300 лет (с.4582insT в гене *CUL7* и с.806С>Т в гене *CYB5R3*). По мнению этнографа Г.В. Ксенофонтова, якуты представляют собой народ смешанного происхождения, включающий в себя три волны тюркоязычных переселенцев:

первое заселение якутами бассейна реки Вилюй началось в конце I в. н.э., вторая волна якутов переселилась на среднюю Лену и Вилюй из Прибайкалья в VI–VII вв. н.э., третий этап переселения якутов произошел в XI–XII вв. в связи с усилением монгольских племен и полным вытеснением

предков якутов с первоначального места проживания [16]. Приход русских в XVII веке вызвал новую волну миграции якутов, обусловленную принесенными заболеваниями (корь и оспа), а также ясачным гнетом. Таким образом, полученные в нашей работе данные совпадают с историческими, в которых описаны миграции якутского населения в XI и XVII вв.

В данном исследовании был проведен анализ частоты гетерозиготного носительства мутации с.806C>T у представителей центральной, вилюйской и северной групп якутов. По литературным данным, наиболее высокая частота аутосомно-рецессивных болезней в Якутии должна наблюдаться в популяциях центральных и вилюйских якутов. Наибольшее количество больных НЭМ проживает в сельской местности, преимущественно в Вилюйском районе. По нашим данным, частота гетерозиготного носительства НЭМ первого типа у северных якутов оказалась приблизительно равной частоте у вилюйских и центральных якутов. Такая высокая частота носительства среди северных якутов возможно связана с малым объемом используемой в данном исследовании выборки. Таким образом, частота гетерозиготного носительства мутации с.806C>T среди якутов составляет 55 : 1000, а расчетная частота заболевания составляет 1 : 1250. По литературным данным при обследовании 363 316 якутов было обнаружено 64 больных (из 57 семей) НЭМ первого типа, и распространенность заболевания составила 1 : 5677 якутов [6]. Такое расхождение данных возможно связано с гиподиагностикой НЭМ, вызванной варьированием клинических проявлений у больных.

Дополнительно анализ частоты гетерозиготного носительства мутации с.806C>T был проведен в двух географически близких якутской популяциях коряков и чукчей. В данных популяциях мутация не обнаружена. Учитывая географическую и историческую близость, а также сведения о распространенности метгемоглобинемии первого типа среди эскимосов Аляски, была исследована ДНК представителей канадских эскимосов. В данной популяции мутация с.806C>T также обнаружена не была.

Отсутствие носителей мутации среди представителей популяций коряков и чукчей подтверждает исторически разное происхождение данных народов. Отсутствие мутации у представителей канадских эскимосов говорит либо о гетерогенности эскимосов, либо о существовании другой мутации, вызывающей метгемоглобинемию у данного народа. Однако возможность существования у эскимосов другой мутации ставит вопрос о преимуществе гетерозиготного носительства мутации в данном гене в условиях крайнего Севера.

**Таблица 5.** Число поколений (g) и время начала распространения мутации (“Возраст”) с.806C>T в гене *CYB5R3* в Якутии

Маркер	g	“Возраст”
D22S692	6.33	158
D22S1177	9.86	246.5
D22S1156	7.27	182
D22S272	14.44	361
D22S274	19.08	477
Среднее значение	11.4 ± 5.4	285 ± 135

Работа частично финансируется Минобрнауки РФ (ГК № 16.512.11.2033 и № 11.519.11.2036).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dekker J., Eppink M.H., van Zwieten R. et al. Seven new mutations in the nicotinamide adenine dinucleotide reduced-cytochrome b(5) reductase gene leading to methemoglobinemia type I // *Blood*. 2001. № 97. P. 1106–1114.
2. Kugler W., Pekrun A., Laspe P. et al. Molecular basis of recessive congenital methemoglobinemia, types I and II: Exon skipping and three novel missense mutations in the NADH-cytochrome b5 reductase (diaphorase 1) gene // *Hum. Mutat*. 2001. V. 17. P. 348.
3. Hultquist D.E., Passon P.G. Catalysis of methaemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome B5 and cytochrome B5 reductase // *Nat. New Biol*. 1971. V. 229. P. 252–254.
4. Kaplan J.C., Leroux A., Beauvais P. Clinical and biological forms of cytochrome b5 reductase deficiency // *C.R. Seances Soc. Biol. Fil*. 1979. V. 173. P. 368–379.
5. Scott E.M. The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia // *J. Clin. Invest*. 1960. V. 39. P. 1176–1179.
6. Тарская Л.А., Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И. и др. Структура и разнообразие наследственной патологии в Республике Саха (Якутия) // *Генетика*. 2004. Т. 40. № 11. С. 1530–1539.
7. Пузырев В.П., Степанов В.А., Голубенко М.В. и др. Линии мтДНК и Y-хромосомы в популяции якутов // *Генетика*. 2003. Т. 39. № 7. С. 975–981.
8. Харьков В.Н., Степанов В.А., Медведева О.Ф. и др. Происхождение якутов: анализ гаплотипов Y-хромосомы // *Мол. биология*. 2008. Т. 42. № 2. С. 226–237.
9. Банищикова Е.С. Особенности клинического течения и морфофункциональное состояние эритроцитов у детей с наследственной энзимопенической метгемоглобинемией: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2002. 11 с.
10. Галеева Н.М., Назаренко Л.П., Назаренко С.А. и др. Молекулярно-генетическая причина наследственной метгемоглобинемии первого типа в республике Саха (Якутия) // *Мед. генетика*. 2006. Т. 5. № 9 (51). С. 15–20.

11. *Bengtsson B.O., Thomson G.* Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases // *Tissue Antigens*. 1981. V. 18. P. 356–363.
12. *Labuda D., Zietkiewicz E., Labuda M.* The genetic clock and the age of the founder effect in growing populations: a lesson from French Canadians and Ashkenazim // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. V. 61. P. 768–71.
13. *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.
14. *Барашков Н.А., Федорова С.А., Джемилева Л.У. и др.* Реконструкция гаплотипа основателя с мутацией q.-3179(IVS1+1G>A) в гене *GJB2*, приводящей к аутосомно-рецессивной глухоте типа 1А, в популяции якутов // *Мед. генетика*. 2010. Т. 9. № 11 (101). P. 11–21.
15. *Максимова Н.Р.* Клинико-генеалогическая и молекулярно-генетическая характеристика этноспецифических форм наследственной патологии у якутов: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 2009. С. 29–30.
16. *Федорова С.А.* Генетические портреты народов Республики Саха (Якутия): анализ линий митохондриальной ДНК и Y-хромосомы. Якутск: ЯНЦ СО РАН, 2008. 73 с.

## Population Frequency and Age of c.806C>T Mutation in *CYB5R3* Gene As Cause of Recessive Congenital Methemoglobinemia in Yakutia

N. M. Galeeva<sup>a</sup>, M. I. Voevoda<sup>b</sup>, M. G. Spiridonova<sup>c</sup>, V. A. Stepanov<sup>c</sup>, and A. V. Polyakov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Research Center for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Science, Moscow, 115478 Russia*  
e-mail: [nelia82@mail.ru](mailto:nelia82@mail.ru)

<sup>b</sup> *Research Institute for Therapy, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Science, Novosibirsk, 630089 Russia*  
e-mail: [mvoevoda@yandex.ru](mailto:mvoevoda@yandex.ru)

<sup>c</sup> *Research Institute of Medical Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Science, Tomsk, 634050 Russia*  
e-mail: [vadim.stepanov@medgenetics.ru](mailto:vadim.stepanov@medgenetics.ru)

Type-I recessive congenital methemoglobinemia (RCM) is a rare autosomal disease characterized by a deficiency of the soluble form of nicotinate adenine dinucleotide (NADH)-cytochrome b5 reductase (b5R) and clinically manifests as cyanosis of skin and mucous membranes. In the Russian Federation, type-I RCM is widely disturbed in Yakutia due to the local founder effect. The molecular genetics cause of type-I RCM in Yakutia is mutation c.806C>T in the *CYB5R3* gene. In this work we used 13 polymorphic markers, which flanking the *CYB5R3* gene to establish the founder haplotype. The age of the mutation was estimated as about  $285 \pm 135$  years. In this work, we have evaluated the frequency of the c.806 C>T mutation in Yakutia, which averaged 55 : 1000 Yakuts. The calculated frequency of disease was 1 : 1250 Yakuts.