

2(26) ` 2009

YAKUT MEDICAL JOURNAL



# ЯКУТСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ

Учредитель  
Якутский научный центр  
комплексных медицинских проблем  
Сибирского отделения  
Российской академии медицинских наук

Соучредители:  
Министерство здравоохранения РС(Я),  
Медицинский институт ЯГУ им. М.К. Аммосова,  
НПЦ «Фтизиатрия» МЗ РС(Я), Республиканский  
центр по профилактике и борьбе со СПИД  
МЗ РС(Я), ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии  
в РС(Я)», ОАО ГСМК «Сахамедстрах»

Главный редактор  
Томский М.И.

Редакционная коллегия:  
Заместители главного редактора:  
Аргунов В.А., Петрова П.Г.  
Научный редактор  
Платонов Ф.А.  
Зав. редакцией и ответственный секретарь  
Николаев В.П.

Редакционный совет:  
Александров В.Л., Гусев Е.И. (Москва),  
Иванов П.М., Ивашкин В.Т. (Москва),  
Игнатьев В.Г., Измеров Н.Ф. (Москва), Лугинов Н.В.,  
Миорова Г.Е., Михайлова Е.И., Никитин Ю.П.  
(Новосибирск), Пальшин Г.А., Пузырёв В.П.  
(Томск), Тихонов Д.Г., Тырылгин М.А.,  
Ханды М.В., Хуснутдинова Э.К. (Уфа)

Редактор  
Чувашова И.И.

Перевод  
Семенов Т.Ф.

Обложка Игнатьева В.Н.

Компьютерная верстка  
Николашкиной А.А.

Адрес редакции:  
677019, г. Якутск, Сергеляхское шоссе, 4,  
ЦОМид НЦМ, корпус С1-01,  
тел. (4112) 32-15-26; 39-55-42  
телефакс (4112) 32-19-81  
e-mail: ysc\_tech@sacha.ru  
yscredactor@mail.ru

Материалы II научно-практической конференции  
с международным участием «Актуальные проблемы  
медицинской генетики на Крайнем Севере»  
(г. Якутск, 4-5 июня 2009 г.)

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ  
ЯКУТСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА  
КОМПЛЕКСНЫХ МЕДИЦИНСКИХ ПРОБЛЕМ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

*Выходит 4 раза в год*

*Зарегистрирован Саха-Якутским  
территориальным управлением  
Министерства Российской Федерации по делам печати,  
телевещания и средств массовых коммуникаций  
от 30 октября 2003 г.*

*Регистрационный номер ПИ №19-0465*

*Подписной индекс: 78781  
Цена свободная*

*«Якутский медицинский журнал» включен в утвержденный ВАК РФ  
«Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий,  
в которых рекомендуется публикация основных научных результатов  
диссертаций на соискание ученой степени кандидата по биологическим  
наукам и медицине»*

## СОДЕРЖАНИЕ

## Приветствия к участникам конференции

д.м.н., профессора М.И. Томского  
д.м.н, профессора, академика РАМН В.П. Пузырева  
д.б.н., профессора Э.К. Хуснутдиновой

## История

История развития, основные достижения и проблемы медицинской генетики  
Ноговицына А.Н.  
20 лет медико-генетической службе в РС (Я) .  
Федорова С.А.  
Якутия-Башкирия: итоги сотрудничества в области молекулярной генетики  
Федорова С.А.  
Исследования в области этногеномики: сотрудничество с Эстонским Биоцентром

## Эпидемиология наследственных болезней и врожденных пороков развития

Максимова Н.Р., Сухомясова А.Л., Ноговицына А.Н., Пузырев В.П.  
Этноспецифическая наследственная патология в РС (Я)  
Часнык В.Г., Яковлева С.Я., Бурцева Т.Е., New M.I., Синельникова Е.В., Аврусин С.Л., Шадрин В.П.  
Изучение распространенности генетических маркеров дефицита 21-гидроксилазы надпочечников у детей коренных малочисленных народностей Крайнего Севера и общие подходы к моделированию распространения наследственной патологии в детской популяции  
Мустафин Р.Н., Бермишева М.А., Хуснутдинова Э.К.  
Клинико-эпидемиологическое исследование нейрофиброматоза I типа в Республике Башкортостан  
Сивцева Е.Н., Борисова К.З.  
Этнотерриториальные особенности распространения врожденной ушной атрезии у детей Якутии  
Шаронова Е.И., Осетрова А.А., Зинченко Р.А.  
Наследственные нарушения слуха в Кировской области  
Ноговицына А.Н., Максимова Н.Р., Сухомясова А.Л., Павлова Т.Д., Гуринова Е.Е.  
Мониторинг хромосомных болезней у новорожденных в РС (Я) с 2000 по 2007 г.

## Этногеномика и демографическая генетика коренных народов Севера

Федорова С.А., Хуснутдинова Э.К.  
Этническая геномика населения РС (Я)  
Данилова А.Л., Максимова Н.Р., Сухомясова А.Л., Ноговицына А.Н., Кучер А.Н.  
Генетико-демографическое исследование народонаселения РС(Я)  
Трифонова Е.А., Спиридонова М.Г., Максимова Н.Р., Ноговицына А.Н., Степанов В.А.  
Генетическое разнообразие и структура гаплотипов локуса MTHFR в якутской популяции  
Конева Л.А., Конева А.В., Кучер А.Н.  
Прогнозирование распространения спинocerebellar ataxia I типа в смоделированных якутских популяциях

## Клиническая генетика и диагностика наследственных заболеваний

Капранов Н.И., Каширская Н.Ю., Шерман В.Д.  
Необходимость ранней диагностики и адекватного лечения больных муковисцидозом в России

## CONTENTS

## Greetings to the participants of the conference from

MD, professor M.I. Tomskiy  
6 MD, professor, the academician of RAMS V.P. Puzyrev  
MD, professor E.K. Khusnutdinova

## History

7 History of development, the basic achievements and problems of medical genetics  
Nogovitsyna A.N.  
10 20th anniversary of medical genetics in RS (Y)  
Fedorova S.A.  
13 Yakutia-Bashkiria: results of cooperation in the field of molecular genetics  
Fedorova S.A.  
14 Researches in the field of ethnogenomics: cooperation with the Estonian Biocenter

## Epidemiology of hereditary diseases and congenital developmental anomalies

Maksimova N.R., Suhomjasova A.L., Nogovitsyna A.N., Puzyrev V.P.  
15 Ethnospecific hereditary pathology in Republic Sakha (Yakutia)  
Chasnyk V.G., Jakovleva S.J., Burtseva T.E., New M.I., Sinelnikova E.V., Avrusin S.L., Shadrin V.P.  
20 Studying of genetic markers prevalence of congenital adrenal hyperplasia 21-hydroxylase deficiency in children of native small in numbers people of the Far North and general approaches to the modelling of hereditary pathology prevalence in children's population  
Mustafin R.N., Bermisheva M.A., Khusnutdinova E.K.  
23 Clinical-epidemiological research of neurofibromatosis type I in Republic Bashkortostan  
Sivtseva E.N., Borisova K.Z.  
26 Ethnoterritorial features of congenital aural atresia prevalence in children of Yakutia  
Sharonova E.I., Osetrova A.A., Zinchenko R.A.  
28 Hereditary hearing loss in the Kirov region  
Nogovitsyna A.N., Maksimova N.R.  
31 Monitoring of chromosomal diseases in RS (Y) from 2000 to 2007

## Ethnogenomics and demographic genetics of native people of the North

Fedorova S.A., Khusnutdinova E.K.  
34 Ethnic genomics of the population of RS (Y)  
Danilova A.L., Maksimova N.R., Suhomjasova A.L., Nogovitsyna A.N., Kucher A.N.  
37 Genetic-demographic research of the RS (Y) population  
Trifonova E.A., Spiridonova M.G., Maksimova N.R., Nogovitsyna A.N., Stepanov V.A.  
40 A genetic variety and MTHFR locus haplotypes structure in the Yakut population  
Koneva L.A., Konev A.V., Kucher A.N.  
42 Forecasting of spinocerebellar ataxia I type prevalence in the modelled Yakut populations

## Clinical genetics and diagnostics of hereditary diseases

Kapranov N.I., Kashirskaja N.J., Sherman V.D.  
45 Necessity of early diagnostics and adequate treatment of patients with cystic fibrosis in Russia



Барашков Н.А., Джемилева Л.У., Федорова С.А., Терютин Ф.М., Федотова Э.Е., Тазетдинов А.М., Кононова С.К., Сухомясова А.Л., Гуринова Е.Е., Алексеева С.П., Ноговицына А.Н., Максимова Н.Р., Хуснутдинова Э.К.

Наследственная несиндромальная аутосомно-рецессивная глухота в Якутии: молекулярно-генетические аспекты и опыт кохлеарной имплантации

Николаева И.А., Коротов М.Н., Гуринова Е.Е., Степанова С.К., Максимова Н.Р., Сухомясова А.Л., Ноговицына А.Н.  
Наследственные болезни нервной системы в РС (Я)  
Куртанов Х.А., Максимова Н.Р., Марусин А.В., Степанов В.А.  
Полиморфизм локуса ОФМД в популяциях Якутии

#### Медико-генетическое консультирование, пренатальная диагностика

Сухомясова А.Л., Ноговицына А.Н., Максимова Н.Р.  
Медико-генетическая помощь населению РС (Я)

Пестерева Е.Л., Шатунов А.Ю., Сидорова О.Г., Готовцева Л.В.  
Пренатальная диагностика в РС (Я): цитогенетические аспекты хромосомной патологии

Сидорова О.Г., Кононова С.К., Степанова С.К., Захарова В.А., Федорова С.А., Ижевская В.Л., Хуснутдинова Э.К.

Особенности пренатальной диагностики спинocerebellar атаксии 1-го типа и миотонической дистрофии в практике медико-генетической консультации Якутии

Николаева Т.Я., Попова Т.Е.  
Диспансеризация больных с нейродегенеративной патологией в РС (Я)

Сухомясова А.Л., Павлова К.К., Ноговицына А.Н., Петрова А.А., Тапьев Е.В., Дранаева Г.Г., Вербицкая Л.И.

Реализация приоритетного национального проекта «Здоровье»: массовое обследование новорожденных на наследственные болезни обмена в РС (Я)

Маркова Е.В., Казанцева О.М., Артюхова В.Г., Светлаков А.В.  
Преимплантационная ДНК-диагностика моногенной патологии  
Зотова Н.В., Маркова Е.В., Тимофеева И.Ю., Казанцева О.М., Казьмина Н.В., Светлаков А.В.

Идентификация точек разрывов при структурных хромосомных перестройках у мужчин с нарушением репродуктивной функции

Фаткуллина И.Б., Содномова Л.Ц., Еремина Е.Р., Алексеева Л.Л., Тыхеренова А.В.

Роль наследственности в развитии преэклампсии  
Гуринова Е.Е., Сухомясова А.Л., Ноговицына А.Н., Николаева И.А., Алексеева С.П., Максимова Н.Р.

Сравнение уровня тревожности у больных с моногенными наследственными заболеваниями нервной системы  
Ижевская В.Л.

Медико-генетическое консультирование и генетическое тестирование: значение и некоторые этические проблемы

Кононова С.К., Сидорова О.Г., Федорова С.А., Платонов Ф.А., Гольдфарб Л.Г., Ижевская В.Л., Хуснутдинова Э.К.

Опыт изучения этических, правовых и социальных вопросов применения генетических технологий в Якутии

#### Генетика мультифакториальных заболеваний

Скрябин Н.А., Лебедев И.Н., Толмачева Е.Н., Чердынцева Н.В.

Роль метилирования генов ингибиторов циклин-зависимых киназ в эпигенетической инактивации ретинобластомного пути регуляции клеточного цикла при раке молочной железы  
Фарахтдинова А.Р., Федорова С.А., Николаева Т.И., Иванов П.М., Бермишева М.А., Доерк Т., Хуснутдинова Э.К.

Анализ мутаций в генах BRCA1, CHEK2, NBS1 у больных раком молочной железы из РС (Я)

Barashkov N.A., Dzhemileva L.U., Fedorova S.A., Terjutin F.M., Fedotova E.E., Tazetdinov A.M., Kononova S.K., Suhomjasova A.L., Gurinova E.E., Alekseeva S.P., Nogovitsyna A.N., Maksimova N.R., Khusnutdinova E.K.

49 Hereditary nonsyndromic autosomal recessive hearing loss in Yakutia: molecular-genetic and cochlear implantation aspects

Nikolaeva I.A., Korotov M.N., Gurinova E.E., Stepanova S.K., Maksimova N.R., Suhomjasova A.L., Nogovitsyna A.N.

52 Hereditary diseases of nervous system in RS (Y)

Kurtanov H.A., Maksimova N.R., Marusin A.V., Stepanov V.A.

54 Polymorphism of OPHMD locus in populations of Yakutia

#### Medical-genetic consultation, prenatal diagnostics

Suhomjasova A.L., Nogovitsyna A.N., Maksimova N.R.

58 Medical-genetic assistance to population of RS (Y)

Pestereva E.L., Shatunov A.J., Sidorova O.G., Gotovtseva L.V.

61 Prenatal diagnostics in RS (Y): cytogenetic aspects of a chromosomal pathology

Sidorova O.G., Kononova S.K., Stepanova S.K., Zaharova V.A., Fedorova S.A., Izhevskaja V.L., Khusnutdinova E.K.

64 Features of prenatal diagnostics of spinocerebellar ataxia I type and myotonic dystrophy in practice of medical-genetic consultation of Yakutia

Nikolaeva T.Ya., Popova T.E.

65 Prophylactic medical examination of patients with neurodegenerative pathology in RS (Y)

Suhomjasova A.L., Pavlova K.K., Nogovitsyna A.N., Petrova A.A., Tapyev E.V., Dranaeva G.G., Verbitskaja L.I.

69 Realization of the priority national project "Health": mass inspection of newborns on hereditary diseases of metabolism in RS (Y)

Markova E.V., Kazantseva O.M., Artjuhova V.G., Svetlakov A.V.

72 Preimplantation DNA-diagnostics for single gene disorders

Zotova N.V., Markova E.V., Timofeeva I.J., Kazantseva O.M., Kazmina N.V., Svetlakov A.V.

75 Identification of chromosomal breakpoints in men with structural chromosome rearrangement and reproductive failure

Fatkullina I.B., Sodnomova L.Ts., Eremina E.R., Alexeeva L.L., Tykherenova A.V.

78 Role of heredity in preeclampsia development

Gurinova E.E., Suhomjasova A.L., Nogovitsyna A.N., Nikolaeva I.A., Alekseeva S.P., Maksimova N.R.

80 Comparison of uneasiness level in patients with monogenic hereditary diseases of nervous system

Izhevskaja V.L.

83 Medical-genetic consultation and genetic testing: value and some ethical problems

Kononova S.K., Sidorova O.G., Fedorova S.A., Platonov F.A., Goldfarb L.G., Izhevskaja V.L., Khusnutdinova E.K.

86 Experience of studying of ethical, legal and social questions of genetic technologies' application in Yakutia

#### Genetics of multifactorial diseases

Skrjabin N.A., Lebedev I.N., Tolmacheva E.N., Cherdyntseva N.V.

89 Role of genes inhibitors methylation of cyclin-dependent kinases in epigenetic inactivation of retinoblastomal way of regulation of a cellular cycle at a breast cancer

Farahtdinova A.R., Fedorova S.A., Nikolaeva T.I., Ivanov P.M., Bermisheva M.A., Doerk T., Khusnutdinova E.K.

91 The analysis of mutations in genes BRCA1, CHEK2, NBS1 in patients with breast cancer from RS (Y)



- Федорова Ю.Ю., Карунас А.С., Гра О.А., Рамазанова Н.Н., Гурьева Л.Л., Эткина Э.И., Голденкова-Павлова И.В., Хуснутдинова Э.К.  
Ассоциация полиморфных вариантов генов системы биотрансформации с бронхиальной астмой у татар  
Хусаинова Р.И., Селезнева Л.И., Фазлыева Э.А., Нурлыгаянов Р.З., Надыршина Д.Д., Лесняк О.М., Хуснутдинова Э.К.  
Роль полиморфных вариантов гена рецептора эстрогена- $\alpha$  (ESR1) в развитии постменопаузального остеопороза в Волго-Уральском регионе России  
Григорьева Л.В., Насибуллин Т.Р., Паук В.В., Романова А.Н., Федорова С.А., Мустафина О.Е., Ноговицына А.Н., Хуснутдинова Э.К.  
Анализ ассоциаций с инфарктом миокарда полиморфных маркеров генов-кандидатов сердечно-сосудистых заболеваний в популяции якутов  
Иванова О.Г., Makeeva O.A., Leznev A.A., Tsimbaljuk I.V., Shipulin V.V., Puzyrev V.P.  
Связь полиморфизма гена транскрипционного фактора GATA4 с эхокардиографическими параметрами в популяции и у больных с ишемической болезнью сердца  
Чугунова С.А., Судомоина М.А., Николаева Т.Я., Парфенов М.Г., Макарычева О.Ю., Гехт А.Б., Фаворова О.О.  
Полиморфизм некоторых генов системы гемостаза и геморрагический инсульт у якутов  
Казанцева А.В., Фасхутдинова Г.Г., Куличкин С.С., Хуснутдинова Э.К.  
Роль полиморфного VNTR локуса в гене DRD4 в развитии алкогольной и наркотической зависимости и формировании личностных черт у здоровых индивидов  
Севостьянова Н.В., Некрасова А.М., Кошель А.П., Дмитриева А.И., Мартов С.И., Клоков С.С., Ракитин С.С.  
Полиморфизм генов эксцизионной репарации ДНК и генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у больных раком желудка  
Семенов С.И., Павлов Н.Н., Кривошапкин В.Г., Кузин С.Н., Терехова М.И., Зверьяева И.К., Кожевников А.А., Кузина Л.Е., Забелин Н.Н., Самохвалов Е.И.  
Генотипы вируса гепатита В и субтипы HbsAg в Якутии  
Ожегова Д.С., Фрейдин М.Б., Гончарова И.А., Пузырев В.П.  
Уровень экспрессии генов иммунного ответа IFNG, STAT1 и MCP1 в условиях различной антигенной нагрузки  
Салтыкова И.В., Фрейдин М.Б., Брагина Е.Ю., Огородова Л.М., Пузырев В.П.  
Вовлеченность генов сигнальных молекул цитокинов в патогенезе бронхиальной астмы и описторхоза  
Бычкова О.Ю., Makeeva O.A., Tsimbaljuk I.V., Puzyrev K.V., Pavljukova E.N., Puzyrev V.P.  
Связь полиморфизма G-308A гена TNF с клинически важными сердечно-сосудистыми эндотипами и долгожительством  
Дугарова Г.О., Голубенко М.В., Еремина Е.Р., Минайчева Л.И., Фадюшина С.В.  
Полиморфизм G-308A гена TNF- $\alpha$  у бурят  
Семенов С.И., Терехова М.В., Индеева Л.Д., Павлов Н.Н., Тихонова Н.Н., Кузин С.Н., Писарева М.М., Грудинин М.П., Балахонцева Л.А., Серкина Т.П.  
Распространенность и генетическая характеристика вируса гепатита С в Якутии  
Черкашина И.И., Никулина С.Ю., Логвиненко Н.И., Максимов В.Н., Воевода М.И., Либердорвская Е.Д.  
Особенности полиморфизма гена хемокинового рецептора CCR5 у больных бронхиальной астмой и их родственников  
Тарасенко Н.В., Кондратьева Е.И.  
Ассоциации полиморфизма генов кандидатов с показателями клеточного и гуморального иммунитета при сахарном диабете I типа  
Fedorova J.J., Karunas A.S., Gra O.A., Ramazanova N.N., Gureva L.L., Etkina E.I., Goldenkova-Pavlova I.V., Khusnutdinova E.K.  
93 Association of polymorphic variants of biotransformation system genes with a bronchial asthma in Tatars  
Khusainova R.I., Selezneva L.I., Fazlyeva E.A., Nurylgayanov R.Z., Nadyrshina D.D., Lesnyak O.M., Khusnutdinova E.K.  
96 Role of estrogen receptor- $\alpha$  gene polymorphisms (ESR1) in development of postmenopausal osteoporosis in Volga-Ural region of Russia  
Grigoreva L.V., Nasibullin T.R., Pauk V.V., Romanova A.N., Fedorova S.A., Mustafina O.E., Nogovitsyna A.N., Khusnutdinova E.K.  
99 The analysis of associations with myocardial infarction of polymorphic markers of cardiovascular diseases genes-candidates in a population of Yakuts  
Ivanova O.G., Makeeva O.A., Leznev A.A., Tsimbaljuk I.V., Shipulin V.V., Puzyrev V.P.  
102 Connection of transcription factor gene GATA4 polymorphism with echocardiographic parameters in population and patients with ischemic heart disease  
Chugunova S.A., Sudomoina M.A., Nikolaeva T.Ya., Parfenov M.G., Makarycheva O.J., Geht A.B., Favorova O.O.  
105 Polymorphism of some genes of hemostasis system and hemorrhagic stroke in Yakuts  
Kazantseva A.V., Fashutdinova G.G., Kulichkin S.S., Khusnutdinova E.K.  
107 Role of polymorphic VNTR locus in DRD4 gene in development of alcohol and narcotic dependence and formation of personal features in healthy individuals  
Sevostjanova N.V., Nekrasova A.M., Koshel A.P., Dmitrieva A.I., Martov S.I., Klovov S.S., Rakitin S.S.  
111 Polymorphism of DNA repair genes and xenobiotics detoxication of enzyme genes in patients with gastric cancer  
Semenov S.I., Pavlov N.N., Krivoshapkin V.G., Cusin S.N., Terehova M.I., Zverjaeva I.K., Kozhevnikov A.A., Cusina L.E., Zabelin N.N., Samohvalov E.I.  
114 Genotypes of hepatitis B virus and HbsAg subtypes in Yakutia  
Ozhogova D.S., Frejdin M.B., Goncharova I.A., Puzyrev V.P.  
118 Level of immune response IFNG, STAT1 and MCP1 genes expression in conditions of various antigenic loading  
Saltykova I.V., Frejdin M.B., Bragina E.J., Ogorodova L.M., Puzyrev V.P.  
121 Involvement of cytokine signal molecules genes in pathogenesis of bronchial asthma and opisthorchiasis  
Bychkova O.J., Makeeva O.A., Tsimbaljuk I.V., Puzyrev K.V., Pavljukova E.N., Puzyrev V.P.  
124 Association of the G-308A TNF gene polymorphism with clinically important cardiovascular endophenotypes and longevity  
Dugarova G.O., Golubenko M.V., Eremina E.R., Minajcheva L.I., Fadjushina S.V.  
127 G-308A polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene in Buryats  
Semenov S.I., Terehova M.V., Indeeva L.D., Pavlov N.N., Tihonova N.N., Cusin S.N., Pisareva M.M., Grudinin M.P., Balahontseva L.A., Serkina T.P.  
129 Hepatitis C prevalence and genetic characteristic in Yakutia  
Cherkashina I.I., Nikulina S.J., Logvinenko N.I., Maksimov V.N., Voevoda M.I., Liberdorvskaja E.D.  
132 Features of CCR5hemokine receptor gene polymorphism in patients with bronchial asthma and their relatives  
Tarasenko N.V., Kondrateva E.I.  
135 Associations of genes-candidates polymorphism with cellular and humoral immunity parameters at type I diabetes

- Соловьева Н.А., Николаева Л.Е., Максимова Н.Р.  
Связь полиморфизма генов интерлейкина-5,  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи его рецептора с atopической бронхиальной астмой у детей РС(Я)
- Брагина Е.Ю., Буйкин С.В.  
Влияние численности контрольной выборки на значимость ассоциаций генетических маркеров с развитием мультифакториальных заболеваний
- Васильев С.А., Тимошевский В.А., Лебедев И.Н.  
Современные возможности цитогенетического мониторинга анеугенного воздействия ионизирующего излучения
- Марусин А.В., Максимова Н.Р., Матвеева Н.П., Спиридонова М.Г., Степанов В.А.  
Ассоциация полиморфизма генов переносчика дофамина DAT1 (SLC6A3) и этанолметаболизирующих ферментов ADH1B и CYP2E1 с риском формирования алкогольной зависимости в якутской популяции
- Семенова А.А., Яковлева Е.Я., Ноговицына А.Н.  
Женское бесплодие, частота, этиология, диагностика по данным консультации по репродукции человека Перинатального Центра РБ №1 – НЦМ9
- Назаренко Л.П.  
Очерк о научно-практическом сотрудничестве медико-генетической службы РС (Я) и НИИ медицинской генетики СО РАМН
- Бирюкбаева Г.Н., Ноговицына А.Н., Гехт А.Б.  
Ночная лобная эпилепсия: описание клинического случая
- Спиридонова М.Г., Трапп Н.В., Степанова С.К., Марусин А.В., Сухомясова А.Л., Степанов В.А.  
Анализ полиморфных маркеров в гене мышечной протеинкиназы и ассоциация с миотонической дистрофией в якутской популяции
- Довжикова И.В., Луценко М.Т.  
Активность процессов образования НАДФ в плаценте при беременности, осложненной герпетической инфекцией
- Алексеева В.А., Петрова П.Г., Синдеева Л.В.  
Развитие вторичных половых признаков у девочек якуток пубертатного возраста (11-15 лет) в зависимости от соматотипа
- Гайдуль К.В., Гольдина И.А., Сафронова И.В., Якимова Ю.Л., Козлов В.А.  
Антибактериальные свойства цефотаксима, механически иммобилизованного на полимерном носителе
- Сафронова И.В., Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Козлов В.А.  
Жизнеспособность и функциональная активность лимфоцитов периферической крови человека под действием производного индолил-тиоалканкарбоновой кислоты
- Постникова А.М., Баланова О.П., Аввакумова Н.В., Николаева К.М., Васильев Н.Н., Гаврильева С.В., Константинов А.В., Чибыева Л.Г.  
Уровень интрагастральной кислотности у больных заболеванием пищевода и желудка в различных этнических группах, проживающих в условиях Севера
- Захарова Т.Г., Петрова М.М., Листратова А.В.  
Болезни органов дыхания у беременных женщин и их влияние на исход родов
- Поздравление с Международным Днем медицинской сестры
- К 50-летию МУ «Городская стоматологическая поликлиника г. Якутска»
- 139 Solovieva N.A., Nikolaeva L.E., Maksimova N.R.  
Communication of genes interleukine-5,  $\alpha$  - and  $\beta$ -linkage of its receptor polymorphism with atopic bronchial asthma in children of RS(Y)
- Bragina E.J., Bujkin S.V.  
Influence of number of controls on the importance of associations of genetic markers with development of multifactorial diseases
- 142 Vasilyev S.A., Timoshevskiy V.A., Lebedev I.N.  
Current capabilities of cytogenetic monitoring of ionizing radiation aneugenic influence
- 145 Marusin A.V., Maksimova N.R., Matveeva N.P., Spiridonova M.G., Stepanov V.A.  
Dopamine transporter DAT1 (SLC6A3) and alcohol metabolizing enzymes ADH1B, CYP2E1 gene polymorphism: association with alcohol dependence in Yakut population
- 148 Semenova A.A., Jakovleva E.J., Nogovitsyna A.N.  
Female sterility, frequency, etiology, diagnostics on data of person reproduction consultation of Perinatal Centre RH №1 - NCM
- 150 Nazarenko L.P.  
Sketch about scientific-practical cooperation of RS (Y) medical-genetic service and Scientific Research Institute of medical genetics RAMS
- 153 Birjukbaeva G.N., Nogovitsyna A.N., Gekht A.B.  
Nocturnal lobe epilepsy: clinical case presentation
- 154 Spiridonova M.G., Trapp N.V., Stepanova S.K., Marusin A.V., Suhomjasova A.L., Stepanov V.A.  
Analysis of polymorphic markers in muscle protein kinase gene and association with myotonic dystrophy in Yakut population
- 156 Dovzhikova I.V., Lutsenko M.T.  
Activity of NADPh formation processes in placenta at the pregnancy complicated by an aggravation of herpetic infection
- 159 Alekseeva V.A., Petrova P.G., Sindeeva L.V.  
Development of secondary sexual attributes in girls Yakuts of pubertal age (11-15 years) depending on somatotype
- 161 Gajdul K.V., Goldina I.A., Safronova I.V., Jakimova J.L., Kozlov V.A.  
Antibacterial properties of cephotaxim, mechanically immobilized on the polymeric carrier
- 163 Safronova I.V., Goldina I.A., Gajdul K.V., Kozlov V.A.  
Viability and functional activity of person peripheral blood lymphocytes under action of derivative indole-thioalkanecarbon acid
- 164 Postnikova A.M., Balanova O.P., Avvakumova N.V., Nikolaeva K.M., Vasilev N.N., Gavrileva S.V., Konstantinov A.V., Chibyeva L.G.  
Level of intragastric acidity in patients with disease of esophagus and stomach in the various ethnic groups living in conditions of the North
- 166 Zaharova T.G., Petrova M.M., Listratova A.V.  
Respiratory illnesses in pregnant women and their influence on outcome of labor
- 168 To the International Day of nurse
- 170 To the 50th anniversary of «City stomatologic polyclinic of Yakutsk»
- 171

## ПРИВЕТСТВИЯ К УЧАСТНИКАМ КОНФЕРЕНЦИИ

### УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!



От имени Якутского научного центра комплексных медицинских проблем СО РАМН разрешите приветствовать участников и гостей II научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы медицинской генетики на Крайнем Севере»!

Начало XXI века ознаменовалось окончанием проекта «Геном человека» и как следствие его полной рас-

шифровкой. Этот прорыв в биологии человека изменил диагностические возможности медицины, создал предпосылки для дальнейшего развития молекулярной медицины, которая рассматривает патогенез болезней на молекулярном уровне.

Генетика стала такой же фундаментальной для медицины наукой, как морфология, физиология, биохимия, иммунология, внося существенный вклад во все разделы клинической медицины.

Но никакие достижения современной науки не могут быть реализованы в практике здравоохранения без врачей. Понимая это, сотрудники отдела молекулярной генетики нашего центра вплотную работают с практическими

врачами медико-генетической службы республики, которая в этом году отмечает свое 20-летие. Такой союз позволяет своевременно внедрять в практическое здравоохранение самые современные методы диагностики наследственной патологии, что в свою очередь значительно облегчает работу врачей-генетиков.

Уверен, что II научно-практическая конференция генетиков запомнится плодотворными дискуссиями, возможностью обменяться последними достижениями и результатами исследований, позволит выработать совместные новые подходы, внесет необходимые конструктивные предложения по проблемам сохранения и укрепления здоровья нации.

*С пожеланиями плодотворной работы директор ЯНЦ КМП СО РАМН, д.м.н., профессор М.И. Томский*

### УВАЖАЕМЫЕ ДРУЗЬЯ И КОЛЛЕГИ!



вместе. Исторические корни научно-

На всем 20-летнем пути становления и развития медико-генетической службы Республики Саха (Якутия) якутские и томские медицинские генетики были всегда

го единения Якутии и Томска уходят в XIX век и свидетельствуют тому – имя известного врача из якутов, одного из первых просветителей народа саха Прокопия Нестеровича Сокольников, закончившего сначала Томскую гимназию, а затем медицинский факультет Томского университета.

Медико-генетическая служба Республики Саха – одна из лучших в России. Вами выполнены важные в научном плане исследования, касающиеся вопросов генетической структуры на-

родонаселения, груза наследственных болезней, описаны новые варианты наследственной патологии, внедрены в практику здравоохранения новейшие методы молекулярно-генетической диагностики, включая дородовую. Ваша служба – дружный и высококвалифицированный коллектив сотрудников, ответственно исполняющий свой врачебный долг.

Позвольте поздравить вас с праздником, пожелать вам новых творческих успехов, счастья, здоровья.

*Директор НИИ медицинской генетики СО РАМН, академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ В.П. Пузырев*

### ДОРОГИЕ КОЛЛЕГИ!



Я очень рада приветствовать вас на очередной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы медицинской генетики на Крайнем Севере». Замечательно, что проведение конференции приурочено к 20-летию медико-генетической службы в Якутии. Главной задачей конференции является подведение итогов функционирования медико-генетической службы Республики Саха (Якутия).

Прогресс в области молекулярной генетики человека стал символом биологической революции XXI века.

Буквально за 10–15 лет молекулярно-биологические технологии радикально преобразили мир окружающих нас вещей и стали неотъемлемой частью нашей жизни в виде лекарств, новых диагностических тестов и приборов. Достижения биологии продолжают стремительно вторгаться в новые области медицины и здравоохранения, определяя новые направления профилактики и охраны здоровья населения. Республика Саха всегда является участником многих инновационных проектов, направленных на сохранение здоровья нации. Смело вступает в эксперименты и в силу этого хорошо подготовлена к завтрашнему дню. По-прежнему, объектом пристального внимания медико-генетической службы в Республике Саха остаются генетические аспекты патологии человека и проблемы сохранения генофонда коренных народов Севера.

Программа конференции широка и разнообразна – она охватывает ряд вопросов: этногеномика и демографическая генетика коренных народов Севера, генетика многофакторных заболеваний, эпидемиология наследственных болезней и врожденных пороков развития и ДНК-диагностика наследственных заболеваний. Особое внимание будет уделено медико-генетическому консультированию и дородовой диагностике наследственных заболеваний, часто встречающихся среди населения республики.

Я искренне поздравляю коллектив медико-генетической службы РС(Я) с 20-летием и надеюсь, что знания, опыт и энтузиазм ведущих специалистов в области медицинской и популяционной генетики помогут в создании новых решений, методов и подходов, направленных на дальнейшее процветание медико-генетической службы региона.

*Член-корр. АН Республики Башкортостан, д.б.н. Э.К. Хуснутдинова*

## ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ, ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ И ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ\*

### 1. История развития генетической науки

Впервые представления о передаче патологических наследственных признаков отражены в Талмуде (собрание догматических, религиозно-этических и правовых положений иудаизма, сложившихся в IV в. до н.э.), в котором указана опасность обрезания крайней плоти у новорожденных мальчиков, старшие братья которых или дяди по материнской линии страдают кровотечениями.

В XVIII в. описано наследование доминантного (полидактилия, или многопалость) и рецессивного (альбинизм у негров) признаков. В начале XIX в. несколько авторов одновременно описали наследование гемофилии.

Особого внимания заслуживает книга лондонского врача Адамса, вышедшая в 1814 г. под названием «Трактат. О предполагаемых наследственных свойствах болезней, основанных на клиническом наблюдении». Через год она была переиздана под названием «Философский трактат о наследственных свойствах человеческой расы». Это был первый справочник для генетического консультирования. В ней сформулировано несколько принципов медицинской генетики:

- браки между родственниками повышают частоту семейных болезней;
- не все врожденные болезни являются наследственными, часть из них связана с внутриутробным поражением плода (например, за счет сифилиса).

А.Г. Мотульски в 1959 г. справедливо назвал Адамса «забытым основателем медицинской генетики».

В середине XIX в. в России над проблемами наследственных болезней работал В.М. Флоринский. Он изложил свои взгляды по усовершенствованию человеческого рода. Однако ряд предположений был противоречив и неверен. В то же время В.М. Флоринский поднял и осветил некоторые вопросы медицинской генетики. В своих трудах он правильно оценил значение среды для формирования наследственных признаков, подчеркнул вред родственных браков. Показал наследственный характер многих патологических признаков (глухонмота, альбинизм). Однако книга не нашла отклика среди медиков и биологов того времени, так как ученые еще не были подготовлены к восприятию этих идей.

В последней четверти XIX в. наибольший вклад в становление генетики человека внес английский биолог Ф. Гальтон (двоюродный брат Ч. Дарвина). Он первым поставил вопрос о наследственности человека как предмете для изучения, обосновал применение генеалогического, близнецового и статистического методов для ее изучения и заложил основы для будущего развития генетики человека. Принципиальная ошибка Ф. Гальтона заключается в том, что во всех евгенических мероприятиях он рекомендовал не столько избавиться от патологических генов человека, сколько повысить количество «хороших» генов в человеческих популяциях путем предоставления преимущественных условий для размножения более одаренных, гениальных людей.

Существенный вклад в изучение генетики человека внес выдающийся английский клиницист. А Гаррольд, хорошо знавший биологию и химию. Он первым обнаружил взаимосвязь между генами и ферментами и, применив эти знания к изучению патологических признаков, открыл врожденные нарушения обмена веществ.

Работы Адамса и других исследователей того времени не привлекли внимания широкого круга специалистов потому, что наследственность тогда в основном изучалась на растениях. Наблюдения над человеком не учитывались. Между тем, если бы результаты исследований по генетике человека были известны Г. Менделю и другим ученым, изучавшим наследование на ботаническом материале, то открытие законов генетики и их признание могло бы произойти гораздо раньше.

В 1865 г. чешский ученый Г. Мендель глубоко и последовательно, с математическим описанием, в опытах на горохе сформулировал законы доминирования для первого поколения гибридов, расщепления и комбинирования наследственных признаков в потомстве гибридов. Этот важнейший вывод доказал существование наследственных факторов, детерминирующих развитие определенных признаков. Работа Г. Менделя оставалась непонятой 35 лет.

В 1900 г. три ботаника независимо друг от друга, не зная работы Г. Менделя, на разных объектах повторили его открытие: Де Фриз из Голландии - в опытах с энтерой, маком и дурма-

ном, Корренс из Германии - с кукурузой, Чермак из Австрии - с горохом. Поэтому 1900 г. считается годом рождения генетики. С него начался период изучения наследственности, отличительной чертой которого стал предложенный ранее Г. Менделем гибридологический метод, анализ наследования отдельных признаков родителей в потомстве.

В 1905 г. В. Бэтсон предложил термин «генетика», а в 1909 г. В. Иогансен предложил термин «ген» (от греческого genes - рождающий, рожденный) для обозначения наследственных факторов. Совокупность всех генов у одной особи ученый назвал генотипом, совокупность признаков организма - фенотипом.

В 1908 г. Г. Харди и В. Вайнберг показали, что менделевские законы объясняют процессы распределения генов в популяциях (от лат. populus - население, народ). Ученые сформулировали закон, который описывает условия генетической стабильности популяции в России в 1919 г. Ю.А. Филипченко организовал первую кафедру генетики в Ленинградском университете. В это время работал молодой Н.И. Вавилов, сформулировавший один из генетических законов - закон гомологических рядов наследственной изменчивости.

Н.К. Кольцов, Ю.А. Филипченко и некоторые другие ученые в рамках евгенической программы проводили работы по генетике одаренности, изучая родословные выдающихся личностей. В этих исследованиях были допущены некоторые методические ошибки. Однако по сравнению с генетическими исследованиями в других странах в период расцвета евгеники подходы наших ученых были во многом верными.

Так, Н.К. Кольцов и Ю.А. Филипченко правильно поставили вопрос о значении социальной среды в реализации индивидуальных способностей. Они полностью отвергли насильственный путь улучшения породы человека. В период проведения евгенических исследований в СССР были собраны интересные родословные выдающихся личностей (А.С. Пушкина, Л.Н. Толстого, А.М. Горького, Ф.И. Шалапина и др.).

Конец 20-х - начало 30-х гг. характеризуются довольно большими успехами в развитии генетики. К этому времени стала общепризнанной хромосомная теория наследственности.

\* Материал взят из Интернета.

Т. Морган и его ученики экспериментально доказали, что гены расположены в хромосомах в линейном порядке и образуют группы сцепления.

Теоретическая и экспериментальная работы С.С. Четверикова (1926, 1929) положили начало современной генетике популяций. Большой вклад в изучение этого раздела внесли труды Р. Фишера (1931), С. Райта (1932), Н.П. Дубинина и Д.Д. Ромашова (1932), Дж.Е. Холдейна (1935) и др.

В ряде стран начала развиваться медицинская генетика. В нашей стране особого упоминания заслуживает Медико-генетический институт, который функционировал с 1932 по 1937 г. При нем был организован центр близнецовых исследований, в котором широко изучались количественные признаки у человека и болезни с наследственным предрасположением (сахарный диабет, гипертоническая болезнь, язвенная и др.). Правильное применение разных методов исследования (клинико-генеалогического, близнецового, цитогенетического, популяционно-статистического) позволило коллективу занять передовые рубежи генетики.

В 20-30-х гг. работал талантливый клиницист и генетик С.Н. Давиденков (1880-1961), который внес свой вклад в изучение наследственных болезней, он первым в нашей стране начал проводить медико-генетическое консультирование и разрабатывать методику этого вида медицинской помощи.

К концу 30-х - началу 50-х гг. интерес к генетике человека снизился. Возобновились исследования лишь в начале 60-х гг.

С 1959 по 1962 г. количество публикаций, конференций, симпозиумов по генетике человека быстро возросло. Стало ясно, что наследственные болезни по своей природе гетерогенны, различны не только с клинической, но и с генетической точки зрения. Один и тот же фенотип болезни может быть обусловлен мутационным изменением различных белков (генокопия).

После того как было установлено, что ДНК является носителем наследственной информации, ученые направили усилия на изучение молекулярной природы и генетической значимости ее отдельных компонентов.

Исследование ДНК проводилось многими учеными. Весь накопленный комплекс биологических и физико-химических знаний привел к тому, что в 1953 г. Д. Уотсон и Ф. Крик открыли двухцепочечную спиральную (пространственную) структуру молекулы ДНК. Затем бурно начала развиваться

молекулярная и биохимическая генетика человека, а также иммуногенетика.

Развитие цитогенетики человека является ярким примером значения фундаментальных исследований для практического здравоохранения. Так, в 1956 г. А. Леван и Дж. Тио установили, что у человека хромосомный набор состоит из 46 хромосом, а через три года были открыты хромосомные болезни. Очередным переломным моментом в цитогенетике человека была разработка методов дифференциальной окраски хромосом.

Следующим шагом в развитии современной генетики явилось картирование (определение места положения) генов в хромосомах человека. Успехи цитогенетики, генетики соматических клеток обеспечили прогресс в изучении групп сцепления (групп генов, наследующихся совместно). В настоящее время у человека известно 24 группы сцепления. Работы по изучению сцепления генов дают новые практические возможности в диагностике наследственных болезней и медико-генетическом консультировании.

## 2. Этапы развития медицинской генетики

Таким образом, в истории медицинской генетики можно выделить несколько основных этапов:

1) открытие законов Г. Менделя и изучение наследственности на уровне целостного организма;

2) изучение генетики на хромосомном уровне и открытие сцепленного наследования Т. Морганом и его учениками;

3) начало развитию современной генетики популяции дали теоретические и экспериментальные работы С.С. Четверикова;

4) развитие молекулярной генетики началось с построения пространственной структуры молекул ДНК Д. Уотсоном и Ф. Криком.

В настоящее время наследственность изучается на всех уровнях: молекулярном, клеточном, организменном и популяционном.

## 3. Генная и клеточная инженерия. Биотехнология

Для лечения многих болезней необходимы различные биологически активные вещества. При выделении их из тканей человека возникает опасность загрязнения полученного материала различными вирусами (гепатита В, иммунодефицита человека и др.). Кроме того, эти вещества производят-

ся в небольших количествах и являются дорогостоящими. Биологически активные вещества животного происхождения низкоэффективны из-за несовместимости с иммунной системой больного человека. Только развитие новой отрасли - генной инженерии помогло обеспечить получение чистых биологически активных веществ в больших количествах по более низкой цене.

Генная инженерия - это создание гибридных, рекомбинантных молекул ДНК, а стало быть, и организмов с новыми признаками. Для этого необходимо выделить ген из какого-либо организма или искусственно синтезировать его, клонировать (размножить) и перенести в другой организм.

Инструментами генной инженерии являются ферменты: рестриктазы (разрезающие молекулу ДНК) и лигазы (сшивающие ее). В качестве векторов-переносчиков используются вирусы.

С помощью генной инженерии созданы штаммы кишечных палочек, в которые встроены гены человеческого инсулина (необходимого для лечения сахарного диабета), интерферона (противовирусного препарата), соматотропина (гормона роста).

С помощью генной инженерии созданы дрожжевые клетки, продуцирующие человеческий инсулин. Биосинтетический метод производства человеческого инсулина с помощью дрожжевых клеток широко используется в фармацевтическом производстве (в Дании, Югославии, США, Германии и др. странах).

В настоящее время ученые разных стран работают над получением с помощью генной инженерии ряда других необходимых биологически активных веществ, вакцины против гепатита В, активатора профибринолизина (противосвертывающий препарат), интерлейкина-2 (иммуномодулятор) и др. В клетки животных чужеродные гены вводят в виде отдельных молекул ДНК или в составе векторов-вирусов, способных вносить в геном клетки чужую ДНК.

Обычно применяют два метода:

1) ДНК добавляют в среду инкубации клеток;

2) производят микроинъекции ДНК непосредственно в ядро (что более эффективно).

Первоочередными задачами генной инженерии у человека являются создание банков генов человека для их изучения и поиск путей генотерапии, то есть замены мутантных генов нормальными аллелями.

Клеточная инженерия - это метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации или реконструкции. При гибридизации искусственно объединяются целые клетки (иногда далеких видов) с образованием гибридной клетки.

Клеточная реконструкция - это создание жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток (ядра, цитоплазмы, хромосом и др.). Изучение гибридных клеток позволяет решать многие проблемы биологии и медицины. Так, например, биотехнология использует гибридомы. Гибридома - это клеточный гибрид, получаемый слиянием нормального лимфоцита и опухолевой клетки.

Биотехнология - это производство продуктов и материалов, необходимых для человека, с помощью биологических объектов.

Термин «биотехнология» получил распространение в середине 70-х гг. XX в., хотя отдельные отрасли биотехнологии известны давно и основаны на применении различных микроорганизмов: хлебопечение, виноделие, пивоварение, сыроварение. Достижения генетики создали большие дополнительные возможности для развития биотехнологии.

В середине XX в., используя индуцированный мутагенез, были получены антибиотики (пенициллин, стрептомицин, эритромицин и др.) - с помощью микробов; фермент амилаза - с помощью сенной палочки; аминокислоты - с помощью кишечной палочки; молочная кислота - с помощью молочнокислых бактерий; лимонная кислота - с помощью аспергилловой плесени; витамины группы В - с помощью дрожжей.

В последние десятилетия в результате успехов, достигнутых генной инженерией, происходит скачок в биотехнологии - развивается микро-

биологическая промышленность (микробиологическая индустрия), которая позволяет в промышленных условиях с помощью кишечной палочки или дрожжей получать человеческий инсулин, интерферон, соматотропин и другие вещества.

#### 4. Достижения генетики в диагностике и профилактике заболеваний

В настоящее время проводится массовый скрининг новорожденных в роддомах для выявления фенилкетонурии и врожденного гипотиреоза. Данные исследования позволяют поставить диагноз в ранние сроки и своевременно назначить эффективное лечение.

Больших успехов в последнее десятилетие достигла пренатальная диагностика наследственных заболеваний и врожденных пороков развития. Широко распространение в медицинской практике получили следующие методы: ультразвуковое исследование, амниоцентез, биопсия хориона, кордоцентез, определение альфа-фетопротеина и хориогонина, ДНК-диагностика.

Огромный вклад в диагностику хромосомных болезней внесли генетики, внедрив в практику медицины метод дифференциальной окраски хромосом. С помощью этого метода можно определить количественные и структурные перестройки хромосом, которые невозможно выявить при рутинной окраске, и точно поставить диагноз.

Большое теоретическое и практическое значение имеет изучение групп сцепления у человека и построение карт хромосом. В настоящее время у человека относительно изучены все 24 группы сцепления и продолжается установление новых локусов генов.

В последнее время в практическую медицину внедрены достижения клеточной инженерии. С помощью гибридом получают моноклональные анти-

тела, которые широко используются в диагностике заболеваний.

Наиболее распространенным и эффективным методом профилактики наследственных болезней и врожденных пороков развития является медико-генетическое консультирование, направленное на предупреждение появления в семье больных детей. Врач-генетик рассчитывает риск рождения ребенка с тяжелой наследственной патологией и при высоком риске, при отсутствии методов пренатальной диагностики дальнейшее деторождение в данной семье не рекомендуется.

С целью предупреждения рождения детей с наследственно детерминированными болезнями необходимо объяснять вред близкородственных браков молодым людям, планирующим создание семьи.

Беременным женщинам в возрасте старше 35 лет необходимо обследование у врача-генетика для исключения у плода хромосомной патологии.

Таким образом, применение достижений генетики в практической медицине способствует предупреждению рождения детей с наследственными заболеваниями и врожденными пороками развития, ранней диагностике и лечению больных.

#### Литература

1. Медицинская генетика / Под ред. Бочкова Н.П. - М.: Мастерство, 2001.
2. Биология / В.Н. Ярыгин, И.Н. Волков и др. - М.: Владос, 2001.
3. Биология / Под ред. Чебышева Н.В. - М.: ГОУ ВУНМЦ, 2005.
4. Орехова, В.А., Лажковская Т.А., Шейбак М.П. Медицинская генетика. - Минск: Высшая школа, 1999.
5. Пособие по биологии для довузовского обучения иностранных учащихся / Под ред. Чернышова В.Н., Елизаровой Л.Ю., Шведовой Л.П. - М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2004.
6. Врожденные пороки развития // Серия учебной литературы «Образование медсестер», модуль 10. - М.: Гэотар-мед, 2002.



УДК 616056.7(571.56)(091)

Основной задачей медико-генетической службы региона являются профилактика наследственных и врожденных заболеваний и снижение смертности и инвалидности.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области диагностики наследственных заболеваний, основной характеристикой последних продолжает оставаться тяжелое течение, прогрессирующее ухудшение состояния даже при проведении адекватной терапии. Наибольшее внимание сейчас привлекают возможности их предупреждения. Профилактика и диагностика наследственной патологии достигаются осуществлением следующих основных подходов: медико-генетическое консультирование, пренатальная диагностика, массовое скринирование новорожденных на наследственные болезни, диспансеризация, включающая проспективное консультирование семей высокого риска и активное выявление гетерозиготных носителей мутантных генов, контроль за мутагенными факторами окружающей среды (С.И.Козлова, 1987).

Осуществление генетического консультирования, проведение на его основании профилактических мероприятий возложены на медико-генетические учреждения, работа которых в России регламентируется приказом МЗ РФ №316 от 30.12.93 г. и организуется на трех уровнях: федеральном, региональном (межрегиональный) и районном (городской).

Организация первого самостоятельного медико-генетического кабинета с 10 штатными единицами началась в марте 1989 г. главными специалистами Гурьевой Раисой Семеновной, Григорьевой Антониной Николаевной и министром МЗ ЯАССР Местниковым Иваном Ивановичем. Помещение со временем было выделено (совместно с онкологическим диспансером новое здание общежития строителей) и определено головное медучреждение – городская клиническая больница им. С. Орджоникидзе.

Первой заведующей была назначена опытный врач-лаборант, в прошлом акушер-гинеколог Ракия Каюмовна Афанасьева. Р.К. Афанасьева сразу

А.Н. Ноговицына

## 20 ЛЕТ МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СЛУЖБЕ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

определила, что без хорошей лабораторной базы медико-генетическая консультация не сможет быть самостоятельной структурной единицей. Она за короткое время организовала прием больных, было приобретено необходимое лабораторное оборудование, построен стерильный бокс для посадки цитогенетического материала. Через недолгое время после открытия кабинета начали работу биохимический отдел, а затем и цитогенетический, постепенно прошли подготовку специалисты.

С 1991 г. был налажен скрининг новорожденных на фенилкетонурию тестом Гатри биохимиком Ветошкиной Н.А. и лаборантом Мухамедзяновой Н.В. В первые годы охват был невысоким – 40-60%, но он проводился именно в тех районах, где это заболевание может встречаться, т.е. преимущественно со славянским населением: Нерюнгри, Мирный, Алдан, Ленск, г. Якутск. В 1992 г. в п. Чульман была выявлена первая новорожденная с фенилкетонурией. Были очень большие сложности с госпитализацией больной в республиканское отделение детской неврологии и заказом спецпитания, так как в то время мало кто знал про это заболевание, особенности диетпитания. Это были 90-е годы, когда были разрушены связи не только в медицине, но и во всем укладе жизни страны. Тогда же началась диагностика хромосомной патологии, которая была необходимым звеном для медико-генетического консультирования. Первыми

цитогенетиками были Тарская Лариса Аркадьевна и Рафаилов Чагыл Адюмович, которые впоследствии продолжили свое образование в аспирантуре Медико-генетического научного центра г. Москвы.

Медико-генетическая консультация с первых дней своей работы руководствовалась приказами

и инструкциями МЗ РФ по медико-генетической службе как единственная в республике и функции свои старалась выполнять как республиканское учреждение, хотя относилась к городскому здравоохранению. С 1993 г. консультация была переведена под руководство вновь организованного Центра охраны материнства и детства (ЦОМид). Было оснащение УЗИ-аппаратом и подготовлен УЗ-специалист по пренатальной диагностике Дуглас Наталья Ивановна, расширили работу с беременными. В 1996 г. Комитетом женщин и детей РС(Я) было выделено финансирование лаборатории «Дельфия» финского производства по скринингу на врожденный гипотиреоз новорожденных, определения гормонов щитовидной железы, половых гормонов и биохимического скрининга беременных на Б. Дауна, тяжелые пороки развития центральной нервной системы. Это дало значительное повышение уровня медико-генетического консультирования в республике.

Сложность диагностики больных с наследственной патологией требовала повышения уровня квалификации врачей-генетиков, заставляла искать поддержку у коллег из федеральных центров медико-генетической службы. Обращались во многие центры, но самое большое понимание нашли в Томском научном центре – у Людмилы Павловны и Сергея Андреевича Назаренко и директора НИИ медицинской генетики и ТНЦ СО РАМН Валерия Павловича Пузырева. С 1993 г. мы по-



Научный консультант отдела молекулярной генетики ЯНЦ КМП СО РАМН академик РАМН Пузырев В.П. (третий слева), д.б.н., профессор Назаренко С.А. (пятый слева) и др. с научными сотрудниками ОМГ. Конференция в Москве, 2003 г. ноябрь

**НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна** – к.м.н., врач-генетик высшей квалиф. категории РБ №1-НЦМ, зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН.



Приезд научного консультанта Э.К. Хуснутдиновой, лето 2003 г.

лучали у них ответы на все вопросы: консультирование сложных больных, быстрое выполнение анализов, если у нас перебои с реактивами, или контроль, если у нас есть сомнения, бесперебойная подготовка нескольких десятков специалистов, которая продолжается и в настоящее время. Большую поддержку нашли мы у них и в проведении научно-исследовательских работ по медицинской генетике в республике. Первые масштабные научные исследования по изучению груза наследственных и врожденных заболеваний были проведены в 1994 г. сотрудниками НИИ медицинской генетики СО РАМН при участии врачей-генетиков нашего медико-генетического кабинета и продолжены в 2000 г. при финансовой поддержке Правительства Республики Саха (Якутия). В результате исследований были получены данные по отягощенности и разнообразию груза наследственной патологии в четырех сельскохозяйственных улусах республики, по экологическим последствиям загрязнения окружающей среды. Эти данные послужили базовым материалом для продолжения и дальнейшего расширения научных исследований в республике.

В 1998 г. состоялось открытие нового здания ЦОМид, в котором, по приказу МЗ РФ №316 от 30.12.1993 г., предусматривалась и медико-генетическая консультация со штатным расписанием. У врачей медико-генетического кабинета уже был хороший опыт работы и в клинической, и в лабораторной генетике. Пришли молодые специалисты: Максимова Н.Р., Сухомясова А.Л., Федорова С.А., Гуринова Е.Е., Павлова К.К., Павлова Т.Д. и др. Подготовка специалистов проводилась на местной рабочей базе и продолжена на кафедрах последипломной подготовки по медицинской генетике в Москве, Томске, Санкт-Петербурге, Уфе. Уже с 1999-2000 г. были запущены в работу новые для республики меди-

цинские технологии: инвазивная пренатальная диагностика хромосомных и моногенных заболеваний, ДНК-диагностика моногенных болезней. В те времена в медико-генетических консультациях других регионов данные диагностики в практической медицине на бесплатной основе не проводились. Они проводились только на базах научно-исследовательских институтов, являвшихся федеральными центрами медицинской генетики

РФ. В том, что они стали применяться у нас, есть большая заслуга врача-генетика Сидоровой Оксаны Гаврильевны и врачей-лаборантов Пестеревой Елены Львовны, Федоровой Сарданы Аркадьевны, Кононовой Сарданы Кононовны. За 10 лет только инвазивными методами было предупреждено рождение свыше 100 больных с хромосомной и моногенной патологией. Это значит, что более 100 семей получили возможность родить здоровых детей, снизился процент инвалидности и младенческой смертности в республике.

В результате неонатального скрининга выявлены в периоде новорожденности и получают лечение с врожденным гипотиреозом – 31 ребенок, с фенилкетонурией - 3, адреногенитальным синдромом -2, галактоземией-2 ребенка. Дети с очень тяжелыми заболеваниями обмена веществ получили возможность вырасти с нормальным уровнем интеллектуального и полового развития. Обучены и работают врачи-генетики в городах Нерюнгри, Вилюйске, повышается уровень медико-генетических знаний педиатров, акушер-гинекологов, невропатологов и др.

Опыт работы медико-генетической консультации РБ№1-НЦМ и проведенные научные медико-генетические исследования в республике доказали необходимость увеличения количества специалистов по медицинской генетике, подготовки научных кадров, проведения фундаментальных научных исследований в области геномики человека, и острую нуждимость населения республики в плановых профилактических мероприятиях

с целью снижения груза наследственной и врожденной патологии.

Новым этапом в развитии медико-генетической службы в республике стало создание Якутского научного центра РАМН и Правительства РС(Я) (Указ Президента РС(Я) Николаева М.Е от 30 марта 2001 г. №1376 "О создании Якутского научного центра РАМН и Правительства РС(Я)") (с декабря 2008 г. Якутский научный центр комплексных медицинских проблем Сибирского отделения Российской академии наук), в составе которого был предусмотрен отдел молекулярной генетики. Открытие научного отдела медицинской генетики позволяет выбрать перспективные направления научных исследований для республики, молодым врачам-генетикам - реализовать свои возможности в научных исследованиях, для практической медицины – возможность быстрого внедрения из науки в практику новейших достижений медицинской генетики.

Отдел молекулярной генетики ЯНЦ КМП СО РАМН состоит из 3 научно-исследовательских лабораторий:

- наследственной патологии;
- молекулярной генетики;
- популяционной генетики.

Основные направления научно-исследовательской работы в ОМГ ЯНЦ КМП СО РАМН:

1. Изучение частоты и спектра врожденной патологии, наследственных и мультифакториальных болезней у коренных народов РС(Я).

2. Молекулярно – генетические исследования моногенных наследственных болезней, наиболее распространенных в РС(Я), с целью разработки мероприятий по снижению груза наследственной патологии в регионе; оптимизация подходов ДНК-диагностики этих болезней; изучение биозтичных вопросов медико-генетического кон-



Год открытия отдела молекулярной диагностики ЯНЦ КМП СО РАМН на базе медико-генетической консультации РБ№1-НЦМ. 2002 г.



В г. Киото (Япония) на международном симпозиуме HUGO Хуснутдинова Э.К. и Максимова Н.Р. 2005 г.

сультирования в семьях с наследственной патологией.

3. Генетико-эпидемиологические и молекулярно-генетические исследования редких наследственных синдромов, встречающихся в популяциях коренного населения РС(Я).

4. Молекулярно-генетическое изучение некоторых мультифакториальных болезней, выявление генетических маркеров «риска» этих болезней у коренного населения РС(Я).

5. Молекулярно-генетические исследования структуры генофонда коренных народов РС(Я), их происхождения, эволюции и генетического родства.

Таким образом, в Республике Саха (Якутия), благодаря благоприятным материально-техническим достижениям (введение в строй ЦОМид) и поддержке со стороны руководящих органов, в относительно короткий срок была организована консультация медицинской генетики РБ№1-НЦМ МЗ РС(Я), на базе которой в 2002 г. открыт научный отдел молекулярной генетики ЯНЦ РАМН, что, безусловно, является экономически выгодным шагом как для науки, так и для практической медицины республики.

Основные результаты научно-исследовательской работы отдела молекулярной генетики ЯНЦ КМП СО РАМН за 2002-2008 гг.:

– Выявлено, что: частота наследственных болезней в сельских популяциях республики РС(Я) сопоставима с российскими регионами; разнообразие менделирующей патологии у сельского населения в РС(Я) превышает российские и сибирские популяции.

– Создан Республиканский генетический регистр наследственной и врожденной патологии; разработаны нормативно-правовые документы

медико-генетической службы РС(Я); организована материально-техническая база для работы отдела молекулярной генетики, подготовлены научные кадры, установлены научные связи с республиканскими учреждениями, российскими и зарубежными НИИ, разработаны основные направления перспективы развития медико-генетической службы.

Проведены фундаментальные научные исследования научными сотрудниками ОМГ.

Наиболее значительные из них: Сухомясовой А.Л., к.м.н., заведующей медико-генетической консультацией, зав. лаб. популяционной генетики ОМГ изучено, что распространенность миотонической дистрофии (МД) в РС(Я) составляет 10,3 на 100 тыс. населения; МД с высокой частотой встречается у якутов с преимущественным накоплением в вилюйской и центральной группе улусов (распространенность 21,3 на 100 тыс.). Установлена клиническая вариабельность МД с разным возрастом начала, тяжести клинических форм, с внутри-, и межсемейным полиморфизмом. Диагностированы случаи врожденной формы МД; в семьях с МД зарегистрированы низкий уровень рождаемости и высокая частота патологических исходов беременностей и ранней детской смертности. Разработаны подходы к диагностике и медико-генетическому консультированию МД в РС(Я), создан регистр больных МД.

Главным научным сотрудником ОМГ к.м.н. Максимовой Н.Р. выявлено, что причиной наследственной низкорослости у якутов является редкий 3-М синдром. Частота 3-М синдрома в якутской популяции 1:8700. Клинические данные больных якутов с 3-М синдромом сходны с описанными ранее зарубежными исследователями, за исключением дистресс-синдрома у новорожденных и низкой частотой костной патологии. Молекулярно-генетическая причина 3-М синдрома в якутской популяции – единственная мутация 4582insT в гене CUL7. Частота гетерозиготного носительства мутации 4582insT в гене CUL7 – 3%. ДНК-диагностика 3-М синдрома в якутской популяции позволяет проводить дородовую молекулярно-генетическую диагностику в отягощенных семьях, а выявление

гетерозиготного носительства мутации 4582insT в гене CUL7 является эффективным методом профилактики моногенной патологии в якутской популяции. Оформлен патент РФ на «Способ ДНК-диагностики 3-М синдрома в якутской популяции». Якутский синдром низкорослости внесен в Базу данных OMIM как синоним 3-М синдрома.

Федоровой С.А., д.б.н., зав. лаб. молекулярной генетики, впервые проведено исследование структуры генофонда народов Якутии (якуты, эвенки, эвены, юагиры и долганы) как целостной системы с использованием оценки генетического разнообразия митохондриальной ДНК, Y-хромосомы, аутомных Alu-инсерций и высокополиморфного участка (CTG)<sub>n</sub>-повторов DMPK-гена. На основании данных об изменчивости линий митохондриальной ДНК и Y хромосомы в популяциях Якутии получены детальные характеристики структуры генофонда коренного населения РС(Я). Определено соотношение западно- и восточноевразийских линий мтДНК и Y-хромосомы в генофондах народов Якутии, проведены оценки уровня генетического разнообразия и степени генетической дифференциации популяций региона в целом. Проведен детальный филогенетический анализ мажорных гаплогрупп C и D5a2 митохондриальной ДНК и гаплогруппы N Y хромосомы. Получены новые данные по разнообразию типов митохондриальной ДНК из древних погребений Якутии эпохи средневековья и позднего неолита. Установлено положение генофонда народов Якутии в системе генофондов популяций соседних регионов. Полученные данные существенно дополняют и расширяют представления о путях миграции популяций человека и общей картине заселения Северо-Восточной Евразии.

Молодыми учеными-генетиками Николаевой И.А., Соловьевой Н.А., Барашковым Н.А., Даниловой А.Л., Куртановым Х.А., Варламовой М.А., Павловой К.К., Гуриновой Е.Е. разрабатываются актуальные темы по генетике многофакторных заболеваний, психологическим и социально-экономическим проблемам семей с наследственными заболеваниями.

Таким образом, спустя 20 лет после открытия в республике кабинета медицинской генетики, сегодня работает коллектив медицинских генетиков, которые имеют солидный опыт клинической и исследовательской работы, крепкие научные связи в России и за рубежом. Много работы предстоит

сделать нам, чтобы помочь семьям с тяжелой наследственной патологией, которые ждут реальной помощи уже сегодня. Поздравляем всех с юбилеем медико-генетической службы рес-

публики и желаем успехов в труде, сплоченности коллектива, крепкого здоровья всем врачам и научным сотрудникам, среднему и младшему медперсоналу. Желаем взаимопони-

мания и взаимопомощи, дальнейшего благотворного сотрудничества с нашими коллегами и научными руководителями из городов Томск, Уфа, из Японии и др.

**С.А. Федорова**

## ЯКУТИЯ- БАШКИРИЯ: ИТОГИ СОТРУДНИЧЕСТВА В ОБЛАСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

Большую роль в становлении и развитии популяционной и медицинской генетики в Якутии сыграли ученые Института биохимии и генетики УНЦ РАН (г. Уфа). В 2001 г. был сформирован Отдел молекулярной генетики в ЯНЦ РАМН и Правительства РС(Я). Усилиями директора Департамента по охране генофонда народов РС(Я) В.И. Кириллиной, заместителя министра МВС РС(Я) В.К. Павлова и М.И. Томского, одного из основателей ЯНЦ РАМН и Правительства РС(Я), а ныне его директора, в качестве научного консультанта Отдела молекулярной генетики была приглашена проф. Э.К. Хуснутдинова, зав. отделом геномики Института биохимии и генетики УНЦ РАН, член-корр. АН РБ, заслуженный деятель науки Российской Федерации. В настоящее время Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, в частности Отдел геномики, руководителем которого является Эльза Камилевна, - один из ведущих центров популяционной и медицинской генетики в России. Основные направления работы уфимских генетиков:

- Этногеномика народонаселения Волго-Уральского региона, Средней Азии и Кавказа (исследование генетической истории народов, проживающих на этой территории).

- Молекулярно-генетическое изучение распространенных форм наследственной патологии в популяциях Волго-Уральского региона.

- Гены предрасположенности к зависимости от психоактивных веществ (алкоголизму, наркомании).

- Молекулярно-генетическое изучение мультифакториальных заболеваний человека (ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия, сахарный диабет, рассеянный склероз, остеопороз, бронхиальная астма, аллергический ринит, рак молочной железы, шизофрения, депрессия, псориаз).

- Гены-кандидаты мультифакториальных заболеваний в связи с индивидуальной продолжительностью жизни (проблемы геронтологии).

**ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна** – д.б.н., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН.

- Роль генетических маркеров (генов метаболизма ксенобиотиков, защищающих организм человека от вредных факторов внешней среды) в прогнозировании эффектов воздействия окружающей среды на геном человека.

Известность ученого в научном мире создают его последователи и ученики, и в этом отношении Э.К. Хуснутдинова является ярким примером, под ее руководством защищено более 72 кандидатских и 6 докторских диссертаций. В Якутском научном центре КМП СО РАМН под руководством Э.К.Хуснутдиновой подготовлены и защищены 3 кандидатских и 1 докторская диссертации:

«Биоэтические проблемы применения ДНК-диагностики моногенных заболеваний в практике медико-генетической консультации» (Кононова С.К., 2004 г., специальность 03.00.15 - генетика)

«Молекулярно-генетическое исследование инфаркта миокарда в популяции якутов» (Григорьева Л.В., 2006 г., специальность 03.00.15 - генетика, 14.00.06- кардиология)

«Молекулярно-генетическое изучение наследственной несиндромальной сенсоневральной глухоты в Республике Саха (Якутия)» (Барашков Н.А., 2007 г., специальность 03.00.15 - генетика).

«Этногеномика коренных народов Республики Саха (Якутия)» (Федорова С.А., 2008 г., специальность 03.00.15 - генетика).

Начаты исследования по изучению наследственной предрасположенности к алкогольному психозу у коренного населения республики (Куличкин С.С.), раку молочной железы (Николаева Т.И.).

Большую помощь в освоении



Группа по изучению сенсорных систем

методик, анализе и обсуждении результатов работы оказали сотрудники Отдела геномики проф. О.Е. Мустафина, Р.И. Хусаинова, В.Л. Ахметова, И.А. Кутуев, М.А. Бермишева, Л.У. Джемилева, Г.Г. Фасхутдинова, А.В. Казанцева, Б.Б. Юнусбаев, Т.Р. Насибулин.

В совместных исследованиях впервые получены сведения по генетической истории коренного населения Якутии (юкагиров, эвенков, эвенов, якутов и долган), изучены генетические основы некоторых наследственных и мультифакториальных болезней, рас-



Поездка в Соттинцы



V съезд Российского общества медицинских генетиков. г.Уфа, 2005 г.

пространенных в Якутии, разработаны подходы к ДНК-диагностике и решен ряд задач в области биоэтики. К настоящему времени опубликовано более 50 совместных публикаций, из них половина в международной печати.

Вышеназванные научные направления исследований поддержаны грантами: Президента Республики Саха (Якутия) в области здравоохранения и медицинской науки (в 2001, 2003, 2004, 2005 гг.), Президента Республики Саха (Якутия) для молодых ученых

В рамках реализации республиканской программы «Развитие генодиагностики в Республике Саха (Якутия)» в 2002 г. был заключен договор о научно-техническом сотрудничестве между ЯНЦ РАМН и Правительства РС(Я) и Эстонским Биоцентром. Эстонский Биоцентр (г.Тарту) является одним из наиболее известных европейских генетических центров - в 2000 г. он вошел в пятерку лучших из 184 научно-исследовательских институтов Европы и получил категорию Centre of Excellence. Основные направления исследований находятся в области молекулярной медицины, этногеномики и биотехнологии. Директор Эстонского Биоцентра – профессор Рихард Виллемс, президент Академии наук Эстонии, член Нобелевского комитета по медицине.

Основной целью научно-исследовательских работ группы эволю-

**ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна** – д.б.н., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН.

(2007г.), РФФИ в 2008г. (08-04-90730моб\_ст), INTAS 2003-2004 гг. (по изучению полиморфизма Alu-повторов).

Проф. Э.К. Хуснутдинова является членом экспертного совета по российским и международным грантам РФФИ, INTAS, членом редакционного совета журналов «Молекулярная биология», «Balkan Journal of Medical Genetics», «Якутского медицинского журнала», членом международных научных обществ «Human Genome Organization» и «European Organization

of Human Genetics». Эльза Камилевна – лауреат премий им. академика РАН А.А.Баева (1999), Координационного межведомственного Совета Миннауки РФ «Технологии живых систем»(2001), международной академической издательской компании «Наука/Интерпериодика» за лучшие публикации (2002), РФФИ за научно-популярные статьи (2001 и 2003). В 2003-2005 гг. она получила приглашение и работала в течение длительного времени в должности профессора в Центре молекулярной и



Э.К. Хуснутдинова, поездка на Ленские Столбы. 2004 г.

митохондриальной медицины и генетики Калифорнийского университета. С 2006 г. Э.К. Хуснутдинова является представителем России в бюро Международной организации по изучению генома человека (HUGO), включающей 15 человек из разных стран мира. Несомненно то, что иметь научным консультантом ученого мирового ранга, большая удача для молодых исследователей Якутии.

**С.А. Федорова**

## ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ ЭТНОГЕНОМИКИ: СОТРУДНИЧЕСТВО С ЭСТОНСКИМ БИОЦЕНТРОМ

ционной биологии, в которой автор данной статьи работала в качестве приглашенного исследователя (visitor scientist), является реконструкция генетической истории Homo sapiens на основе разнообразия генома человека в популяциях. В работе используются, главным образом, две гапloidные генетические системы – мтДНК, наследуемая по материнской линии, и Y-хромосома, передающаяся от отца к сыновьям. Исследования, проводимые эстонскими генетиками, затрагивают широкий временной интервал развития человечества: от самых ранних стадий - выхода анатомически современного человека из Африки в Евразию, распространения в Австралию и Америку, до демографической истории отдельных популяций в относительно недавнем прошлом, измеряемом сотнями лет. Наиболее актуальными остаются такие вопросы, как факторы динамики популяций, распространение генов и языков, смена языков, гендерные раз-

личия в демографической истории человечества. Это междисциплинарные исследования, в которых необходимо интенсивное сотрудничество с археологами, антропологами, лингвистами, историками и другими специалистами из различных областей науки. Проведение подобного рода исследований подразумевает широкие связи с другими научными центрами. В Эстонском Биоцентре работают молодые ученые из многих стран мира - Индии, Португалии, Франции, Италии, Великобритании, Хорватии, Словакии, Румынии, России. Часть из них проводят исследования в течение нескольких лет с защитой диссертации. Кроме того, в лабораториях существует постоянный поток молодых ученых, длительность стажировки которых 2-3 месяца. Обычными являются еженедельные научные семинары, на которых обсуждаются результаты проведенных исследований и заслушиваются доклады известных ученых, приезжающих в Эстонский Биоцентр для обмена мне-

ниями и установления сотрудничества. Ведущие сотрудники Биоцентра имеют возможность выезжать на длительные стажировки (в течение года) в научные центры Европы и США для обмена опытом и проведения совместных исследований с сохранением рабочего места. С целью предотвращения «утечки мозгов» действует система грантов для поддержки женщин в науке, а также репатриантов.

Публикации ученых группы эволюционной генетики имеют высочайший рейтинг, достаточно отметить, что в 2008 г. некоторые из них, касающиеся филогении древних африканских типов мтДНК, генетической истории русских и евреев-ашкенази, опубли-

кованные в American Journal of Human Genetics (импакт-фактор 12,65), в течение всего 2008 года находились на первых местах по количеству подписчиков.

За период работы в Эстонском Биоцентре нами получены новые данные о генетической структуре и генетических взаимосвязях популяций народов Якутии – юкагиров, эвенков, эвенов, якутов (саха) и долган. Изучены эволюционные процессы на примере основных типов мтДНК и Y-хромосомы, распространенных в Якутии, генетические реконструкции сопоставлены с историческими данными о происхождении коренных народов Якутии. Полученные данные существенно до-

полняют и расширяют представления о путях миграций популяций человека и общей картине заселения Северо-Восточной Евразии. В результате совместных исследований вышло около 20 публикаций.

Следует отметить, что работа в зарубежных центрах, обмен опытом, обучение новым современным методам и подходам являются необходимостью для научных работников, желающих совершенствовать свои знания и умения. В целом подобный опыт повышает качество научных работ, позволяет быстро внедрить в своем учреждении подходы, принятые в мировой науке, и способствует повышению рейтинга учреждения.

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ И ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ

Н.Р. Максимова, А.Л. Сухомясова, А.Н. Ноговицына, В.П. Пузырев

### ЭТНОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ НАСЛЕДСТВЕННАЯ ПАТОЛОГИЯ В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК 616.-055.5/7(571.56)

Проведено генетико-эпидемиологическое исследование распространенности наследственной патологии по данным Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии РС(Я). Выделены восемь наследственных этноспецифических заболеваний, которым присвоено название «Якутские наследственные болезни»: спинocerebellарная атаксия 1-го типа, миотоническая дистрофия, наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия I типа, окулофарингеальная миодистрофия, атаксия Фридрейха, спинально-бульбарная амиотрофия Кеннеди, 3-М синдром, SCOP синдром, которые встречаются с высокой частотой среди якутского населения и для которых выявлена специфическая молекулярно-генетическая причина.

**Ключевые слова:** спинocerebellарная атаксия, миотоническая дистрофия, наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия, окулофарингеальная миодистрофия, SCOP синдром.

The genetic-epidemiological analysis of hereditary diseases in Republic Sakha (Yakutia) on the basis of the Republican genetic register is carried out. 8 hereditary ethnospecific diseases named "Yakut hereditary diseases" are revealed: spinocerebellar ataxia of the 1 type, myotonic dystrophy, hereditary enzymopenic methemoglobinemia I type, oculopharyngeal myodystrophy, Friedreich ataxia, Kennedy's spinal-bulbar amyotrophia, 3-M syndrome, SCOP-syndrome, which are met with high frequency among the Yakut population and have ethnospecific molecular-genetic cause.

**Keywords:** hereditary pathology, spinocerebellar ataxia of the 1 type, myotonic dystrophy, hereditary enzymopenic methemoglobinemia of the I type, oculopharyngeal myodystrophy, SCOP-syndrome.

#### Введение

В развитии клинической и популяционной генетики важной задачей является изучение распространения наследственных заболеваний в различных популяциях, установление молекулярно-генетических причин их возникновения и развития, а также

причин их накопления в конкретных популяциях и этносах [3].

Одним из перспективных и эффективных способов выявления наследственной патологии является работа в рамках автоматизированного генетического регистра наследственной и врожденной патологии, которая позволяет проводить регистрацию и систематическое длительное наблюдение больного и семьи с наследственным заболеванием в течение ряда лет и в сомнительных случаях выставлять окончательный диагноз наследственного заболевания только через определенный промежуток времени после длительного наблюдения за семьей и больным [8]. Регистры, учитывающие всю наследственную патологию, позволяют выделить частые формы наследственных заболеваний – объекты пристального внимания при планировании профилактических мероприятий. Также работа медико-генетичес-

кой службы в рамках генетических регистров помогает выявлять и работать с родственниками больных, находящихся в группе риска [12].

**Целью** исследования явился генетико-эпидемиологический анализ распространенности и структуры наследственной патологии по данным Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии в Республике Саха (Якутия).

#### Материалы и методы

Генетико-эпидемиологическое изучение спектра и частоты наследственной патологии в Республике Саха (Якутия) проведено на основании созданного на базе медико-генетической консультации Республики Саха (Якутия) Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии, где собрана и накоплена информация по наследственной и врожденной патологии с 2000 г. Ре-

**МАКСИМОВА Надежда Романовна** – к.м.н., врач-генетик первой категории, лауреат Госпремии РС(Я) в области науки и техники, гл.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, e-mail: pogan@yandex.ru; **СУХОМЯСОВА Анастасия Лукична** – к.м.н., отличник здравоохранения РФ, зав. МГК РБ№1-НЦМ, врач-генетик первой категории, зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; **НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна** – к.м.н., врач-генетик высшей категории РБ№1-НЦМ, отличник здравоохранения РС(Я), лауреат Госпремии РС(Я) в области науки и техники РС(Я), зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; **ПУЗЫРЕВ Валерий Павлович** – академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ, директор НИИ медицинской генетики СО РАМН (Томск).

Таблица 1

**Список наследственных заболеваний по данным Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии Республики Саха (Якутия)**

№	Диагноз	ОМIM	Всего		Якуты	
			Б	С	Б	С
1	2	3	4	5	6	7
<b>Аутосомно-доминантные заболевания</b>						
1	Аарского синдром	100050	5	4	3	2
2	Альпорта синдром	104200, 153650	4	4	4	4
3	Акроцефалосиндактилии синдром	101200, 101400	5	5	0	0
4	Ахондроплазия	100800	6	4	0	0
5	Ван дер Вуда синдром	119300	2	1	0	0
6	Виллебранда болезнь	193400	8	4	6	2
7	Вильямса-Бурена синдром	194050	2	2	0	0
8	Врожденная катаракта	116700	9	4	9	4
9	Гипохондроплазия	146000	13	7	10	6
10	Гольденхара синдром	164210	5	5	5	5
11	Дарье-Уйта эктодермальная дисплазия	124200	3	3	1	1
12	Дентаторубро-паллидолюисова атрофия	125370	2	1	2	1
13	Ихтиоз вульгарный	146750	25	17	25	17
14	Жильбера синдром	143500	12	11	4	3
15	Корнелии де Ланге синдром	122470	2	2	2	2
16	Марфана синдром	154700	46	35	18	16
17	Маршалла синдром	154780	1	1	1	1
18	Метафизарный дизостоз тип Шмидта	156500	2	1	2	1
19	Миотоническая дистрофия Россолимо-Куршманна-Штейнерта-Баттена	160900	114	51	111	49
20	Миотония врожденная Томсена	160800	16	7	13	5
21	Множественных экзостозов синдром	133700	45	23	36	17
22	Множественная эпифизарная дисплазия	132400	8	5	7	4
23	Наследственная мотосенсорная нейропатия Руси-Леви	180800	2	2	0	0
24	Невральная амиотрофия Шарко-Мари-Тута	118200	37	22	33	17
25	Нейросенсорная тугоухость	162400	12	6	4	2
26	Несовершенный остеогенез	166200	27	21	24	20
27	Нунен синдром	163950	5	5	2	2
28	Окулофарингеальная дистрофия	164300	50	45	48	43
29	Периодический паралич	170400	2	2	0	0
30	Поланда синдром	173800	4	4	3	3
31	Поликистоз почек, взрослый тип	173900	21	11	14	6
32	Радиоульнарный синозостоз	179300	2	1	0	0
33	Рассела-Сильвера синдром	180860	2	2	0	0
34	Реклингаузена нейрофиброматоз	162200	78	59	56	44
35	Сотоса синдром	117550	5	5	3	3
36	Спиноцеребеллярная атаксия I типа	164400	147	33	147	33
37	Спондилоэпифизарная дисплазия врожденная	183900	2	2	0	0
38	Сфероцитоз наследственный (Болезнь Минковского-Шоффара)	182900	13	10	4	3
39	Геморрагическая телеангиэктазия Рендю-Ослера-Вебера	187300	1	1	1	1
40	Туберозный склероз	191100	5	5	5	5
41	Франческетти-Тричера-Коллинза челюстно-лицевой дизостоз	154500	6	3	2	1
42	Фримена-Шелдона синдром	193700	1	1	0	0
43	Холта-Орама синдром	142900	4	4	2	2
44	Хорея Гентингтона	143100	1	1	0	0
45	Черепно-ключичный дизостоз	119600	3	1	3	1
46	Штурге-Вебера синдром	185300	5	4	3	2
47	Элерса-Данлоса синдром	130000	14	10	7	6
	Всего		784	457	620	334
<b>Аутосомно - рецессивные заболевания</b>						
1	Адреногенитальный синдром	201910, 202010	12	11	5	4
2	Альбинизм глаз-кожный	203300	3	3	0	0
3	Атаксия Фридрейха	229300	9	9	8	8
4	Атрофия ягодичных мышц	231970	3	3	3	3
5	Буллезный эпидермолиз кистей и стоп	226600	8	6	3	2
6	Врожденная катаракта	212500	24	12	20	10
7	Гонад дисгенезия, XX тип	233300	4	4	2	2
8	Диастрофическая дисплазия	222600	1	1	1	1
9	Диэфизарная дисплазия тип Камурати-Энгельменна	131300	1	1	1	1
10	Ихтиоз вульгарный	242300	6	3	4	2
11	Картегенера-Зиверта синдром	244400	4	4	0	0
12	Коновалова -Вильсона болезнь	277900	3	1	0	0
13	Лейкодистрофия	250100	1	1	1	1
14	Метгемоглобинемия энзимопеническая	250800	34	32	34	32
15	Микроотия с атрезией наружного слухового прохода и проводящей глухотой	251800	3	3	3	3
16	Микроцефалия	251200	5	4	2	1

гистр создан на базе экспедиционных данных и данных ежедневного приема больных с наследственной и врожденной патологией и включает в себя 2 блока: мониторинг врожденных пороков развития и Республиканский генетический регистр наследственной и врожденной патологии. Компьютерная основа регистра - компьютерная программа «Регистр наследственной и врожденной патологии», зарегистрированная в центральном архиве Российского агентства по патентам за №990720 от 29.09.99 года (авторы: Китайник Г.П., Забарова Л.В., Дегтярев Г.Ю.).

### Результаты и обсуждение

По данным Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии Республики Саха (Якутия) зарегистрировано более 2800 семей с наследственной и врожденной патологией, весь массив диагнозов включает около 130 нозологий. В настоящее исследование были включены только наследуемые формы, учтенные в Республиканском генетическом регистре наследственной и врожденной патологии Республики Саха (Якутия) (табл.1). Весь спектр наследственной патологии включает 105 нозологий. Диагноз наследственного заболевания был выставлен 1249 больным из 860 семей, из них - 975 больных из 649 семей якутской национальности.

Во всех случаях выявленной патологии на основании клинко-генеалогического обследования с применением дополнительных лабораторных методов диагностики и привлечением узких специалистов был выставлен диагноз и решен вопрос о типе наследования заболевания.

Всего в регистре с наследственным заболеванием с аутосомно-доминантным (АД) типом наследования состоят на диспансерном учете 784 больных из 457 семей, из которых 620 больных из 334 якутских семей (табл. 1). Среди болезней с АД типом наследования установлено 47 менделирующих заболеваний. Наиболее часто встречались спиноцеребеллярная атаксия 1-го типа (СЦА 1), миотоническая дистрофия (МД), невральная амиотрофия Шарко-Мари-Тус, нейрофиброматоз Реклингаузена, окулофарингеальная миодистрофия (ОФМД), синдром Марфана, синдром множественных экзостозов. Из перечисленных заболеваний все, кроме нейрофиброматоза Реклингаузена и синдрома Марфана, встречаются в основном в якутских семьях.

Окончание табл.1

1	2	3	4	5	6	7
17	Миопатия Эрба - Рога	253600	1	1	1	1
18	MELAS синдром	540000	2	2	0	0
19	Муковисцидоз	219700	5	5	0	0
20	Мукополисахаридоз IV, тип А	253000	1	1	0	0
21	Нанизм с субатрофией зрительных нервов, колбочковой дисфункцией и пельгеровской аномалией лейкоцитов (SCOP синдром)		43	40	43	40
22	Невральная амиотрофия Шарко – Мари-Туга	214400	49	47	49	47
23	Несиндромальная тугоухость	220700	10	8	5	5
24	Несовершенный остеогенез	259400	5	5	4	4
25	Обратного расположения органов синдром	270100	4	4	4	4
26	Остеопетроз	259700	1	1	1	1
27	Параплегия спастическая семейная (болезнь Штрюмпеля)	270800	7	5	6	4
28	Рефсума синдром	266500	1	1	1	1
29	Ротмунда -Томсона синдром	268400	1	1	0	0
30	Спинальная амиотрофия Верднига - Гоффмана	253300	2	2	1	1
31	Спондилоэпифизарная дисплазия поздняя	271600	2	2	2	2
32	Фенилкетонурия	261600	8	8	0	0
33	Эллиса-ван Кревельда хондроэктодермальная дисплазия	225500	1	1	1	1
34	Якутский синдром низкорослости или 3-М синдром	273750	55	46	55	46
	Всего		319	278	260	227
X - сцепленные рецессивные заболевания						
1	Ангидротическая эктодермальная дисплазия	305100	1	1	0	0
2	Бергсона-Форсмана-Лемана синдром	301900	1	1	0	0
3	Гемофилия А	306700	25	15	13	12
4	Гемофилия Б	306900	7	7	7	7
5	Гонад дисгенезия, ХУ тип	306100	3	3	2	2
6	Ихтиоз вульгарный	308100	38	36	38	36
7	Ихтиоза и первичного гипогонадизма синдром	308200	1	1	1	1
8	Прогрессирующая мышечная дистрофия, тип Беккера	310200	1	1	0	0
9	Прогрессирующая мышечная дистрофия, тип Дюшенна	310200	24	18	12	11
10	Спинально-бульбарная амиотрофия Кеннеди	313200	6	4	6	4
11	Тестикулярной феминизации синдром	300068	3	2	2	1
12	Эмери-Дрейфуса синдром	310300	2	2	0	0
	Всего		112	91	81	74
X - сцепленные доминантные						
1	Гипофосфатемия (Фосфатдиабет)	307800	4	4	4	4
2	Ретта синдром	312750	1	1	1	1
	Всего		5	5	5	5
Наследственные синдромы с неизвестным типом наследования						
1	Гемигипертрофия	235000	8	8	4	4
2	Казабаха - Мерритта синдром	141000	1	1	0	0
3	Клиппеля – Треноне - Вебера синдром	149000	6	6	0	0
4	Мак Кюна-Олбрайта синдром	174800	1	1	1	1
5	Нейрокожный меланоз	249400	3	3	2	2
6	Прогерия	176670	1	1	0	0
7	Протеуса синдром	176920	2	2	1	1
8	Рокитанского - Кюстера-Хаушера синдром (влагалища аплазия)	277000	1	1	1	1
9	Сливового живота (prune belly) синдром	100100	2	2	0	0
10	Фиброзная дисплазия полиостотическая	174800	4	4	0	0
	Всего		29	29	9	9
	ВСЕГО		1249	860	975	649

Примечание. OMIM - номер менделирующего заболевания по каталогу МакКьюсика; Б-больные, С- семьи.

Больных со спиноцеребеллярной атаксией 1-го типа в регистре учтено более 210, а в табл. 1 приведены данные о 147 больных из 33 якутских семей из нескольких поколений, лично консультированных врачами-генетиками с подтвержденным в медико-генетической консультации РБ№1-НЦМ молекулярно-генетическим диагнозом ССА1.

Вторым частым наследственным заболеванием с АД типом наследования является миотоническая дистрофия.

В регистре имеется информация о 151 больном с миотонической дистрофией, а в табл.1 приведены данные о 114 консультированных в МГК РБ№1-НЦМ больных из 51 семьи с подтвержденным молекулярно-генетическими методами диагнозом, из которых 111 больных из 49 якутских семей.

Третье место по частоте среди болезней с АД типом наследования занимает нейрофиброматоз Реклингаузена (78 больных из 59 семей, из них 56 больных из 44 якутских семей). Сле-

дующими по частоте заболеваниями являются окулофарингеальная миодистрофия (50 больных из 45 семей, 48 больных из 43 якутских семей), синдром Марфана (46 больных из 35 семей, из которых 18 больных из 16 якутских семей) и синдром множественных экзостозов (45 больных из 23 семей, из них 36 больных из 17 якутских семей).

В МГК обратилось 319 больных из 278 семей, которым в ходе обследования в МГК РБ№1-НЦМ выставлен диагноз наследственного заболевания с аутосомно-рецессивным (АР) типом наследования. 260 больных были из 227 якутских семей. Аутосомно-рецессивные заболевания представлены 34 нозологическими формами патологии. Чаще других встречаются якутский синдром низкорослости (ЯСН), наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия (НЭМ), нанизм с субатрофией зрительных нервов, колбочковой дисфункцией и пельгеровской аномалией лейкоцитов (SCOP синдром) и невральная амиотрофия Шарко-Мари-Тус. На первом месте по частоте среди АР-патологии стоит якутский наследственный нанизм или 3-М синдром (55 больных из 46 якутских семей). Второе по частоте АР наследственное заболевание – также синдром с низким ростом (SCOP синдром). В регистре учтено 43 больных из 40 якутских семей. Следующее по частоте заболевание - наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия I типа (34 больных из 32 якутских семей).

Всего в регистре учтено 12 нозологий с X-сцепленным рецессивным типом наследования. На диспансерном учете состоят 112 больных из 91 семьи, 81 из них – из 74 якутских семей. Частыми в этой группе являются гемофилия А, ихтиоз и прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна. Больных с X-сцепленным доминантным типом наследования всего 5. 29 больных из 29 семей были консультированы по 10 нозологиям с неизвестным типом наследования.

Таким образом, анализ регистра показал, что в Республике Саха (Якутия) имеется накопление наследственной патологии, в основном у якутов. Ранее проведенные исследования и результаты настоящего исследования выявили наследственные формы, встречающиеся с высокой частотой среди якутского населения и для которых выявлена специфическая молекулярно-генетическая причина [1,2,5,6,9-11,13]. К ним мы отнесли восемь наследственных заболеваний из числа «якутских» на-

Таблица 2

Сравнительные данные по частоте наследственных болезней и специфическим мутациям у якутов и в мире

Название болезни (OMIM)	Тип наследования	Ген	Мутация у якутов	Распространенность болезни на 100 тыс. чел.	
				у якутов	в мире
Спинаocerebellарная атаксия I типа (164400)	АД	ATXN1	экспансия CAG-повторов[9]	36,8 [9]	1,0-2,0 [7]
Миотоническая дистрофия (160900)	АД	DMPK	экспансия CTG-повторов[11]	21,3 [11]	4,0-5,0 [14]
Наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия I типа (250800)	АР	DIA1	Pro269Leu*[6]	14,9 [11]	1,0 [6]
Окулофарингеальная мышечная дистрофия (164300)	АД	PABPN1	экспансия 10 GCG-повторов*[5]	11,1 [*]	1,0 [6]
Спинально-бульбарная амиотрофия Кеннеди (313200)	X-сцепл. рецессив.	AR	экспансия CAG-повторов[*]	2,8 [*]	2,5 [7]
Атаксия Фридрейха (229300)	АР	FRDA	экспансия GAA-повторов[*]	2,78 [*]	2-5 [7]
3-M синдром или ЯСН (273750)	АР	CUL7	4582insT*[13]	12,72 [13]	неизвестно
Синдром низкорослости с колбочковой дисфункцией сетчатки, с атрофией зрительных нервов, пельгеровской аномалией лейкоцитов (SCOP синдром)	АР	NAG	R1914H*[*]	9,95 [*]	неизвестно

Примечание. [] - литературные ссылки. [\*] Результаты настоящего исследования. \* Специфические только для якутов мутации. OMIM – номер в электронной версии каталога В. Маккьюсика «Mendelian Inheritance in Man» (MIM): [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/). АД и АР – аутосомно-доминантный и аутосомно-рецессивный типы наследования.

Таблица 3

Распространенность пяти наследственных заболеваний у якутов в Республике Саха (Якутия)

следственных болезней: спиноocerebellарная атаксия 1-го типа, миотоническая дистрофия, наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия I типа, окулофарингеальная миодистрофия, атаксия Фридрейха, спинально-бульбарная амиотрофия Кеннеди, 3-M синдром, SCOP синдром (табл. 2).

Распространенность СЦА1, МД и НЭМ, по результатам ранее проведенных исследований, превышает мировые значения (табл. 2) [1,2,9-11].

Ранее не изученные ОФМД и атаксия Фридрейха зарегистрированы в основном (92-96%) у якутского населения, а болезнь Кеннеди и обе наследственные формы низкорослости – только у якутов. Распространенность ОФМД (11,1 на 100 тыс. населения) у якутов в 10 раз выше распространенности, описанной в мире, а частоты распространенности атаксии Фридрейха (2,78 на 100 тыс.) и болезни Кеннеди (2,8 на 100 тыс.) колеблется в пределах мировых значений (табл. 2). Показатели распространенности двух форм низкорослости в якутской популяции: ЯСН и SCOP синдрома получены впервые, и позволяют отнести оба заболевания к разряду частых наследственных заболеваний у якутов, после таких как спиноocerebellарная атаксия 1-го типа, миотоническая дистрофия, наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия [2,6,9-11] (табл.2).

При анализе территориального распространения заболевания определены очаги накопления для пяти изученных заболеваний по отдельности (табл. 3, рисунок). В вилюйской группе улусов и в Центральной Якутии зарегистрированы единичные случаи ауто-

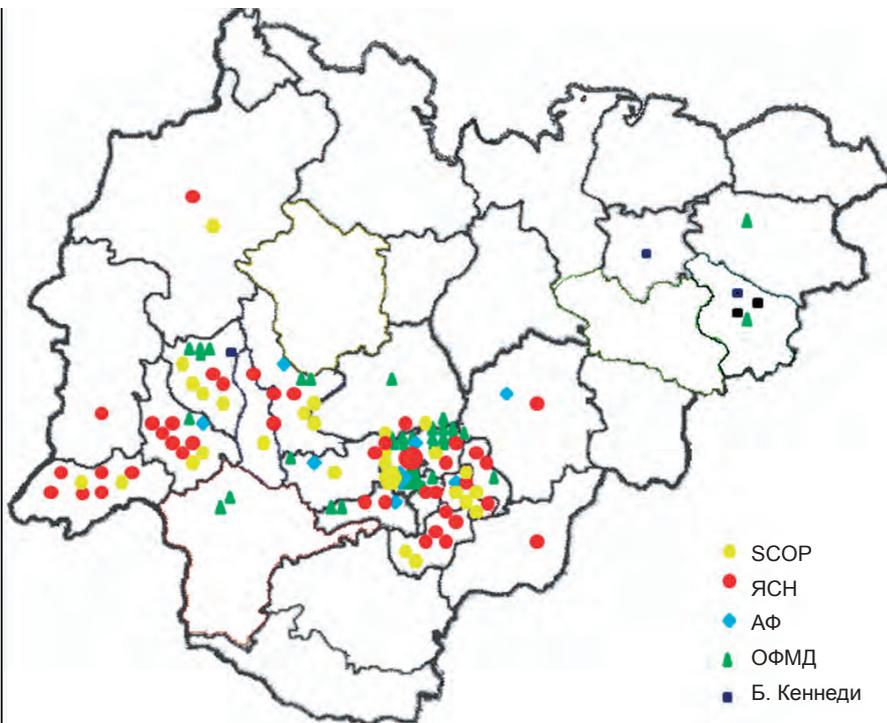
Место проживания		Распространенность на 100 тыс. якутского населения (абс. кол-во человек)				
		ОФМД	АФ	Б.Кеннеди	ЯСН	SCOP
Вилюйская группа	Верхневилуйский	-	-	-	14,39 (3)	4,80 (1)
	Вилуйский	9,4 (2)	4,68 (1)	-	4,68 (1)	14,05 (3)
	Нюрбинский	21,0 (5)	-	0,8 (1)	8,39 (2)	16,78 (4)
	Сунтарский	4,0 (1)	4,06 (1)	-	24,35 (6)	8,12 (2)
	Кобяйский	10,8 (1)	-	-	-	-
Центральная группа	Амгинский	-	-	-	31,92(5)	12,77 (2)
	Горный	9,2 (1)	9,22 (1)	-	6,81 (2)	9,22 (1)
	Намский	24,7 (5)	4,95 (1)	-	24,74 (5)	14,84 (3)
	Таттинский	6,2 (1)	-	-	12,34(2)	6,17 (1)
	Хангаласский	9,5 (2)	4,77 (1)	-	9,55 (2)	14,32 (3)
	Чурапчинский	-	5,21(1)	-	5,22 (1)	26,08 (5)
	Усть-Алданский	45,4 (10)	-	-	4,54 (1)	9,09 (2)
	Мегино-Кангаласский	6,8 (2)	-	-	-	-
Юго-Западная группа	Ленский	-	-	-	152,13 (6)	50,71 (2)
	Олекминский	26,1 (3)	-	-	-	-
	Мирнинский	-	-	-	17,35 (1)	-
Северная группа	Абыйский	-	-	106,6 (2)	-	-
	Томпонский	-	18,92 (1)	-	18,92 (1)	-
	Усть-Майский	-	-	-	89,13 (1)	-
	Средне-колымский	14,8 (1)	-	-	-	-
	Оленекский	-	-	-	80,13 (1)	80,13 (1)
	Верхнеколымский	68,3 (1)	-	408,7 (3)	-	-
г. Якутск	12,4 (13)	4,79 (4)	-	14,36 (15)	12,45 (13)	
Республика Саха (Якутия)	11,1 (48)	2,78 (11)	2,8 (6)	12,72 (55)	9,95 (43)	

Примечание. Сокращения ОФМД, АФ, Б. Кеннеди, ЯСН, SCOP-синдром см. в тексте.

сомно-рецессивной атаксии Фридрейха без накопления в отдельных улусах. Интересен тот факт, что заболевание зарегистрировано у якутского этноса, являющегося представителем азиатской расы, среди которых ранее не было зарегистрировано случаев атаксии Фридрейха [15]. Это может быть объяснено привнесением в генофонд якутов европейской компоненты, поэтому выяснение причин возникновения и распространения атаксии Фридрейха среди якутов требует дальнейшего изучения.

X-сцепленная спинально-бульбарная амиотрофия Кеннеди распространена в северных улусах (Абыйском и Верхнеколымском), где частота заболевания превышает мировые значения в сотни раз (табл.3, рисунок). Причиной накопления может быть положительная брачная ассортативность по национальности и низкая миграционная активность женщин якуток в Верхнеколымском улусе [4].

Аутосомно-доминантная окулофарингеальная миодистрофия получила накопление на территории Централь-



Карта распространенности и районов накопления пяти наследственных заболеваний в Республике Саха (Якутия). Сокращения см. в тексте

ной Якутии и вилюйской группы улусов, особенно в Усть-Алданском улусе и городе Якутске. Такой же характер накопления характерен для других аутосомно-доминантных заболеваний - спиноцереbellарной атаксии 1-го типа и миотонической дистрофии [9,11].

Два заболевания с низкорослостью получили высокое накопление в центральной и вилюйской группах улусов (табл.3, рис. 1), где в основном и проживает якутское население с давних времен. Но наибольшая частота распространенности для якутского синдрома низкорослости (152,13 на 100 тыс. населения) была получена в Ленском улусе со смешанным населением, куда могли мигрировать якуты из соседнего Сунтарского улуса, где также показаны высокие значения распространенности (24,35 на 100 тыс.) якутского синдрома низкорослости.

Выявлена молекулярно-генетическая причина всех восьми наследственных заболеваний (табл. 2). Для четырех из них выявлены мажорные мутации, характерные для якутской популяции: миссенс мутация Pro269Leu в гене DIA1 для наследственной энзимопенической метгемоглобинемии, экспансия (GCG)<sub>10</sub> в гене PABPN1 для окулофарингеальной миодистрофии, нонсенс мутация 4582insT в гене CUL7 для ЯСН (3-М синдрома) и миссенс мутация мутации R1914N в гене NAG для

синдрома низкорослости с атрофией зрительных нервов, колбочковой дисфункцией сетчатки и пельгеровской аномалией лейкоцитов [5,6,13].

По результатам популяционно-генетических исследований получены данные о частоте гетерозиготного носительства новой мутации 4582insT в гене CUL7 в популяциях якутов и народов Сибири и Якутии (данные не представлены). Частота гетерозиготного носительства мутации 4582insT в гене CUL7 в якутской популяции составляет 3%, что говорит о том, что 12968 якутов (каждый 33-й якут) являются гетерозиготными носителями мутации 4582insT в гене CUL7. В популяциях эвенков, эвенков, юкагиров, русских Томской области и бурятов из Бурятии мутации 4582insT в гене CUL7 не обнаружено.

Представляется перспективным дальнейшее изучение эпидемиологии и молекулярной природы якутских наследственных болезней, могущее открыть новые гены и новые молекулярно-генетические механизмы развития специфических болезней. Это имеет не только фундаментальное значение для клинической генетики, но и может послужить основой для реконструкции службы медико-генетической помощи населению Якутии, ориентированной в популяционном плане на уменьшение груза наследственных якутских болезней, оптимизацию индивидуаль-

но-семейного медико-генетического консультирования, концентрацию финансово-экономических усилий Правительства Республики Саха (Якутия) на профилактику и раннее выявление прежде всего частых в Якутии наследственных болезней.

### Литература

1. Банщикова Е.С. Особенности клинического течения и морфофункциональное состояние эритроцитов у детей с наследственной энзимопенической метгемоглобинемией: автореф. дис. канд. мед. наук / Е.С. Банщикова. Томск, 2002.- 25 с.
2. Брахфогель И.Ф. Молекулярно-генетическая характеристика спиноцереbellарной атаксии I типа в Якутии: автореф. дис. канд. биол. наук / И.Ф. Брахфогель. - Томск, 2000. - 24 с.
3. Геномика- медицине. Научное издание / Под ред. акад. РАМН В.И. Иванова и акад. РАН Л.Л. Кисилева. - М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. - 392 с.
4. Генетико-демографическое изучение народонаселения Республики Саха (Якутия) / А.Н. Кучер [и др.] // Якутский медицинский журнал.- 2005.- №2.- 4-12 с.
5. Клинико-генеалогическая и молекулярно-генетическая характеристика окулофарингеальной миодистрофии в Республике Саха (Якутия) / Н.Р. Максимова [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2008. - Т.108. - №6. - С. 52-60.
6. Молекулярно-генетическая причина наследственной метгемоглобинемии первого типа в Якутии / Н.М. Галеева [и др.] // Медицинская генетика. - 2006. - Т. 5. - С. 15-20.
7. Наследственные атаксии и параличи / С.Н. Иллариошкин [и др.] . М.; МЕДпресс-информ, 2006. - 416 с.
8. Наследственные болезни в популяциях человека /Под ред. Е.К. Гинтера.- М.: Медицина, 2002.- 304 с.
9. Спинаocerebellарная атаксия первого типа в Якутии: распространенность и клинико-генетические сопоставления / Ф.А. Платонов [и др.] // Медицинская генетика. 2004. Т. 5. С. 242-248.
10. Структура и разнообразие наследственной патологии в Республике Саха(Якутия) / Тарская Л.А. [и др.] // Генетика. - 2004. - Т.40. - №11. - С.51-62.
11. Сухомясова А.Л. Аутосомно - доминантная миотоническая дистрофия в Республике Саха (Якутия): автореф. дис. канд. мед. наук / А.Л. Сухомясова. - Томск, 2005. - 22 с.
12. Comparison of genetic services with and without genetic registers: access and attitudes to genetic counseling services among relatives of genetic clinic patients / L. Kerzin-Storror [et al.] // J.Med.Genet. - 2002.- V. 39.- P. 85-89.
13. Clinical, molecular and Histopathological features of short STAture syndrome with novel CUL7 Mutation in Yakuts: new population isolate in Asia / N. Maksimova [et al.] // J. Med. Genetics.- 2007. - V.44. - №12. - P. 772-778.
14. Myotonic dystrophy: present management, future therapy / P.S. Harper [et al.] . New York: Oxford University Press, 2004. 251 p.
15. Pandolfo M. Molecular basis of Friedreich ataxia / M. Pandolfo//Movement Disorders. - 2001. - V. 16. - No. 5.- P. 815-821.
16. Recent studies on oculopharyngeal muscular dystrophy in Quebec / J.-P. Bouchard [et al.] // Neuromusc. Disord. -1997. -V. 7 (Suppl 1). -P. S22-29.
17. Rethinking genotype and phenotype correlations in polyglutamin expansion disorders / S.E. Andrew [et al.] // Hum. Mol.Genet.- 1997.-N6.- P.2005-2010.

В.Г. Часнык, С.Я. Яковлева, Т.Е. Бурцева, М.И. New, Е.В. Синельникова, С.Л. Аврусин, В.П. Шадрин

## ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ У ДЕТЕЙ КОРЕННЫХ МАЛОЧИСЛЕННЫХ НАРОДНОСТЕЙ КРАЙНЕГО СЕВЕРА И ОБЩИЕ ПОДХОДЫ К МОДЕЛИРОВАНИЮ РАСПРОСТРАНЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ В ДЕТСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

УДК 575.17:616.453 (571.56)

В работе представлены данные пилотного проекта по изучению распространенности генетических маркеров дефицита 21-ОН в популяциях Крайнего Севера. Методом полимеразной цепной реакции обследовано 463 образца ДНК детей, проживающих в Республике Саха (Якутия) и Ямало-Ненецком автономном округе.

**Ключевые слова:** врожденная гиперплазия надпочечников, генетические маркеры, дефицит фермента 21-гидроксилазы, интрон 2, экзон 7, прогностическая модель накопления мутации.

In work data of the pilot project on studying of prevalence of deficiency 21-OH genetic markers in populations of the Far North are presented. 463 DNA samples of children living in Republic Sakha (Yakutia) and Yamal-Nenets autonomous region are surveyed by method of polymerase chain reaction.

**Keywords:** congenital adrenal hyperplasia, genetic markers, deficiency of enzyme 21-hydroxylase, intron 2, exon 7, prognostic model of a mutation accumulation.

### Введение

Врожденная гиперплазия надпочечников – группа наследуемых аутосомно-рецессивных нарушений стероидогенеза, наиболее частой причиной которых является дефицит фермента 21-гидроксилазы, обусловленный мутацией гена CYP21A2.

Частота врожденной гиперплазии надпочечников – как классической, так и неклассической ее форм – в значительной мере обусловлена этнической принадлежностью. Наибольшая распространенность этой патологии зарегистрирована в популяциях иберийцев, выходцев с Кавказа и у евреев-ашкенази [8,10]. Распространенность неклассической формы врожденной дисфункции коры надпочечников, составляющая в среднем по всей популяции 1:100, в популяции евреев-ашкенази составляет 1:27 [8,9], у испанцев – 1:40 [6], у итальянцев – 1:333 [6], у жителей Нью-Йорка – 1:100 [7,8]. Гетерозиготы по дефициту 21-гидроксилазы встречаются с частотой 1:60 в популяции не евреев-ашкенази и с

частотой до 1:3 в популяции евреев-ашкенази [6].

В то время как классическую форму патологии у гомозигот, как правило, распознают достаточно рано, у гетерозигот достаточно часто диагноз ставят позже, поскольку гормональные нарушения слабо выражены, а недифференцируемые гениталии если и встречаются, то в форме гипоспадии.

Неклассическая форма врожденной гиперплазии надпочечников в большинстве случаев в детстве остается нераспознанной. Как правило, неклассическая форма дефицита 21-гидроксилазы в период детства и в пубертатный период ошибочно идентифицируется как идиопатическое преждевременное половое созревание, кисты яичников, опухоли яичек, опухолевые образования коры надпочечников, яичниковая гиперандрогения. Достаточно характерное для детей с этим видом патологии опережение сверстников в физическом и половом развитии редко является причиной жалоб, а последующий более низкий конечный рост, обусловленный ранним эпифизарным окостенением, приходится на возраст, чаще входящий в компетенцию терапевтов, а не педиатров.

В рамках пилотного проекта изучение распространенности врожденной дисфункции коры надпочечников в детской популяции Республики Саха (Якутия) началось в 2005 г. [1]. Вместе с тем некоторые известные географические, антропологические и этногенетические предпосылки свидетельствуют, предположительно, о высокой вероятности выявления дефицита 21-гидроксилазы в популяции детей, проживающих в регионах Крайнего Севера, в частности на территории Рес-

публики Саха (Якутия). К факторам, способствующим распространению этого вида патологии, относятся в первую очередь географические условия, способствующие изоляции населения. Некоторые черты образа жизни, отмена считавшихся традиционными до 20-х гг. прошлого века ограничений на вступление в близкородственный брак способствуют широкому распространению наследственной патологии в популяции.

В Республике Саха (Якутия), по данным статистической отчетности, в настоящее время на территории 3105,6 км<sup>2</sup> проживает 949 тыс. чел. (0,31 чел. на 1 км<sup>2</sup>), 36% населения проживает в 551 поселке с численностью 200-1000 чел., расстояние между населенными пунктами составляет от 30 до 650 км. Следствием этого является высокий уровень близкородственных браков. Уровень гомолокальных браков (супруги проживали до брака в одном районе) республике составляет в среднем 50%, эндокальных (супруги проживали до брака в соседних районах) – 15%. В некоторых поселках уровень гомолокальных браков достигает до 100% [2,3]. Возможное широкое распространение этого вида патологии подтверждает высокая частота обнаружения в популяции коренных малочисленных народностей Крайнего Севера прочих – значительно менее распространенных в популяции европейцев – наследственных заболеваний, а также высокая частота низкорослости в популяции взрослых. Известно, что врожденная гиперплазия надпочечников встречается весьма часто (1:280) в популяции юпик-эскимосов [5], проживающих на Аляске, составлявшей до известных географических изменений,

**ЧАСНЫК Вячеслав Григорьевич** – д.м.н., проф., зав. кафедрой Санкт-Петербургской гос. педиатрической мед. академии; **ЯКОВЛЕВА Светлана Яновна** – зав. Консультативной поликлиникой Педиатрического центра РБ №1-НЦМ; **БУРЦЕВА Татьяна Егоровна** – к.м.н., зам. директора по науке ЯНЦ КМП СО РАМН; **NEW Maria Iandolo** – д.м.н., проф., директор клиники детской эндокринологии, руководитель стероидных программ больницы Маунт Синай, г. Нью-Йорк; **СИНЕЛЬНИКОВА Елена Владимировна** – д.м.н., доцент СПбГПМА; **АВРУСИН Сергей Львович** – к.м.н., доцент СПбГПМА; **ШАДРИН Виктор Павлович** – к.м.н., начальник информ.-аналит. отдела Якутской детской гор. больницы.

сопровождаясь возникновением Берингова пролива, единую территорию – Берингию.

### Материалы и методы

Работа выполнена на базах Санкт-Петербургской государственной педиатрической медицинской академии, Педиатрического центра РБ №1-Национального центра медицины Республики Саха (Якутия) и педиатрического отделения Mount Sinai School of Medicine (Нью-Йорк, США) в соответствии с планом исследований Якутского научного центра КМП СО РАМН в рамках НИР «Нейроиммунные и эндокринные механизмы нарушения соматического, психосоматического и репродуктивного здоровья подростков Республики Саха (Якутия)» (регистрационный номер №004).

На первом этапе в ходе экспедиционной работы оценена распространенность в детской популяции фенотипических признаков, характерных для врожденной гиперплазии надпочечников, и получен материал для генетических исследований.

На втором этапе проведены генетические исследования, анализ полученных результатов, сформулированы выводы и практические рекомендации. Генетические исследования проведены у 315 детей, проживающих в населенных пунктах Республики Саха (Якутия), и у 176 детей, проживающих в населенных пунктах Ямало-Ненецкого автономного округа (ЯНАО).

В соответствии с существующей практикой этническую принадлежность определяли самоидентификацией с учетом фенотипа ребенка и семейного анамнеза. Для детей с выявленными мутациями составляли семейные деревья до 3-го уровня родства с включением данных об этнической принадлежности, степени родства, конечном роде, половом развитии, наличии гирсутизма, угревой сыпи.

Детей включали в исследование случайным образом во время профилактических осмотров по удовлетворению критериев включения. Для проведения исследования было получено одобрение этического комитета.

Критериями включения в исследование служили: пол мужской или женский, возраст 3-17 лет на момент включения, подтвержденный факт рождения и проживания в одном поселке (районе), подтвержденный факт проживания родителей ребенка в том же поселке, желание родителей и детей старше 5 лет принимать участие в исследовании, достоверное подтверждение информированного согласия.

Критериями исключения были любые известные или предполагаемые противопоказания к забору крови из вены.

Для проведения генетического анализа с целью выявления наличия мутаций в гене CYP 21 рутинным способом выделяли ДНК из лейкоцитов периферической крови. Для выявления мутаций nt 656g («intron 2g») и V281L («exon 7») использовали аллель-специфические ПЦР. Для определения мутации в интроне 2 (656) A/C → G использовали праймеры: In2ns, In2ms, In2cs. Для определения мутации в экзоне 7 (V281L) использовали праймер Ex7ma. Во всех случаях использовали положительную контрольную ДНК. В случае положительной реакции процедуру повторяли и, в случае повторного положительного результата, для подтверждения выявления мутации использовали процедуру секвенирования.

Для оценки наличия ассоциированных генетически обусловленных заболеваний в 2 случаях проводили определение панели мутаций, характерных для: синдрома Bloom, болезни Canavan, болезни Gaucher, болезни Niemann Pick, болезни Tay Sachs, семейной дизавтономии, муколипидоза, анемии Фанкони (все исследования проведены в Jewish Genetic Disease Center (директор - Dr. Robert Desnick).

Базы данных вели с использованием программных средств пакетов STATISTICA (версия 6).

### Результаты и обсуждение

Распределение числа выявленных мутаций по этническим группам представлено в таблице. Всего было выявлено 12 гетерозигот с мутациями в гене CYP21. Ни одной гомозиготы выявлено не было. Из них сплайсинг-мутация по 659AC→G была найдена в 1 хромосоме, мутация по V281L — в 11 хромосомах. Распространенность мутации 659AC→G (Intron 2g) у эвенов составила 1:41 (или 2,4:100). В прочих этнических группах эта мутация выявлена не была. Таким образом, в сред-

нем в исследованной нами популяции данная мутация определяется с частотой 0,4:100.

Распространенность мутации V281L была наибольшей у чукчей (5,1:100) и юкагиров (5:100) при средней распространенности в исследованной популяции 2,4:100.

Связи количества мутаций, этнической группы и ее численности на исследованной территории оценивали определением корреляции Spearman. Полученные результаты подтвердили на уровне тенденции существования бытового понятия «национальный поселок» ( $r=0,51$ ,  $p<0,09$ ), тем самым количественно описав степень преобладания какой-то одной этнической группы в «национальном поселке». Была выявлена средней силы связь распространенности мутации с численностью этнической группы, проживающей на исследованной территории ( $r=-0,69$ ,  $p<0,05$ ), что подтверждает некоторую склонность при выборе супруга выбирать представителя своей этнической группы.

Сравнение данных, представленных в таблице, со средней частотой встречаемости гетерозигот по мутации, ассоциированной с неклассической формой патологии (1:60 для неевреев-ашкенази), позволяет сделать вывод о том, что для всех исследованных коренных этнических групп, проживающих в Республике Саха (Якутия), распространенность мутаций по меньшей мере в 2 раза больше, чем у проживающих в Ямало-Ненецком округе селькупов и в среднем в популяции.

Очевидно, что существующие тенденции крайне негативны. При их сохранении можно ожидать ухудшения качества популяции из-за увеличения числа манифестных – часто весьма тяжелых – форм патологии. С точки зрения планирования качества популяции и развития медицинского обеспечения, целесообразно формирование математических моделей с целью прогнозирования численности больных наследственными заболеваниями. Вы-

### Распространенность исследованных мутаций в различных этнических группах

Этнические группы	Общая численность на территории	Intron 2 g		V281L	
		на количество обследованных	на 100	на количество обследованных	на 100
Чукчи	428	0:29	0:100	2:39	5,1:100
Эвены	1793	1:41	2,4:100	1:48	2,1:100
Юкагиры	476	0:20	0:100	2:40	5,0:100
Эвенки	1285	0:48	0:100	2:106	1,9:100
Долганы	1272	-	-	0:2	0:100
Саха	432290	0:25	0:100	1:49	2,0:100
Ненцы	20917	0:40	0:100	0:41	0:100
Селькупы	1530	0:58	0:100	3:137	2,2:100
Другие	-	-	-	0:2	0:100
Всего	459991	1:261	0,4:100	11:464	2,4:100



Динамика процессов изменения численности популяции, снижения уровня ее здоровья и увеличения количества гомозигот в популяции для неклассической формы врожденной гиперплазии надпочечников

бор управляемых переменных (например, изменение уровня гомолокальных браков вследствие проведения кампании популяризации межлулусных молодежных фестивалей или улучшения транспортной инфраструктуры и пр.) в качестве параметров модели позволит достаточно эффективно управлять численностью носителей мутаций в популяции.

В ходе разработки подходов к построению прогностической модели накопления мутации в популяции была предложена аналитическая модель уменьшения численности популяции, предполагающая 3 фазы:

1) короткая фаза появления мутации в популяции (привнос извне, мутагенез),

2) длинная фаза распространения мутации в популяции и ее фиксация (передача потомкам, появление гомозигот),

3) фаза уменьшения численности популяции (накопленное количество мутаций так велико, что популяция не может восстановиться; в этом случае уменьшение численности наступает в течение нескольких поколений).

Рисунок представляет возможный ход кривых динамики численности

популяции, ее качества и количества гомозигот в популяции, соответствующих этой модели, сформированной с учетом дилеммы Haldane для случая неклассической формы врожденной гиперплазии надпочечников и популяции большой численности.

Данный подход позволяет рассчитать количество поколений до «угасания» популяции как функцию исходной численности популяции, скорости распространения мутации и коэффициента селекции. В случае популяций малой численности такой подход требует учета большого

количества параметров. Выбранные в ходе работы управляющие параметры не входят в настоящее время в список характеристик государственной статистической отчетности. Легализация регистрации этих характеристик позволит описать очевидно ускоренное ухудшение уровня здоровья популяции, скорость образования гомозигот и, в конечном счете, определить более раннее наступление момента «угасания» популяции.

#### Выводы:

1. Мутация V281L, обуславливающая возникновение неклассической формы врожденной гиперплазии надпочечников, достаточно широко распространена в детской популяции коренных малочисленных народностей Крайнего Севера; наиболее часто она встречается в популяции чукчей, юкагиров и селькупов.

2. Мутация в интроне 2, обуславливающая классическую форму врожденной гиперплазии надпочечников, распространена значительно чаще, чем выявляется при неонатальном скрининге.

3. Выявленные мутации являются семейными, они ассоциированы с

местом проживания, что подтверждает факт наличия гомолокальных браков, и коррелируют с численностью этнической группы.

4. Моделирование распространенности наследственной патологии в детской популяции с малой численностью населения возможно при учете значительно большего количества параметров для описания очевидно ускоренного ухудшения уровня здоровья популяции, образования гомозигот и, в конечном счете, более раннего наступления момента «угасания» популяции. Общепринятые модели расчета распространения мутаций неприменимы для популяций малой численности.

#### Литература

1. Врожденная дисфункция коры надпочечников у детей Якутии / С.Я. Яковлева [и др.] // Якутский медицинский журнал. -2008. - №2. - С. 4-6.
2. Максимова Н.Р. Этноспецифические наследственные болезни у якутов / Н.Р. Максимова, В.П. Пузырев // Там же. -С.91-94.
3. Некоторые параметры генетико-демографической характеристики коренных популяций Якутии / А.Л. Данилова [и др.] // Здоровье детей Севера: сб. науч. трудов межрегион. науч.-практ. конф. Якутск, -2008. -С.70-72
4. Сухомясова А.Л. О состоянии и перспективах развития медико-генетической службы / А.Л. Сухомясова, А.Н. Ноговицына, Н.Р. Максимова// Тезисы в сб. научных трудов межрегиональной научно-практ. конф. -Якутск, 2007. -С. 222-223.
5. Genotype of Yupik Eskimos with congenital adrenal hyperplasia due to 21- hydroxylase deficiency / P.W. Speiser [et al.] // J. Hum. Genet. - 1992. - N 88. - P. 647-648.
6. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency / P.W. Speiser [et al.] // Am. J. Hum Genet. -1985. - N 37. - P. 650-667.
7. Late-onset adrenal steroid 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. I. A cause of hirsutism in pubertal and postpubertal women /S.Y. Pang [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. -1985. - N 60. - P. 428-439.
8. New M.I. Extensive clinical experience. Nonclassical 21-hydroxylase deficiency / M.I. New// J. Clin. Endocrinol. Metab. -2006. - P. 1645.
9. Prevalence of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency based on a morning salivary 17-hydroxyprogesterone screening test: a small sample study / M. Zerah [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. - 1990. - N 70. - P. 1662-1667.
10. Speiser P. Congenital Adrenal Hyperplasia / P. Speiser, P. White// N. Engl. J. Med. - 2003. - N 88. - P. 349 - 776.

Р.Н. Мустафин, М.А. Бермишева, Э.К. Хуснутдинова  
**КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
НЕЙРОФИБРОМАТОЗА 1 ТИПА В РЕСПУБЛИКЕ  
БАШКОРТОСТАН**

УДК 616-036.22; 616/618; 61:575

Изучена распространенность нейрофиброматоза 1 типа на территории Республики Башкортостан (РБ), в среднем составляющая 4,7 на 100 тыс. чел. Заболевание встречается во всех этнических группах с неравномерным распределением в различных районах РБ, значительно преобладает среди женщин в соотношении 1,2:1. Отмечается значительная клиническая вариабельность. В 55,0% заболевание представлено единственным случаем в семье.

**Ключевые слова:** НФ1 – нейрофиброматоз 1 типа, ген NF1, нейрофибромин, распространенность.

The aim of the present investigation is to study Neurofibromatosis type 1 prevalence in Republic of Bashkortostan. The disease is distributed irregularly through various districts of the Republic, on average, NF1 occurrence in Bashkortostan is 4,7 cases per 100 000 inhabitants. The disease was revealed in all ethnic groups of the studied population. In women the disease was slightly more frequent than in men (1,2:1). This study shows the variability of the NF1 phenotype. In 55,0% of NF1 cases only one person in the family tends to suffer from the disease.

**Keywords:** NF1 – Neurofibromatosis type 1, NF1 gene, neurofibromin, prevalence.

### Введение

Нейрофиброматоз 1 типа или болезнь Реклинггаузена – аутосомно-доминантное заболевание с прогрессирующим течением, характеризующееся развитием доброкачественных новообразований из тканей нейроэктодермального происхождения. Основной чертой заболевания является рост множественных опухолей оболочек нервов, называемых нейрофибромами. Другие проявления включают пигментные изменения на коже, скелетные аномалии и трудности в обучении [4].

Доброкачественные опухоли вызывают у больного психологический дистресс; у 15% больных появляются плексиформные нейрофибромы, спаивающиеся с окружающими тканями, вызывая серьезные функциональные повреждения и даже смерть [7]. Больные НФ1 имеют также повышенный риск развития серьезных осложнений, таких как злокачественные опухоли оболочек периферических нервов (MPNSTs) (1 – 2% больных) [7], опухоли центральной нервной системы (исключая глиомы зрительных нервов) (2%), глиомы центральной нервной системы (до 15%) [4] и миелоидной лейкемии [11]. Озлокачествление – наиболее распространенная причина смерти при НФ1 [7].

Распространенность НФ1, согласно большинству популяционных исследований, варьирует от 1/2000 до 1/5000 населения, что соответствует распространенности от 20 до 50 на 100 тыс.

**МУСТАФИН Рустам Наилевич** – аспирант Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, e-mail: ruj79@mail.ru); **БЕРМИШЕВА Марина Алексеевна** – к.б.н., с.н.с. Института биохимии и генетики УНЦ РАН, e-mail: Marina\_berm@mail.ru; **ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна** – д.б.н., проф., зав. отделом геномики Института биохимии и генетики УНЦ РАН, e-mail: ekkh@anrb.ru.

чел. Заболевание встречается во всех расах и этнических группах и равномерно поражает оба пола [2,7].

Тип наследования НФ1 – аутосомно-доминантный со 100% пенетрантностью у взрослых. Ген NF1 картирован на хромосоме 17q11.2 [2], имеет размер около 280 kb, состоит из 60 экзонов [7]. В базе данных Консорциума Генетического Анализа НФ1 в настоящее время зафиксировано более 240 мутаций NF1 [3] (<http://www.nf.org/nf1gene/>).

Продукт гена NF1 – белок нейрофибромин является негативным регулятором p21(Ras)-опосредованной сигнальной трансдукции и клеточной трансформации [8]. При повреждении гена на одной из хромосом 50% синтезируемого нейрофибромина становится дефектным и наблюдается смещение равновесия роста клеток в сторону пролиферации [1].

### Материалы и методы

В работе использованы данные о больных с установленным диагнозом НФ1, состоящих на диспансерном учете в Медико-генетической консультации Республиканского Перинатального Центра Республики Башкортостан (РБ).

Для оптимизации алгоритма обследования пациентов с НФ1 нами была разработана формализованная карта на основании диагностических критериев, принятых в нашей стране и за рубежом [6, 9].

Карта территориальной распространенности НФ1 в РБ построена с использованием пакета программ ArcView GIS v. 3.0 (<http://www.esri.com>) (рисунок).

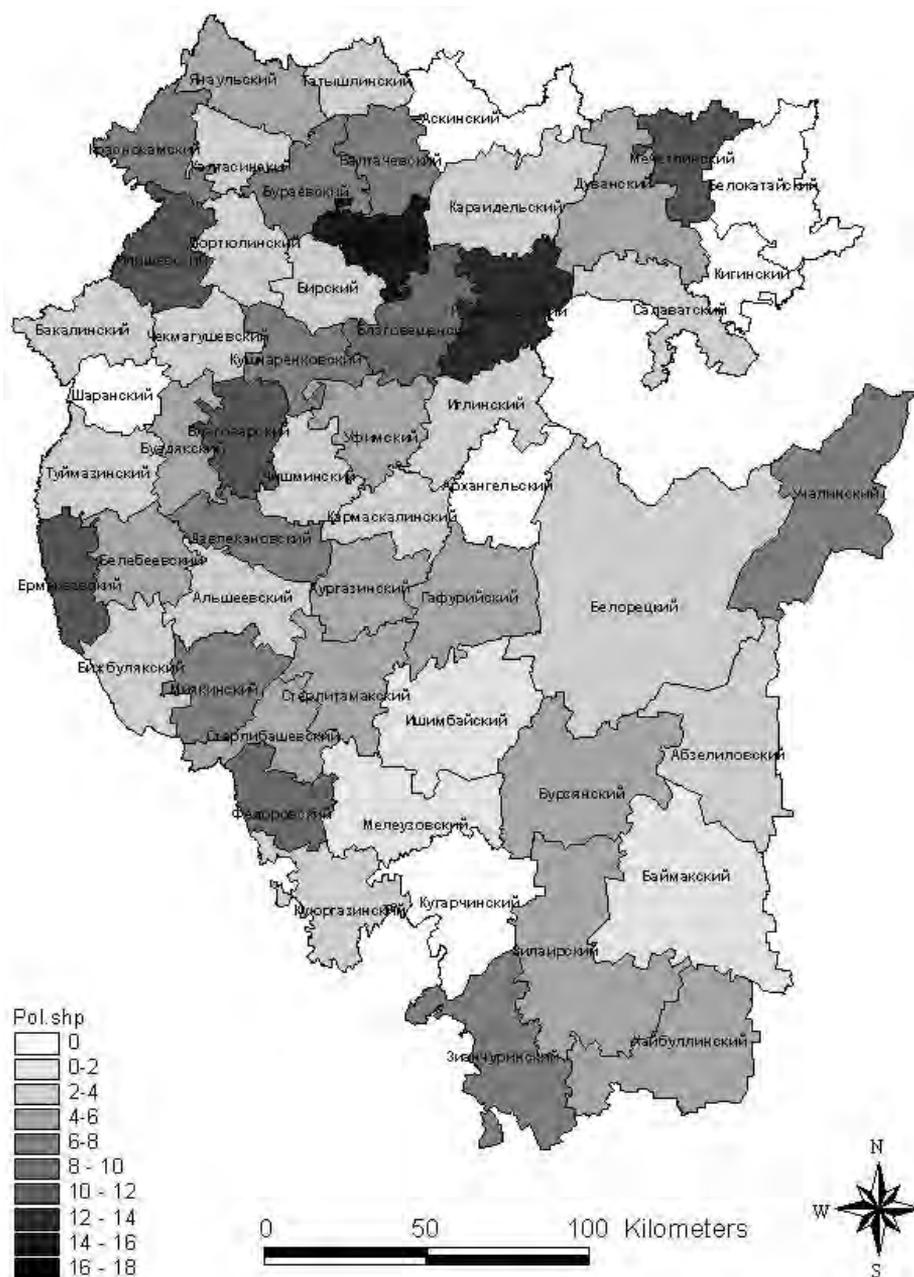
Математическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ Quantitative Skills (office@quantitativeskills.com) с использованием критерия  $\chi^2$ .

### Результаты и обсуждение

В Республике Башкортостан с населением 4050989 чел. (<http://www.bashinfo.ru>) в МГК Республиканского Перинатального Центра, по данным на февраль 2009 г., состоят на учете 238 больных с НФ1 из 192 семей.

Распространенность заболевания в РБ составила в среднем 4,7 на 100 тыс. чел. Полученные цифры ниже данных мировой статистики, согласно которым распространенность НФ1 составляет от 20 до 50 на 100 тыс. чел. [7]. Данный факт можно объяснить тем, что не все больные с НФ1 попадают на прием в Медико-генетическую консультацию РБ, особенно если заболевание протекает в стертой и легкой форме, то есть ограничивается только пигментными пятнами или пигментными пятнами с единичными нейрофибромами. Высокий процент выявления возможен при обследовании мужчин призывного возраста. Например, при обследовании 374440 чел. мужского пола в возрасте 17 лет в Израиле как части оценки к военной годности, распространенность НФ1 составила 1/960 (104 на 100000 населения) [7].

Отмечается неравномерное распределение НФ1 на территории РБ (рисунок). Заболевание зарегистрировано в 38 административных районах из 54 и в 18 городах из 21. Анализ данных свидетельствует о широком разбросе значения распространенности НФ1 – от 2,3 до 14,8 на 100 тыс. чел. Минимальные показатели распространенности – менее 3 на 100 тыс. чел. выявлены в г. Ишимбай, Абзелиловском и Баймакском районах. Наивысшие показатели – более 13 на 100 тыс. чел. – зарегистрированы в Мишкинском и Нуримановском районах – что ближе к данным о распространенности НФ1 в большинстве исследований популяций, хотя и значительно ниже (от 20 до 50 на 100 тыс. чел. [7]).



Распространенность НФ1 на территории Республики Башкортостан

В целом, 117 семей (61%) из РБ являются жителями городов и 75 (39%) – сельскими жителями. При численности городского населения в РБ 2626,3 тыс. чел. (64,2%) и сельского соответственно 1446 тыс. чел. (35,8%) доля больных среди жителей городов Республики по отношению к доле больных среди сельских жителей не достигает статистически значимой разницы ( $\chi^2=0,9$ ;  $df=1$ ;  $p=0,34$ ).

Распределение больных по полу выглядит следующим образом: 107 мужчин (45%) и 131 женщина (55%); соотношение составляет 1:1,2. При численности мужского и женского населения 1915,4 тыс. чел. (46,8%) и 2176,9 тыс. чел. (53,2%) соответственно в РБ

различие в распределении заболевания по полу не достигает статистически значимой разницы ( $\chi^2=0,26$ ;  $df=1$ ;  $p=0,6$ ).

По этническому составу больные с нейрофиброматозом 1 типа распределяются следующим образом: татары – 31,9%, русские – 20,7, башкиры – 14,8, марийцы – 6, чувашы – 3, немцы – 1,5, мордва – 1,5, белорусы – 0,7, украинцы – 0,7%. 19% больных нейрофиброматозом 1 типа составили метисы от межнациональных браков.

Выяснение семейного анамнеза с последующим уточнением клинических признаков и составлением родословных проводилось во всех 192 семьях. На основании этих данных для 45%

семей определена наследственная форма заболевания, в 55% случаях диагноз установлен только у одного члена семьи.

При анализе клинических особенностей больных с НФ1 оценивались возраст пациентов при манифестации заболевания, первые его симптомы, характеристика клинической картины по основным и дополнительным признакам.

Первыми симптомами заболевания у всех больных являлись пигментные нарушения на коже в виде множественных, разбросанных по всему телу пятен различного диаметра и формы цвета кофе с молоком – 97,3% больных (231 чел.), и в виде единичных крупных пятен – 2,7% больных (7 чел.). Пигментные пятна на коже у 65,6% больных выявлены уже при рождении, у 9,4% – от 1 месяца до 1 года; у 17% – в возрасте от 1 года до 10 лет; у 4,7% – от 10 до 20 лет; у 3,3% – после 20 лет. Пигментные пятна как единственный признак болезни за время наблюдения (в сочетании с семейным анамнезом) наблюдался у 28 (11,8%) больных. Для всех пациентов характерно увеличение размера и количества пигментных пятен с возрастом.

Нейрофибромы выявлены у 138 пациентов (58%). У большинства больных (236 чел.) первые нейрофибромы обнаруживались позже пигментных пятен. У 48 (34,7%) больных с нейрофибромами первые опухоли появились в первом десятилетии жизни; у 60 (43,5%) – на втором; у 15 (10,9%) – на третьем; у 15 (10,9%) – в возрасте 30 лет и старше. Диффузно распределенные нейрофибромы определены у 79 пациентов (57,2%); из них как подкожные, так и кожные опухоли выявлены у 33 чел. (23,9%); только подкожные – у 41 чел. (29,7%); только кожные формы – у 5 чел. (3,6%). Очаговое расположение нейрофибром наблюдалось у 59 пациентов (42,8%); из них как кожное, так и подкожное расположение узлов определено у 2 чел. (1,5%); только подкожные формы – у 48 (34,8%); только кожные – у 9 (6,5%).

Отмечены определенные особенности развития осложнений НФ1 в РБ (таблица).

Задержка физического развития и низкий рост отмечены у 27 чел. (11,3%). Задержка психо-речевого и умственного развития отмечена у 30 больных (12,6%). Аномалии развития черепа выявлены у 55 обследованных (23,1%): наиболее часто встречающейся патологией явилась деформация

### Типы и частота встречаемости осложнений НФ1 у больных в РБ

Осложнения	Кол-во больных, %
Умственная недостаточность	30 (12,6)
Задержка роста	27 (11,3)
Скелетные и другие аномалии развития тела	78 (32,8)
Аномалии развития черепа	55 (23,1)
Эпилепсия	10 (4,2)
Опухоли ЦНС	10 (4,2)
Глиомы зрительных нервов	7 (2,9)
Гидроцефалия	7 (2,9)
Плексиформные нейрофибромы	4 (1,7)
Кисты головного мозга	3 (1,3)
Выраженная задержка полового развития	2 (0,8)

ушных раковин – 21 чел. (8,8%), далее, по частоте встречаемости – широкая деформированная (запавшая) переносица – 19 (8%), глазной гипертелоризм – 18 чел. (7,6%), голубые склеры – 18 (7,6%); гидроцефалическая форма черепа – 16 (6,7%), антимонголоидный разрез глаз – 11 (4,6%), эпикант – 11 (4,6%), неправильный рост зубов – 9 (3,8%), полуптоз – 7 (2,9%), высокое узкое небо – 6 (2,5%), расходящийся/сходящийся стробизм – 4 (1,7%), гипоплазия зубной эмали и буфтальм – 3 чел. (1,3%). Выраженная задержка полового развития отмечена у 2 больных мужского пола (0,8%).

Скелетные и другие аномалии развития тела выявлены у 78 чел. (32,8%). Из них наиболее распространенным осложнением является сколиоз – 54 (22,7%). Деформация грудной клетки – 22. (9,2%), усиление грудного кифоза – 16 (6,7%), деформация голеней – 9 (3,8%), синдактилия – 6 (2,5%), короткая шея – 5. (2,1%), клинодактилия – 3 (1,3%), ложный сустав костей голеней – 3 (1,3%), экскавация стоп – 3 (1,3%), симметричное укорочение конечностей – 2 (0,8%), другие (вальгусная деформация локтевых суставов, дисплазия бедра, поперечная ладонная складка)

– по 1 чел. (0,4%).

Кроме нейрофибром у 1 больного (0,4%) отмечены множественные гемангиомы, диффузно расположенные по всему телу; у 1 чел. (0,4%) – очаговые мезенхимомы.

Эпилепсия развилась у 10 больных (4,2%). Выраженная мышечная гипотония выявлена у 7 больных (2,9%). Гидроцефалия развилась у 7 чел. (2,9%). У 2 больных (0,8%) диагностирована атрофия зрительного нерва.

Опухоли головного мозга выявлены у 9 больных (3,8%); из них у 4 – глиомы мозжечка, у 4 – супраселлярная краниофарингеома, у 1 – опухоль основания черепа. У одного больного НФ1 с супраселлярной краниофарингеомой выявлена также опухоль гипофиза. Опухоль спинного мозга (глиома) выявлена у 1 больного (0,4%). Кисты головного мозга определены у 3 чел. (1,3%). Глиомы зрительных нервов обнаружены у 7 (2,9%), плексиформные нейрофибромы – у 4 больных (1,7%).

Данная работа направлена на дальнейшее молекулярно-генетическое исследование НФ1, которое в Республике Башкортостан не проводилось.

### Выводы

1. Появление нейрофибром к 20 годам у 78,2% исследованных больных говорит о ранней манифестации заболевания в Республике Башкортостан.

2. Высокий процент больных со скелетными аномалиями – 32,8% и аномалиями черепа – 23,1% говорит о сложном патогенезе заболевания с вовлечением большинства систем и тканей организма.

3. Высокий процент пациентов с опухолями центральной нервной системы – 4,2% и отсутствие данных о злокачественных новообразованиях периферической нервной системы говорят о необходимости тщательного обследования всех больных НФ1 с использованием современных методов исследования, таких как магнитно-ре-

зонансная томография.

4. Учитывая зафиксированную более низкую распространенность нейрофиброматоза 1 типа в отношении ожидаемой (по данным мировой статистики) в РБ необходимо обратить внимание врачей на актуальность проблемы и необходимость своевременного диагностирования симптомов у больных с направлением их в Медико-генетическую консультацию. В связи с отсутствием радикальных методов лечения НФ1, сложностью и долговременностью молекулярной диагностики заболевания имеет смысл разработка более простых и быстрых методов диагностики для ранней пренатальной

### Литература

профилактики.

1. A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein //EMBO reports. – 2006 – V. 7. № 2. – P.174-179.
2. An epidemiological, clinical and genetic survey of Neurofibromatosis type 1 in children under sixteen years of age //Ulster Med. J. – 2008 – V.77 (3). – P.160-163.
3. Functional analysis of splicing mutations in exon 7 of NF1 gene. //BMC Medical Genetics. – 2007 – 8:4.
4. Korf B.R. Malignancy in Neurofibromatosis Type 1//Oncologist. – 2000 – 5 – P.477-485.
5. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1 //J. Med. Genet. - 2002 – V.39 – P.311-314.
6. National Institutes of Health Consensus Development Conference. Neurofibromatosis: conference STATEment //Arch. Neurol. – 1988 – V.45 – P.575-578.
7. Rasmussen S.A., Friedman J.M.. NF1 Gene and Neurofibromatosis 1 //American Journal of Epidemiology. – 2000 - V.151. №1. – P.33-40.
8. Seizinger B.R. NF1: a prevalent cause of tumorigenesis in human cancers? //Nature Genet. 1993 - V.3 - P.97-99.
9. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2 //JAMA. - 1997 – V.278 – P.51-57.
10. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP// Cell. - 1990. V.62 - P.599-608.
11. The neurofibromin GAP-related domain rescues endothelial but not neural crest development in NF1-/- mice //The Journal of Clinical Investigation. – 2006 - V.116. №9 – P.2378-2384.

Е.Н. Сивцева, К.З. Борисова

## ЭТНОТЕРРИТОРИАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВРОЖДЕННОЙ УШНОЙ АТРЕЗИИ У ДЕТЕЙ ЯКУТИИ

УДК 616.28-007.271-053.2(571.56)

Впервые в детской популяции Республики Саха (Якутия) на основании клинико-эпидемиологического исследования изучены заболеваемость и распространенность врожденной ушной атрезии (ВУА). Доказано влияние этнической принадлежности на заболеваемость ВУА у детей Якутии.

**Ключевые слова:** врожденная ушная атрезия, микроотия, врожденный порок развития, эпидемиология, распространенность, заболеваемость, дети.

For the first time in children's population of Republic Sakha (Yakutia) on the basis of clinical and epidemiological research morbidity and prevalence of congenital aural atresia (CAA) are studied. Influence of an ethnic belonging on CAA morbidity in children of Yakutia is proved.

**Keywords:** congenital aural atresia, microtia, congenital malformation, epidemiology, prevalence, morbidity, children.

### Введение

Термин «врожденная ушная атрезия» (ВУА) обычно используют для описания сочетанных мальформаций наружного и среднего уха. Клинические проявления ВУА разнообразны, от легкой аномалии в виде сужения до полного отсутствия наружного слухового прохода. Аномалии наружного слухового прохода часто сочетаются с деформацией или отсутствием ушной раковины, в таких случаях они известны как «синдром микроотии/атрезии». Тяжесть патологии обусловлена косметическим дефектом и снижением слуха, а при двустороннем процессе – потерей слуховой и речевой функции.

Микроотия с атрезией среди европеоидов встречается от 0,3 до 1,3 случаев на 10 000 новорожденных [6, 14, 16], в странах Азии несколько больше – 2,0-3,0 [5, 18]. Значительно чаще – 4,8-7,6 на 10 тыс. родившихся – эта патология отмечена в странах Латинской Америки [9, 11]. Медико-демографические показатели врожденной ушной атрезии в Российской Федерации освещены единичными сообщениями [4].

Проблема ВУА достаточно разработана с позиций хирургических методов реабилитации больных [1-3, 10, 17]. Новые технологии исследования уха и слуха, новые методы хирургического лечения и аппаратного слухопротезирования открыли перспективные возможности реабилитации пациентов с врожденными пороками наружного и среднего уха.

### Материалы и методы

Проведены клинико-эпидемиологическое исследование, включающее

про- и ретроспективный анализ медицинской документации Республиканского сурдологопедического центра РБ№1-НЦМ с 1994-2007 гг., выездной осмотр детского населения на территории 16 районов и обобщение данных медицинского обследования бригадных экспедиций с личным участием автора в период 1997-2007 гг., изучение материалов Комитета государственной статистики Республики Саха (Якутия).

По климато-географическим и социально-экономическим критериям 35 административно-территориальных районов Якутии объединены в 5 групп: арктическую, вилуйскую, центральную, юго-западную и г. Якутск.

Для расчета показателей заболеваемости ВУА ежегодное число выявленных случаев рождения больных детей относили к количеству всех живых новорожденных по Якутии за год и выражали в пересчете на 10 тыс. родившихся. Заболеваемость изучена в течение 21 года – с 1984 по 2004.

Объектом клинического исследования явились выявленные в детской популяции Якутии 118 больных с врожденной ушной атрезией. Критерии включения в исследование: наличие у ребенка врожденной ушной атрезии, рождение и проживание в Республике Саха (Якутия). Для сравнительного анализа заболеваемости, клинических проявлений ВУА выделены 2 группы по национальному (этническому) признаку – якуты (93) и русские (25). При этом 8 метисов с ВУА: дети от смешанных браков 5 матерей-якуток, 3 матерей-русских – отнесены по национальности матери.

Программа обследования пациентов с ВУА включала следующие разделы: анамнестические данные с заполнением разработанной нами карты-анкеты, общеклиническое обследование, осмотр ЛОР-органов, аудиологическое обследование, консультации

сурдопедагога, логопеда, психоневролога.

Статистическую обработку данных проводили с применением пакета прикладных программ SPSS (версия 13.0).

### Результаты и обсуждение

За 21 год наблюдения (1984-2004 гг.) средняя заболеваемость ВУА в Якутии составила 3,17 (2,64-3,70 95%ДИ) случаев на 10 тыс. родившихся, с пределами от 1,5 до 6,2 случаев в отдельные годы (табл. 1).

При изучении динамики показателей заболеваемости ВУА выявлены два периода увеличения рождения больных детей, «всплески»: первый – 1986-1991 гг. (3,8-3,0 случаев), второй – 1995-1999 гг. (5,1-3,9 случаев на 10 тыс. родившихся). Усредненный по-

Таблица 1

Заболеваемость врожденной ушной атрезии в Республике Саха (Якутия) за 1984-2004 гг.

Год	Кол-во новых случаев	Число родившихся (по данным Госкомстата РС(Я))	на 10000 родившихся
1984	6	23175	2,6
1985	5	22823	2,2
1986	9	23775	3,8
1987	9	25372	3,5
1988	8	25451	3,1
1989	7	23034	3,0
1990	7	21662	3,2
1991	6	19805	3,0
1992	3	17796	1,7
1993	3	16771	1,8
1994	4	16434	2,4
1995	8	15731	5,1
1996	9	14584	6,2
1997	6	13909	4,3
1998	6	13640	4,4
1999	5	12724	3,9
2000	2	13147	1,5
2001	4	13262	3,0
2002	4	13887	2,9
2003	3	14224	2,1
2004	4	14716	2,7
Всего	118	375922	3,1
Средний показатель заболеваемости – 3,17 95%ДИ 2,64-3,70			

**СИВЦЕВА Елена Николаевна** – к.м.н., врач сурдолог-оториноларинголог ГУ РБ№1-НЦМ, sivelya@mail.ru; **БОРИСОВА Клавдия Зотовна** – д.м.н., проф., зав. кафедрой детской оториноларингологии Новокузнецкого ГИУВ.

казатель второго «всплеска» -  $4,8 \pm 0,89$  статистически значимо выше общего среднего значения ( $p < 0,01$ ). Этот «всплеск» можно объяснить снижением рождаемости в 2 раза при неснижающемся количестве новых случаев ВУА, отчего выросли относительные показатели.

Наши показатели (3,17 на 10 тыс.) в 3 раза превышают сводные данные европейского регистра 20 стран EUROCAT за 1996-2001 гг. – 0,77 (микротия) + 0,08 (Тричера-Коллинза) + 0,24 (Гольденхара) на 10 тыс. родов. По данным ICBDMs среди 14 стран Европы наибольший показатель аномалии/микротии зарегистрирован в Испании ЕСЕМС – 2,51 за 20 лет (1984-2003 гг.), на Украине – 2,18 за 5 лет (1999-2003 гг.).

Близкая к нашим результатам заболеваемость ВУА за 10 лет отмечена в Китае, в популяциях отдельных групп провинций она составила 2,68 и 3,00 случаев на 10 тыс. родившихся [16], в Европе – 2,7 [5].

По отчетам ECLAMC за 20 лет в 12 странах Латинской Америки заболеваемость микротии составила 4,2 на 10 тыс. родившихся, что превышает показатели по Якутии. Более высокая заболеваемость, чем в нашем исследовании, зарегистрирована в Венесуэле (3,8) и Бразилии (3,9).

При распределении случаев ВУА по этническому признаку якуты составили преобладающее большинство – 93 чел. (78,8%), русские – 25 (21,2%).

Средний показатель заболеваемости ВУА за 1984-2004 гг. составил у якутов – 5,06 (3,77-6,34 95%ДИ) на 10 тыс., с колебаниями от отсутствия рождения ребенка с пороком уха в 2000 г. до 11,4 случаев в 1996 г. Отмечается увеличение количества рождения якутов с ВУА в обозначенные годы «всплесков». Единственный год (2000 г.) отсутствия рождения детей якутов с ВУА отличался наименьшей заболеваемостью за 21 год наблюдения по Якутии – 1,5 на 10 тыс.

Средний показатель заболеваемости ВУА у русских составил 1,80 (1,02-2,57 95%ДИ) на 10 тыс. родившихся, при этом в отдельные 8 лет (1989, 1990, 1995-1998, 2001, 2004 гг.) не было зарегистрировано рождения детей с ВУА. Заболеваемость ВУА у якутов достоверно выше в 2,8 раза, чем у русских.

Заболеваемость ВУА выше, чем у якутского этноса (5,06), была зарегистрирована в Чили (5,2), Мексике (6,6), Колумбии (7,60) и Боливии (14,1) [11].

В литературе приведены данные о

высокой заболеваемости ВУА среди населения испанского происхождения, проживающего на разных континентах. Так, у новорожденных испанского происхождения в США показатели заболеваемости аномалии/микротии колеблются очень широко – от 3,37 в Аризоне до 12,71 в Кентукки, что значительно превышает рождаемость с ВУА среди других европеоидов, проживающих на этих территориях [9,12] и созвучно с наибольшей заболеваемостью ВУА в Испании (2,51) по данным европейского регистра [14].

При анализе распространенности ВУА по группам районов Якутии выявлены значительные различия в частоте рождаемости детей с микротией/атрезией на территориях, заселенных коренными якутами и пришлым русским населением. Показатели распространенности ВУА оказались выше в районах, заселенных якутами (табл. 2).

В среднем за 7 лет (1998-2004 гг.) распространенность ВУА по Якутии у детского населения составила 3,6 на 10 тыс. Наибольшая распространенность ВУА выявлена в арктической группе – 6,9 случаев, пределы от 3 (в Оймяконском районе) до 19,5 (в Эвено-Бытантайском) на 10 тыс. населения. Из 15 районов данного региона в 2 (Булунский, Нижнеколымский) не отмечены случаи рождения детей с пороком уха. В вилюйской группе распространенность ВУА составила 5,5 (от 1,8 случая в Сунтарском до 10,4 случаев в Верхневиллюйском) на 10 тыс. детского населения. Далее по убывающей отмечена центральная группа – 4,3 случая (пределы от 1,6 до 6,7) и г. Якутск – 3,7 на 10 тыс. детского населения. Наименьшая распространенность ВУА отмечается в юго-западной группе – 0,24 случая на 10 тыс. населения, где родилось по 1 ребенку в Мирнинском и Нерюнгринском районах.

Распространенность ВУА в детских популяциях арктической (6,9), вилюйской (5,5), центральной (4,3) группах районов превышала показатели стран Европы [14, 16], Азии [16,18], Северной Америки [6] и приближалась к показателям стран Латинской Америки [8, 9, 11, 13, 15]. Распространенность микротии в юго-западной группе, заселенной преимущественно пришлым русским населением, была наименьшей по Якутии (0,24 на 10 тыс.) и соответствовала показателям популяций большинства стран Западной Европы [14, 16].

При распределении 118 пациентов по полу выявлено незначительное преобладание мальчиков – 64 к 54. При

Таблица 2

Распределение случаев ВУА по национальности в группах районов Якутии на 01.01.2005 г.

Группа районов	Число случаев (абс.)		Состав населения (% перепись 2002)	
	якуты	рус.	якуты	рус.
Арктическая 15 районов	20	7	44	33
Виллюйская 5 районов	27	-	89	7
Центральная 9 районов	35	-	81	14
Юго-Западная 5 районов	-	2	5	74
г. Якутск	11	16	42	46
Всего по РС (Я)	93	25	45	41

этом у якутов с ВУА выявлено одинаковое количество мальчиков и девочек (47 к 46), как и в популяционных работах по странам Латинской Америки [8, 9, 19], где зарегистрирована высокая заболеваемость аномалии/микротии. У русских с ВУА мальчиков было в два раза больше, чем девочек (17 к 8,  $p < 0,05$ ), что свойственно европейским популяциям [7]. В Якутии значительно чаще у пациентов было одностороннее поражение (106 чел., 90%), чем в популяции Чили (70%) [19] и Венесуэлы (81%) [9]. У якутов достоверно чаще страдало правое ухо (66%, поражения левого уха 21%), чем у русских (56 и 40%).

Преобладающее большинство – 95 (73,1%) наблюдений ВУА была полной (в кожно-хрящевом и костном отделах), при этом у якутов этот вид патологии встретился чаще, чем у русских (78% против 54%). Частичная атрезия (14 ушей, 10,8%) и стенолитичный слуховой проход (21 ухо, 16,1%) составили меньшее количество случаев в исследуемых группах.

При сравнении степени микротии (классификация Магх, Meurmann, 1957) выраженная гипогенезия ушной раковины в виде кожно-хрящевого валика с развитой мочкой (II степень - 93 уха, 71,5%) достоверно преобладала над легкой (16 ушей, 12,3%) и тяжелой степенью (11 ушей, 8,5%) в обеих группах пациентов. При этом в 10 (7,7%) случаях ВУА ушная раковина была без патологии.

### Выводы

1. Заболеваемость ВУА в Республике Саха (Якутия) в течение 21 года (1984-2004 гг.) составила 3,17 на 10 тыс. родившихся, с колебаниями от 1,5 до 6,2 случаев в отдельные годы, что

превышает последние сводные данные по EUROCAT в 3 раза. При этом отмечено увеличение в 2,8 раза заболеваемости ВУА среди якутского этноса в сравнении с русским пришлым населением – 5,06 против 1,80 на 10 тыс. родившихся.

2. Распространенность ВУА среди детей в разных группах районов Якутии оставалась стабильной, отличаясь увеличением в районах, заселенных якутами (арктическая – 6,9, вилюйская – 5,5, центральная – 4,3 на 10 тыс. детского населения), и отсутствием или низкой распространенностью в районах с преимущественно пришлым населением (юго-западная – 0,24 случая на 10 тыс. детского населения).

3. Особенности клинических проявлений ВУА в популяции Якутии являются: преимущественно одностороннее поражение (90%), выраженная микроотия (80%), высокая частота сопряженной врожденной патологии других органов (40%). При этом у якутов отсутствует разница встречаемости по полу, правое ухо страдает в 3 раза чаще, чем левое и выше частота пол-

ной атрезии, чем у русских (78% против 54%).

### Литература

1. Борисова К.З. Хирургические методы лечения врожденной ушной атрезии: Учеб. пособие / К.З. Борисова, Е.В. Борисова. – Новокузнецк, 2005. – 42 с.
2. Лапченко С.Н. Врожденные пороки развития наружного и среднего уха и их хирургическое лечение / С.Н.Лапченко. – М: Медицина, 1972. – 176 с.
3. Милешина Н.А. Врожденные пороки развития органа слуха у детей: автореф. д-ра. мед. наук / Н.А. Милешина – М., 2003. – 43 с.
4. Пузырев В.П., Эрдynieва Л.С., Кучер А.Н., Назаренко Л.П. Генетико-эпидемиологическое исследование населения Тувы. Томск: STT, 1999. – С.256.
5. A Multi-center Study for Birth Defect Monitoring Systems in Korea / J-H. Yang, Y-J. Kim, J-H. Chung et al. // J. Korean Med. Sci. – 2004. – 19. – P.509-513.
6. Birth Defects Surveillance Data from Selected STATES, 1999-2003 (Part A) – NBDPN. – 2006. – P.894-958.
7. Brent V. The pediatrician's role in caring for patients with congenital microtia and atresia // *Pediatr Ann.* – 1999. – 6. – P. 374 – 383
8. Castilla E.E., Orioli I.M. Prevalence rates of microtia in South America // *International Journal of Epidemiology.* – 1986. -15 (3). – P.364-368.
9. Clinico-epidemiological study of microtia / O. Sanchez, J.R. Mendez, E. Gomez [et al.] // *Invest. – Clin.* – 1997. – 38 (4). – P. 203-217.

10. Declau F. Diagnosis and management strategies in congenital atresia of the external auditory canal//F.Declau, C.Cremers, P. Van de Heyning//*British Journal of Audiology.*-1999.-Vol.33.-P.313-327.

11. ECLAMC Informe Final del ECLAMC 2002 – <http://www.eclamc.ioc.fiocruz.br>

12. Epidemiologic characteristics of anotia and microtia in California, 1989-1997 / G.M. Shaw, S.L. Carmichael, Z. Kaidarova, J.A. Harris // *Birth defects res., Clin. mol. teratol.* – 2004. – V.70, n 7. – P.472-475.

13. Epidemiology and genetics of microtia-anotia: a registry based study on over one million births / Mastroiacovo P, Corchia C, Botto LD, et al. // *J Menet Genet.* – 1995. – 23. P. 453-457

14. EUROCAT. European Surveillance of Congenital Anomalies. Annual Report to WHO 2003. – <http://www.eurocat.ulster.ac.uk>

15. Harris J, Kallen B, Robert E. The epidemiology of anotia and microtia // *J Med Genet.* – 1996. – 33 - P. 809-818

16. International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research. Annual report, 2005 – ICB, Roma, Italia – 316 p.

17. Jahrsdoerfer R.A. Congenital atresia of the ear//R.A.Jahrsdoerfer//*Laryngoscope.*-1978.-Vol.88.-Suppl.13.-P.1-48.

18. JAOG. Japanese Association of Obstetricians and Gynecologists. Annual Report, 2006 – <http://www.jaog.or.jp>

19. Nazer H.J., Lay-Son R.G., Cifuentes O.L. Prevalence of microtia and anotia at the Maternity of the University of Chile Clinical Hospital // *Rev Med Chile* 2006, 134 (10). – P.1295-1301.

Е.И. Шаронова, А.А. Осетрова, Р.А. Зинченко

## НАСЛЕДСТВЕННЫЕ НАРУШЕНИЯ СЛУХА В КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

УДК 575:595

Мы провели анализ наиболее частых мутаций, ответственных за несиндромальную аутосомно-рецессивную форму нейросенсорной тугоухости, в генах GJB2 (мутация 35delG), GJB6 (мутации: del(GJB6-d13S1830) и del(GJB6-d13S1854)) и TMC1 (мутация R34X). Молекулярно-генетическое тестирование проведено у 125 пробандов Кировской области с несиндромальной нейросенсорной тугоухостью, имеющих нарушения слуха различной этиологии. Мутация 35delG в гене GJB2 была обнаружена нами у 36 пробандов. В исследуемой выборке больных мутации del(GJB6-d13S1830) и del(GJB6-d13S1854) в гене GJB6, а также мутация R34X в гене TMC1 обнаружены не были. Таким образом, при проведении медико-генетического консультирования больных нейросенсорной тугоухостью русской национальности поиск мутации 35delG в гене GJB2 является наиболее значимым, так же как и в европейских популяциях.

**Ключевые слова:** GJB2, GJB6, TMC1, наследственные нарушения слуха, тугоухость.

The most frequent mutations responsible for non-syndromic autosomal-recessive form of neurosensory hearing loss in genes GJB2 (35delG), GJB6 (del (GJB6-d13S1830) and del (GJB6-d13S1854)) and TMC1 (R34X) were analyzed. Molecular-genetic testing was performed in Kirov region on 125 probands with non-syndromic neurosensory hearing loss, having hearing disorders of different etiology. 35delG mutation in GJB2 gene was found in 36 probands. There were no del(GJB6-d13S1830) and del(GJB6-d13S1854) mutations in GJB6 gene or R34X mutation in TMC1 gene found in analyzed samples. Thus, during genetic consultation of neurosensory hearing loss patients of russian nationality searching for 35delG mutation in GJB2 gene is most crucial as in European populations. Recent results and our previous research on Russia etnical groups show that the development of region-specific examination protocols for non-syndromic neurosensory hearing loss patients is needed.

**Ключевые слова:** GJB2, GJB6, TMC1, hereditary hearing disorders, hearing loss.

### Введение

Ухудшение слуха – это наиболее распространенное сенсорное расстройство во всем мире. Частота врожденной тугоухости, по данным ряда ис-

следователей, составляет 1:650-1000 новорожденных [6, 51]. Её появление в детском возрасте может иметь драматические последствия для освоения языка, дальнейшего образования и адаптации в обществе.

Причины нарушений слуха многочисленны (табл.1), среди них как генетической природы (более 50%), так и негенетической. Вклад экологических причин (социальные факторы, инфекционный контроль и иммунизация, а также перинатальное медицинское наблюдение) существенен и составляет около 50% [5].

Наследственные нарушения слуха объединяют довольно обширную группу заболеваний, включающих как изолированные состояния, так и наследственные синдромы, в клинической картине которых наблюдаются различные формы слуховых нарушений. Среди всех случаев врожденной тугоухости и/или глухоты синдромальная патология составляет 20-30%, несиндромальная до 70-80% [1,3]. Несиндромальная тугоухость в 75-80% случаев передается по аутосомно-рецессивному типу наследования. На изолированную тугоухость, имеющую

**ШАРОНОВА** Елизавета Игоревна – н.с. Медико-генетического научного центра РАМН, [lisa.sharonova@gmail.com](mailto:lisa.sharonova@gmail.com); **ОСЕТРОВА** Анастасия Анатольевна – врач МГК при ОГУЗ Кировской детской областной клинической больницы, [teyokhina\\_a@mail.ru](mailto:teyokhina_a@mail.ru); **ЗИНЧЕНКО** Рена Абульфазовна – д.м.н., проф., зав.лаб. Медико-генетического научного центра РАМН (г. Москва), [renazinchenko@mail.ru](mailto:renazinchenko@mail.ru).

Таблица 1

## Причины нарушений слуха [5]

Генетические: синдромальные и несиндромальные	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ауtosомно-рецессивные</li> <li>• Ауtosомно-доминантные</li> <li>• Х-сцепленные</li> <li>• Митохондриальные</li> <li>• Хромосомные (синдром Дауна, трисомия 13 и 18 хромосом, синдром Тернера, делеция 22q11)</li> </ul>
Негенетические	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Отоотоксическое медикаментозное лечение, например аминогликозиды (гентамицин, тобрамицин, канамицин, стрептомицин), производные платины</li> <li>• Недоношенность</li> <li>• Неонатальная гипоксия</li> <li>• Низкий вес при рождении</li> <li>• Тяжелая желтуха</li> <li>• Черепно-мозговая травма</li> <li>• Пренатальные инфекции (например, цитомегаловирус, токсоплазма, краснуха)</li> <li>• Постнатальные инфекции (например, менингит)</li> <li>• Шумовое воздействие</li> </ul>

ауtosомно-доминантный тип наследования, приходится 10-20%, и до 2-3% всех случаев с несиндромальной тугоухостью имеют Х-сцепленный тип и митохондриальное наследование [8].

Несиндромальная тугоухость чрезвычайно гетерогенна – было описано около 100 локусов в различных участках генома, связанных с несиндромальной тугоухостью, и идентифицировано 50 генов, кодирующих белки самых разнообразных функций. Но несмотря на эту гетерогенность, варианты одного гена – GJB2 (MIM 121011) вызывают ауtosомно-рецессивную несиндромальную тугоухость в 50% случаев у многих народов мира, что делает ген GJB2 наиболее значимым [9].

С момента картирования локуса и идентификации гена GJB2 (1997 г.) нами проведены комплексные медико- и популяционно-генетические исследования в ряде регионов России: Республика Чувашия, Ростовская область, Республика Удмуртия, Республика Башкирия. Во всех популяциях у больных с изолированной тугоухостью нами проводилась ДНК-диагностика мутации 35delG в гене GJB2. В табл.2 представлена частота мутации 35delG в гене GJB2 в семьях с несиндромальной ауtosомно-рецессивной (АР) тугоухостью в различных регионах России, обследованных в рамках генетико-эпидемиологических исследований лаборатории генетической эпидемиологии МГНЦ РАМН. Анализ табл.2 показал, что из рассматриваемой выборки му-

Частота мутации 35delG в гене GJB2 в семьях с изолированной тугоухостью в различных регионах России [4]

Этнос	Генотипы больных			Всего больных	Всего хромосом у больных	Хромосом с 35delG	Частота у больных
	35delG/35delG	35delG/N	N / N				
Республика Чувашия							
Чуваши	2		38	40	80	4	5,00%
Русские	4	4	6	14	28	12	<b>42,86%</b>
Мордва			6	6	12		0,00%
ИТОГО	6	4	50	60	120	16	13,33%
Ростовская область							
Русские	25	23	27	75	150	73	<b>49,00%</b>
Др.нац.			5	5	10		0,00%
ИТОГО	25	23	32	80	160	73	45,63%
Республика Башкортостан							
Башкиры	2	4	44	50	100	8	8,00%
Русские	4	1	1	6	12	9	<b>75,00%</b>
Марийцы		2	0	2	4	2	100,00%
ИТОГО	6	7	45	58	116	19	16,38%
Республика Удмуртия							
Удмурты		2	39	41	82	2	2,44%
Русские	6	3	3	12	24	15	<b>62,50%</b>
Тат-удм			2	2	4		0,00%
Чечены			3	3	6		0,00%
ИТОГО	6	5	47	58	116	17	14,66%

тация 35delG в гене GJB2 характерна в большом проценте случаев, только для больших русской национальности. Ее частота у русских больных тугоухостью варьирует от 43% в Республике Чувашия до 75,0% в Башкирии. Среди пациентов с изолированной тугоухостью других национальностей частота мутации 35delG составила 5% у чувашей, 2,44% у удмуртов и 4,00% у башкир [4].

**Материалы и методы исследования**

Молекулярно-генетическое тестирование проведено у 125 пробандов с несиндромальной нейросенсорной тугоухостью, имеющих нарушения слуха различной этиологии, в возрасте от 1 года до 18 лет. Обследованные являлись учащимися двух специализированных школ Кировской области для детей с нарушением слуха – школы-интерната II вида в г. Советске и специальной (коррекционной) общеобразовательной школы-интерната I вида в г. Кирове. Клиническое обследование включало: осмотр сурдолога-оториноларинголога (осмотр ЛОР-органов, проверка слуха шепотной и разговорной речью, камертональные пробы, тональная пороговая аудиометрия с

исследованием воздушной и костной проводимости с помощью аудиометра МА-31), консультацию генетика. Всем больным была проведена ДНК-диагностика в лаборатории генетической эпидемиологии ГУ МГНЦ РАМН, включавшая анализ наиболее частых мутаций в генах GJB2 (мутация 35delG), GJB6 (мутации: del(GJB6-d13S1830) и del(GJB6-d13S1854) и TMC1 (мутация R34X).

ДНК выделена из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции [11]. Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК и полиморфизма длин рестриционных фрагментов с последующим электрофорезом.

Анализ мутации 35delG в гене GJB2 проводился по протоколу, составленному Некрасовой и соавторами [2].

Анализ мутаций del(GJB6-d13S1830) и del(GJB6-d13S1854) в гене GJB6 проводился по протоколу F. J. del Castillo [6].

Анализ мутации R34X в гене трансмембранного белка улитки TMC1 проводился в следующих условиях: Амплификация проводится методом ПЦР в 25µl смеси следующего состава: 0,1µg ДНК; 1xПЦР буфер (67 mM Tris-HCl;

16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.01% Twin-20; pH 8.8); 2,5mM MgCl<sub>2</sub>; 200 μM каждого dNTP, по 5μMоль праймеров TMC1-F (5' - GGGAGGAAGCACTTTCTGACA - 3') и TMC1-R (5' - CTGGTTCAGGTTCTGGGTCAT - 3'), 1U Taq-DNA полимеразы. Реакция проводится при следующих условиях: первичная денатурация при 94°C в течение 5 мин, после которой следует 30 циклов, состоящих из денатурации при 94°C в течение 5 сек, отжига праймеров при 66°C в течение 15 сек, в конце реакции проводилась финальная достройка при 72°C в течение 7 мин. ПЦР проводят на амплификаторе Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Длина амплифицированного фрагмента составляет 160 п.н. Продукты амплификации подвергаются дальнейшей обработке эндонуклеазой рестрикции Taq1 по протоколу Fermentas. Эндонуклеаза рестрикции Taq1 расщепляет только ДНК, не несущую мутацию R34X, с образованием двух фрагментов длинами 90 п.н. и 70 п.н. Анализ длин рестриционных фрагментов производится путем электрофореза в 2,5%-ном агарозном геле (рисунк).

### Результаты и обсуждение

Всего осмотрен 151 ребенок с нарушением слуха: 94 в Кировской школе (ШК) и 57 в школе г. Советска (ШС), что составило 89,5 и 93,4 % от общего количества детей, обучающихся в школах, соответственно. Синдромальная наследственная патология выявлена у 11 детей: в ШК – 3,2% (3 чел.), в ШС – 14,0% (8 чел.). Выявлены следующие наследственные синдромы: синдром Элерса – Данло, тип II; нейрофиброматоз, тип I; синдром Франческетти; синдром алопеции-тугоухости-камптодактилии; лакримо-аурикуло-денто-дигитальный синдром; синдром Вильямса; синдром низкого роста-прогерии-пигментных невусов; синдром эктродактилии и тугоухости.

У 125 пробандов с изолированной тугоухостью проведена ДНК-диагностика на частые мутации в трех генах. Мутация 35delG в гене GJB2 была обнаружена нами у 36 пробандов: у 22 в гомозиготном состоянии и у 14 – в гетерозиготном.

В исследуемой выборке больных нейросенсорной тугоухостью Кировской области мутации del(GJB6-d13S1830) и del(GJB6-d13S1854) в гене GJB6, а также мутация R34X в гене трансмембранного белка улитки TMC1 обнаружены не были.

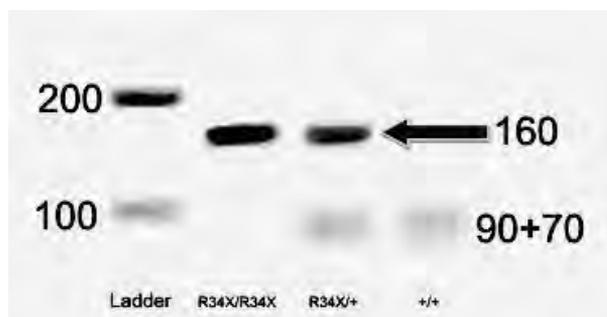
Все дети с изолированным нару-

шением слуха были разделены на 2 группы – с отягощенным и неотягощенным семейным анамнезом по нарушениям слуха. В 1 группу вошли 28 чел., (ШК – 20, ШС – 8), из которых у 11 (39,29%) мутация 35delG выявлена в гомозиготном состоянии, а у 3 – в гетерозиготном. Таким образом, в 1 группе частота мутации 35delG составляет 50%. Тяжесть нарушений слуха в основном определялась от III-IV степени до полной глухоты.

В группе с неотягощенным анамнезом (112 чел.) мутация 35delG выявлена в 25% случаев (18 в гомозиготном состоянии и 10 в гетерозиготном). Среди 18 гомозиготных носителей у 6 в анамнезе отмечено сочетанное влияние внешнесредовых факторов. У гетерозигот не наследственные факторы выявлены также у 6 детей. Полученные результаты показывают необходимость проведения ДНК-диагностики не только при отягощенном семейном анамнезе, но и в случаях наличия внешнесредовых факторов в анамнезе ребенка.

Различные случаи врожденной нейросенсорной тугоухости могут иметь одинаковую клиническую картину. Ранее нами были составлены списки генов, мутации в которых приводят к аутосомно-доминантным, аутосомно-рецессивным, X-сцепленным и митохондриальным формам нарушения слуха [4]. Основываясь на теоретическом анализе данных мутаций, нами была составлена схема поиска причин нарушения слуха у больных нейросенсорной тугоухостью аутосомно-рецессивного типа наследования. Мы провели анализ наиболее частых мутаций, ответственных за несиндромальную аутосомно-рецессивную форму нейросенсорной тугоухости, в генах GJB2 (мутация 35delG), GJB6 (мутации: del(GJB6-d13S1830) и del(GJB6-d13S1854), вызывающие аутосомно-рецессивную доречевую двустороннюю полную форму нейросенсорной тугоухости) и TMC1 (мутация R34X, вызывающая аутосомно-рецессивную доречевую от тяжелой до полной форму нейросенсорной тугоухости).

Следует отметить, что, по данным del Castillo и соавторов, делеция del(GJB6-d13S1830) в гене GJB6, затрагивающая обширную область



Электрофореграмма результатов анализа мутации R34X в гене трансмембранного белка улитки TMC1

размером 309 kb, встречается в 50% случаев в гетерозиготном состоянии у испанских пациентов, страдающих нейросенсорной тугоухостью, гетерозиготных по мутациям в гене GJB2 [6]. В ходе исследований, проводимых в 9 странах было показано, что эта делеция представлена в большинстве скринируемых популяций, с высокой частотой во Франции, Испании и Израиле (16-20,9%) [7]. Однако в Центральной Европе данная мутация встречается довольно редко [12]. Делеция del(GJB6-d13S1854) с гене GJB6, затрагивающая область размером 232 kb, встречается в 22,2% случаев в гетерозиготном состоянии у пациентов из Англии (6,3% в Бразилии, 1,9% в Северной Италии), гетерозиготных по мутациям в гене GJB2 [6]. В проведенных нами исследованиях не были выявлены эти мутации у пациентов, в том числе и в компаунд гетерозиготе с мутацией 35delG. Не было обнаружено никакой ассоциации между генотипами по GJB2 и GJB6. Это позволяет сделать вывод, что данная статистика не приемлема к российской популяции.

Мутация R34X в гене TMC1, которая, по данным Kitajiri [11], составляет 1,8% среди больных тугоухостью в Пакистане, обнаружена не была в исследуемой выборке.

### Заключение

Таким образом, при проведении медико-генетического консультирования больных нейросенсорной тугоухостью русской национальности поиск мутации 35delG в гене коннексина 26 является наиболее значимым, так же как и в европейских популяциях, однако спектр следующих по частоте мутаций для российской популяции не определен. Полученные в данном исследовании результаты в совокупности с более ранними нашими данными по этническим группам России показывают, что требуется разработка собственных регион-специфических

протоколов обследования пациентов с несиндромальной нейросенсорной тугоухостью.

*Работа выполнена при частичном финансировании РФФИ (07-04-00090 и 08-04-00534) и федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (в рамках научных школ).*

### Литература

1. Маркова Т.Г. Наследственные формы тугоухости и медико-генетическое консультирование // Медицинская генетика. – 2004. – Т.3, №2. – С. 50-69
2. Некрасова Н.Ю., Шагина И.А., Петрин А.Н., Поляков А.В. Частота мутации 35delG в гене кон-

нексина 26 у детей, страдающих ранней детской нейросенсорной тугоухостью // Там же. – 2002. – Т.1, №6. – 290-294

3. Таварткиладзе Г.А., Загорянская М.Е., Румянцева М.Г., Гвелесиани Т.Г., Ясинская А.А. Методики эпидемиологического исследования нарушений слуха (методические рекомендации) переработанные и дополненные. – 2006. (<http://www.audiology.ru/ru/surdo/epid/>)

4. Шаронова Е.И., Осетрова А.А.2, Зинченко Р.А. Генетические основы аспедственных нарушений слуха // Медицинская генетика. – 2008. – Т.7, №12(78). – 25-38

5. Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans // Br. Med. Bull. – 2002. – Vol.63. – P.73-94

6. del Castillo F.J., Rodriguez-Ballesteros M., Alvarez A., et al. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment // J. Med. Genet. – 2005. – Vol.42. – P.588-594

7. del Castillo Moreno-Pelayo M. A., del Castillo F.J., Brownstein Z., et al. Prevalence and

evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study // Am. J. Hum. Genet. – 2003. – Vol.73. – P.1452-1458

8. Fischel-Ghodsian N., Kopke R.D., Ge X. Mitochondrial dysfunction in hearing loss // Mitochondrion. – 2004. – Vol.4(5-6). – P.675-694

9. Kenneson A., Van Naarden Braun .K, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review // Genet. Med. – 2002. – Vol.4. – P.258-274

10. Kitajiri S., McNamara R., Makishima T., et al. Identities, frequencies and origins of TMC1 mutations causing DFNB7/B11 deafness in Pakistan // Clin. Genet. – 2007. – Vol.72 – P.546-550

11. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucaryotic DNA // Methods Molec. Biol. Ed. Walker J.M. Y.L. Humana Press. – 1984. – Vol.2. – P.31-34

12. Seeman P., Bendova O., Raskova D., et al. Double heterozygosity with mutations involving both the GJB2 and GJB6 genes is a possible, but very rare, cause of congenital deafness in the Czech population // Ann. Hum. Genet. – 2005. – Vol.69. – P.9-14.

А.Н. Ноговицына, Н.Р. Максимова, А.Л. Сухомясова, Т.Д. Павлова, Е.Е. Гуринова

## МОНИТОРИНГ ХРОМОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ У НОВОРОЖДЕННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ) С 2000 ПО 2007 г.

УДК 616.-055.5/(57.156)

Хромосомные болезни – это большая группа врожденных болезней, клинически характеризующихся в большинстве случаев множественными пороками развития, умственной отсталостью, нарушением деятельности нервной, эндокринной систем, снижением генеративной функции [3]. Хромосомные болезни занимают одно из ведущих мест в структуре наследственной патологии человека. Среди новорожденных частота хромосомной патологии составляет 0,6-1,0%. Сравнительно немногие варианты числовых аномалий хромосом совместимы с постнатальным развитием и ведут к хромосомным заболеваниям [6]. Частота хромосомных аномалий составляет 5-7 на 1000 новорожденных, причем около 25% приходится на аутосомные трисомии, около 35% – гоносомную патологию и приблизительно 40% – на сбалансированные и несбалансированные структурные аномалии хромосом [3]. Причины возникновения хромосомных аномалий недостаточно

изучены. К факторам, способствующим их возникновению, относят ионизирующую радиацию, воздействие ряда химических веществ, а также тяжелые инфекции и интоксикации. Значительную роль в возникновении хромосомных аномалий играет сбалансированное носительство нарушений хромосомного набора. Скрытое носительство малых мозаичных форм (небольшое число аномальных аномальных клеток в организме) у родителей также может служить причиной хромосомного заболевания у ребенка.

Общее для всех форм хромосомных болезней – множественность поражения. Это черепно-лицевые дизморфии, врожденные пороки развития внутренних органов и частей тела, замедленные внутриутробные и постнатальный рост и развитие, отставание психического развития, нарушение функций нервной, эндокринной и иммунной систем. Степень отклонений в развитии организма зависит от качественной и количественной характеристики унаследованной хромосомной аномалии. Полные трисомии у живорожденных наблюдаются только по тем аутосомам, которые богаты гетерохроматином (8,9,13,18,21). Также объясняется полисомия (до пентасомии) по половым хромосомам, в которой Y-хромосома имеет мало генов, а добавочные X-хромосомы бывают гетерохроматизированы.

В основе классификации хромосомной патологии лежат три критерия:

первый – характеристика хромосомной или геномной мутации (триплоидия, простая трисомия по хромосоме 21, частичная моносомия и т.д.). Дифференциация хромосомной патологии на основании клинической картины не имеет существенного значения, поскольку при разных хромосомных аномалиях имеется большая общность нарушений развития.

Второй – определение типа клеток, в которых возникла мутация (в гаметах или зиготе). Гаметические мутации ведут к полным формам хромосомных болезней. Если хромосомная аномалия возникла в зиготе или на ранних стадиях дробления, то развивается организм с разной хромосомной конституцией (два типа и более). Такие формы хромосомных болезней называют мозаичными и составляют всего около 1%.

Третий – выявление поколения, в котором возникла мутация: возникла ли она заново в гаметах здоровых родителей (спорадические случаи) или родители уже имели такую аномалию (наследуемые, или семейные, формы). Большая часть наследуемых случаев хромосомных болезней связана с наличием у здоровых родителей Робертсоновских транслокаций, сбалансированных реципрокных транслокаций между двумя (реже более) хромосомами, и инверсий, которые составляют около 4% из хромосомных болезней [1]. В структуре обращаемости на пренатальную диагностику эта категория

Сотрудники ЯНЦ КМП СО РАМН: **НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна** – к.м.н., врач-генетик высшей категории ПЦ РБ№1-НЦМ, зав. лаб.; **МАКСИМОВА Надежда Романовна** – к.м.н., врач-генетик первой категории, гл.н.с.; **СУХОМЯСОВА Айталипа Лукична** – к.м.н., врач-генетик первой категории, зав. МГК РБ№1-НЦМ, зав. лаб.; **ГУРИНОВА Елизавета Егоровна** – врач-генетик МГК ПЦ РБ№1-НЦМ., н.с.; **ПАВЛОВА Татьяна Дмитриевна** – врач-лаборант первой категории МГК ПЦ РБ№-НЦМ.

Таблица 1

Частота Б. Дауна в регионах Российской Федерации  
1:1000

Регион	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Белгородская		-	-	-	0,73	0,50	1,09
Астраханская		-	-	-	-	2,04	1,14
Иркутская		0,11	0,1	1,17	0,90	1,45	-
Краснодарский	0,09	-	0,13	1,05	1,24	1,13	0,92
Красноярский	0,09	-	0,8	0,85	-	0,53	0,98
Новосибирская	0,09	0,05	-	-	0,74	0,51	0,43
Омская	-	-	0,1	0,86	2,35	0,99	0,84
Санкт-Петербург	-	0,09	0,11	0,66	0,89	0,84	1,01
Свердловская	-	-	-	1,31	1,60	1,31	1,36
По РФ				1,10	1,10		

пациентов незначительна. В регионах РФ этот показатель достигает 5%, в РС(Я) – 0,5%. Из 12 исследований отклонения в кариотипе выявлены в 9 случаях, из них 3 случая (33%) наследуемых форм хромосомной патологии у плода, 6 (67%) – родительского сбалансированного носительства [5].

В периоде новорожденности неонатологами клинически распознаются трисомии по соматическим хромосомам (8,9,13,18,21), так как имеются большие врожденные пороки развития, полисомии по половым хромосомам и структурные аномалии могут быть не диагностированы в раннем возрасте без анализа кариотипа. Таким образом, ранняя клиническая и цитогенетическая диагностика проводится, главным образом, при болезни Дауна (трисомия по 21 хромосоме составляет 95%), которая является наиболее частой из хромосомных заболеваний. Частота Б. Дауна в различных регионах является примерно одинаковой и составляет 1:800 новорожденных, но могут быть колебания по годам (табл.1).

Одним из признаков глобального экологического кризиса признано сокращение биоразнообразия в масштабе всей планеты, вызванное главным образом хозяйственной деятельностью человека: разрушением среды обитания, чрезмерной эксплуатацией природных ресурсов, загрязнением окружающей среды. Официальным государственным документом, содержащим сведения об исчезающих, редких, уязвимых видах растений и животных, являются Красные книги различного уровня. Наиболее четким индикатором качества жизни населения на той или иной территории мы считаем уровень здоровья населения, отражающий экологические, климатические, социально-экономические и прочие условия жизнедеятельности человека. Напряженная экологическая ситуация присуща улусам с развитым промышленным производством (Мирнинский, Ленский, Нерюнгринский, Алданский). Крайне напряженная экологическая ситуация к настоящему времени сложилась в Якутске с подчиненной ему территорией [2].

Первые медико-генетические исследования в Республике Саха (Якутия) были проведены в 1994 г. по Программе «Изучение груза наследственных болезней и анализ пороков развития в Верхневилуйском и Амгинском районах РС(Я) в качестве основы генетических последствий загрязнения окружающей среды», продолжены в 2000 г. в Нюрбинском и Усть-Алданском улусах. Частота Б.Дауна за период с 1984 по

1993 г. в Верхневилуйском и Амгинском улусах 0,1; с 1990 по 1999 г. в Нюрбинском, Усть-Алданском улусах 0,85 и 0,66 на 1000 новорожденных соответственно [4].

Таким образом, генетико-эпидемиологическое изучение распространенности и структуры хромосомной патологии на основании Базы данных группы мониторинга медико-генетической консультации ПЦ РБ1- НЦМ по всем улусам у населения Республики Саха (Якутия) проводится впервые.

**Цель:** Исследовать частоту и структуру хромосомных болезней у новорожденных в различных регионах республики по данным мониторинга для определения их базовых частот.

#### Материал и методы исследования

Для анализа использовалась медико-генетическая информация о семьях с хромосомными болезнями новорожденных и плодах с 2000 по 2007 г. рождения, которая формируется из сведений, полученных при текущей регистрации полного спектра врожденных пороков развития (ВПР). Учитывались все формы хромосомной патологии, выявленные у новорожденных и прерванных плодов. В анализ исследования включены сведения о 111792 родах, из них 175 с хромосомной патологией. Все выявленные в ходе исследования случаи хромосомной патологии были распределены по системам согласно классификации ВОЗ, отдельно была выделена группа Б. Дауна, которая относится к клинически «легко распознаваемым порокам». Из 175 хромосомных патологий 115 – с Б. Дауна (65,5%). 18 диагнозов Б.Дауна (15,7%) были выставлены клинически, учитывая обширность региона и трудности госпитализации больных в РБ№1-НЦМ, без анализа кариотипа. Все остальные формы хромосомной патологии новорожденных и

плодов уточнены анализом кариотипа в медико-генетической консультации.

#### Результаты и обсуждение

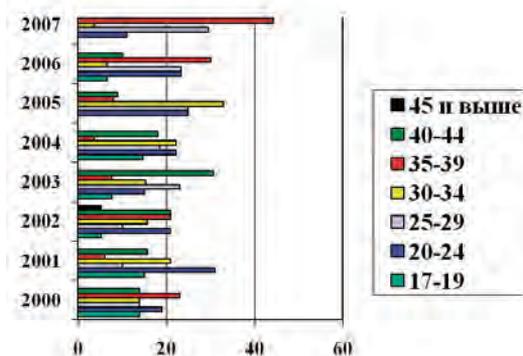
Всего 2000-2007 г. получены извещения на 175 живо- и мертворожденных новорожденных и плодов с хромосомной патологией.

Возраст матери является одним из факторов, влияющих на рождение детей с хромосомной патологией. Из 175 матерей у рожавших до 17 лет не было родов с хромосомной патологией, в 17-19 лет от 8%, 20-34 года – 55%, 35 лет и старше – 37%.

В последние годы наблюдается значительное увеличение возраста матери (старше 35 лет) у ребенка с хромосомной патологией: в 2006 г. – 40%, 2007 г. – 48,2% (рисунок).

Всего в отдел мониторинга ВПР медико-генетической консультации за 2000-2007 г. из родильных домов г. Якутска и ЦУБ поступило 140 извещений на новорожденных с хромосомной патологией и 35 – из патолого-анатомического отделения РБ№1-НЦМ по элиминированным плодам (20%). (табл.2,3). Не все случаи выявленных пренатально хромосомных аномалий были прерваны (дубль Y-хромосомы у одного из близнецов, сбалансированная хромосомная аномалия как у матери, случаи выявления Б.Дауна после 28 недель и т.д.).

Из 140 больных 34 – жители г. Якутска, что составило 23,7%. Из всего



Средний возраст матерей новорожденных с б.Дауна

Таблица 2

**Структура хромосомной патологии у живо- и мертворожденных с 2000 по 2007 г. в Республике Саха (Якутия)**

Нозологии	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Всего
Б. Дауна-трисомия	15	12	15	6	12	5	19	19	103
Б. Дауна-мозаичная форма	2	1	-	2	-	-	-	1	6
Б. Дауна-транслокационный вариант	-	-	1	-	1	-	4	-	6
С. Патау	-	-	-	-	-	-	-	-	-
С. Эдвардса	1	1	-	2	1	-	-	2	7
С Шерешевского-Тернера	1	1	-	-	-	1	-	1	4
Полисомии X-синдром	1	1	2	-	-	-	-	-	4
Полисомии У-хромосом.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
С. Клайнфельтера	1	-	-	-	1	-	-	-	1
Структурные хромосомные аномалии	1	1	1	-	1	2	1	1	8
Всего в Якутске	9	4	2	1	3	2	7	6	34
Всего в улусах	13	13	17	9	13	6	17	18	106
ХБ всего	22	17	19	10	16	8	24	24	140

Таблица 3

**Частота Б. Дауна по годам на 1000 новорожденных в Республике Саха (Якутия) с 2000 по 2007 г.**

Нозологии	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Всего
Родилось с Б. Дауна	15	12	15	6	12	5	19	19	103
Мозаичная форма Б. Дауна	2	1	-	2	-	-	-	1	6
Транслокационный вариант Б. Д.	-	-	1	-	1	-	4	-	6
Прерванные плоды с Б. Дауна	-	2	1	1	3	-	1	3	11
Мозаичная форма Б. Дауна	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Транслокационный вариант Б. Д.	-	-	-	-	1	1	1	-	3
Всего Б. Дауна по РС(Я)	17	15	17	9	17	6	25	23	129
Число родившихся	13100	13362	13887	14224	14716	13591	13713	15199	111792
Частота Б. Дауна на 1000 новорожд	1,29	1,12	1,22	0,63	1,15	0,44	1,82	1,51	1,15

Таблица 4

**Прерванные плоды с хромосомной патологией по медицинским показаниям в РС(Я) в 2000-2007 гг.**

Нозологии	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Всего
Б. Дауна	-	2	1	1	3	-	2	3	11
В т.ч. мозаичная форма	-	-	-	-	-	-	-	-	-
В т.ч. транслокационный вариант	-	-	-	-	1	1	1	-	3
С. Патау	-	-	-	1	-	-	-	-	1
С. Эдвардса	-	-	1	-	4	2	2	1	10
С Шерешевского-Тернера	-	-	-	-	1	-	1	-	2
Полисомии X-синдром	-	-	-	-	-	-	1	-	1
С. Клайнфельтера	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Структурные хромосомные аномалии	-	-	1	1	2	1	1	-	6
г. Якутск	-	2	3	2	5	3	4	2	21
Улусы	-	-	-	1	6	1	4	2	14
Всего ХБ	-	2	3	3	11	4	8	4	35

числа новорожденных с хромосомной патологией 115 – с Б. Дауна (82%), с синдромом Эдвардса – 7 (5%), с нарушениями половых хромосом – 9 (6,4%), структурными аномалиями – 8 (5,7%). Не был диагностирован у новорожденных синдром Патау, т.к. выживаемость больных низкая, а также синдром полисомии У-хромосомы – из-за отсутствия клинических критериев в период новорожденности. По

другим хромосомным аномалиям также может быть недостаточно полная информация (нарушения половых и структурных аномалий хромосом), т.к. в периоде новорожденности данные состояния клинически могут быть не распознаны. Таким образом, анализ частоты по годам и территориям был проведен относительно Б. Дауна.

Частота Б. Дауна является одним из основных показателей хромосомной

патологии в любом регионе. Так, за 2000-2007 гг. колебания частоты Б. Дауна составили от самой низкой 1: 2265 (0,44 на 1000 новорожденных в 2005 г.) до 1 : 548 (1,82) в 2006 г., в среднем за 8 лет частота составила 1 : 866 (1,15 на 1000) новорожденных, что сопоставимо с данными других регионов (по РФ 1,1). Наиболее высокие показатели частоты Б. Дауна на 1000 новорожденных по годам: 2000 г. - 1,29, 2006 г. - 1,82, 2007 г. - 1,51 (табл.3).

Одной из основных задач медицинской генетики является профилактика некорректируемой наследственной патологии в регионе, в том числе и хромосомной.

В этих целях в регионе акушерско-гинекологическим звеном здравоохранения и медико-генетической службой организуются мероприятия по выявлению хромосомной патологии в ранних сроках беременности.

Всего в республике за 2000-2007 гг. прервано плодов 35 с хромосомной патологией (табл.4). Эффективность профилактики хромосомной патологии составила по республике 20%, в г. Якутске – 38,8%, по улусам – 11,7%. Таким образом, в г. Якутске имеются лучшие условия для проведения профилактических мероприятий врожденных пороков развития. А центральные улусные больницы нуждаются в реальной помощи в подготовке специалистов по УЗИ беременных, финансовой – для оплаты проезда беременным с места проживания до медико-генетической консультации.

За 2000-2007 гг. в некоторых районах, чаще северных, с малым числом родов, не наблюдалось рождения детей с Б. Дауна.

Частота Б. Дауна в сельскохозяйственных улусах имеет большой разброс. Так, самая высокая частота по республике – в Чурапчинском (4,0 на 1000 новорожденных) и Усть-Алданском (3,4) улусах. Объяснить данный факт весьма сложно, например высокая частота в Аллаиховском (3,0 на 1000 новорожденных), Булуномском (2,3) улусах, возможно из-за «эффекта малых чисел». Из вилуйской группы районов в Нюрбинском (0,31 на 1000 новорожденных), Верхневилуйском (0,36) – частота низкая, а в Сунтарском (1,92 на 1000 новорожденных) и Вилуйском (2,62) – выше среднереспубликанской. Единственным критерием из числа экологических факторов явилось то, что Усть-Алданский и Чурапчинский, а также Анабарский, Мегино-Кангалаский, Амгинский, Горный, Жиганский,

Таблица 5

Уязвимость территорий по видовому разнообразию млекопитающих в РС(Я)

Административный район (улус)	Данные Бурцевой Е. И		Частота б. Дауна на 1000 новорожденных (собств. данные)
	шкала ранжирования	степень	
Алданский	1 (<0,7)	Умеренная	1,4
Олекминский			0,37
Ленский			2,9
Нерюнгринский			1,33
Верхоянский	2 (0,71-0,8)	Относительно умеренная	1,5
Вилуйский			2,62
Булунский			2,3
Хангаласский			1,12
Эвено-Бытантайский			-
Г. Якутск			1,15
Верхневилуйский			0,36
Кобяйский	3 (0,81-1,0)	Относительно умеренная	1,60
Намский			1,33
Нюрбинский			0,31
Оленекский			-
Среднеколымский			-
Сунтарский			1,92
Усть-Янский			-
Анабарский			-
Мегино-Кангаласский			1,11
Амгинский			1,4
Горный	4 (1,01-1,3)	Высокая	1,25
Жиганский			-
Нижнеколымский			-
Абыйский			-
Таттинский			1,11
Верхнеколымский			4,6
Аллайховский			3,0
Мирнинский			1,27
Усть-Алданский			3,4
Чурапчинский			4,0
Момский			1,95
Усть-Майский	5 (>1,3)	Крайне высокая	-
Оймяконский			-
Томпонский			1,11

Нижнеколымский, Абыйский, Таттинский, Мирнинский улусы относятся к территориям с высокой уязвимостью по видовому разнообразию млекопитающих.

Имеет значение в частоте врожденных пороков развития, а также болезни Дауна, массовое УЗИ в первом триместре беременности (11-12 недель), когда при выявлении или подозрении заболевания у плода, без генетических исследований, плоды могут быть элиминированы решением самой женщины, особенно в промышленных группах районов, где имеется хорошее оснащение. Также имеет значение рождение ребенка после 35 лет в промышленных улусах, где более высокая миграция населения, низкая доля родов в старших возрастных группах. А в сельскохозяйственных районах пока более низкий уровень мероприятий по профилактике врожденных пороков развития и высокая доля родов у женщин старше 35 лет.

#### Выводы

В ходе изучения базовой частоты хромосомных болезней в 2000-2007 гг. и частоты б. Дауна по улусам выявлено:  
- средняя частота хромосомной патологии в республике не превышает общероссийские, а также мировой уровень;

- имеются среднегодовые колебания частоты хромосомной патологии по периодам, что согласуется с литературными данными;

- в промышленных улусах (Алданском, Ленском, Нерюнгринском, Мирнинском) частота б. Дауна умеренно превышает среднереспубликанские;

- высокая частота б. Дауна в сельскохозяйственных улусах – Усть-Алданском, Чурапчинском, Вилуйском, Булунском, Верхнеколымском, требует более углубленного исследования.

На основе полученных результатов будут предложены комплексные методы исследования, профилактики, в том числе пренатальная диагностика, что позволит снизить частоту хромосомных болезней у детей и, как следствие, детскую смертность и инвалидность в регионе.

*Выражаем благодарность врачам родильных домов, участвовавшим при мониторинге врожденных пороков развития.*

#### Литература

1. Бочков Н.П. Клиническая генетика / Н.П. Бочков. – М. Гэотар-Мед. 2002. С. 160-167.
2. Бурцева Е.И. Геоэкологические аспекты развития Якутии / Е.И. Бурцева. - Новосибирск: Наука, 2006. - С. 267.
3. Ворсанова С.Г. Медицинская цитогенетика / С.Г. Ворсанова, Ю.Б. Юров, В.Н. Чернышов. - М., 2006. С. 207.
4. Ноговицына А.Н. Отягощенность населения РС(Я) наследственной патологией и анализ работы региональной медико-генетической консультации: автореф. к.м.н. / А.Н. Ноговицына. - Томск 2001.
5. Пестерева Е.Л. Состояние и перспективы развития инвазивной пренатальной цитогенетической диагностики в Республике Саха (Якутия) / Е.Л. Пестерева, О.Г. Сидорова // Якутский медицинский журнал. - 2008.- №4(24) - С.40-43.
6. Синдром Дауна / Под ред. Ю.И. Барашнева. М.: «Триада – X», 2007. - С. 280.

## ЭТНОГЕНОМИКА И ДЕМОГРАФИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА КОРЕННЫХ НАРОДОВ СЕВЕРА

С.А. Федорова, Э.К. Хуснутдинова

### ЭТНИЧЕСКАЯ ГЕНОМИКА НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК 575.174.599.9

Представлены основные результаты этногеномных исследований коренного населения Республики Саха (Якутия), проведенных в Отделе молекулярной генетики ЯНЦ КМП СО РАМН.

**Ключевые слова:** мтДНК, Y-хромосома, популяции Якутии.

The basic results of ethnogenomic researches of indigenous population of the Republic Sakha (Yakutia), lead in a department of molecular genetics of YSC CMP SB RAMS are presented.

**Keywords:** mtDNA, Y-chromosome, populations of Yakutia.

Первые этногеномные исследования, в которых затрагивались от-

**ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна** – д.б.н., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; **ХУСНУТДИНОВА Эльза Камиловна** – д.б.н., проф., зав. отделом Института биохимии и генетики УНЦ РАН.

дельные популяции Якутии, были сфокусированы на изучении древних миграций человека по территории Евразии и заселения Америки [13, 24]. Более интенсивные исследования были предприняты по изучению структуры генофонда якутов как наиболее многочисленного этноса Сибири [1,

3, 4, 6, 9, 10, 16, 17, 18, 25], однако оставалось множество нерешенных вопросов, касающихся соотношения отдельных компонентов генофонда и генетических взаимоотношений между популяциями. Разнообразие трактовок, отсутствие информации о характере межпопуляционной и межэтнической

кой дифференциации, недостаточная изученность параметров внутриэтнической вариабельности не позволяли получить однозначную генетическую оценку по вопросам происхождения и генетической истории народов Якутии. Противоречия определялись, на наш взгляд, главным образом, недостаточной изученностью структуры генофонда непосредственных соседей якутов – эвенков, эвенов и юкагигов, а также недостаточной глубиной филогенетического анализа для всех изученных к настоящему времени популяций.

Нами впервые проведено исследование структуры генофонда народов Якутии (якуты, эвенки, эвены, юкагиры и долганы) как целостной популяционной системы с использованием оценки генетического разнообразия нескольких взаимодополняющих генетических систем - митохондриальной ДНК и Y-хромосомы, аутомсомных Alu-инсерций, а также высокополиморфного участка (CTG)<sub>n</sub>-повторов DMPK-гена.

Результаты проведенного исследования [5, 6] свидетельствуют о том, что популяции Якутии входят в единый генетический континуум, охватывающий северо-восточную часть Евразии (территория Южной и Западной Сибири, Монголии, Дальнего Востока, Чукотки и Камчатки), который характеризуется преобладанием восточно-евразийского компонента и повышенным содержанием С и D гаплогрупп мтДНК, N и C гаплогрупп Y-хромосомы [12, 13].

Результаты филогеографического анализа линий мтДНК и Y-хромосомы, распространенных в Якутии [5, 19], свидетельствуют об их южном происхождении (рисунок). Присутствие в генофонде популяций Якутии митохондриальных гаплогрупп, характерных для регионов Юго-Восточной Азии и Южной Сибири (A4, B4, B5, F1b, F2a, M7, M13) [12, 14, 23], Дальнего Востока (Y) [20] и Средней Азии [11], очевидно, связано с древними миграционными процессами в направлении юг-север, имевшими место в прошлом. Происхождение гаплогрупп N3 и C Y-хромосомы также, бесспорно, связано с более южными регионами – Северным Китаем [19] и Южной Азией [2]. Анализ генетических взаимоотношений между популяциями Якутии и соседних регионов указывает на то, что к популяциям Якутии по спектру линий наиболее близки популяции Южной Сибири. Таким образом, предположения об исторических связях современных народов Якутии с древними племенами, населявшими Южную Сибирь, находят генетическое подтверждение.

Любопытно, что по полиморфизму мтДНК наблюдаются достаточно глубокие генетические различия между популяциями Якутии и соседних регионов Чукотки и Камчатки.

Линии A2a, A2b, D2a, специфические для чукчей и эскимосов [22], и Z1-линии, характерные для коряков и ительменов [20], не найдены в Якутии. Небольшое количество линий G1b, C4b2, C5a в генофонде юкагигов и эвенов указывает на слабый поток генов из популяций Камчатки. Исходя из данных анализа времени коалесценции регионально-специфических кластеров мтДНК, обмен генами между популяциями Чукотки и Камчатки и популяциями соседних регионов, в том числе Якутии, был ограничен по крайней мере в течение последних 2500-5300 лет. Косвенным подтверждением этому служат результаты филогенетического анализа древней ДНК из погребения, относимого к ымыяхтахской эпохе позднего неолита Якутии (4-3 тыс. лет назад) [7].

В противоположность данным по митохондриальным маркерам различия в спектре гаплогрупп регионов Якутии, Чукотки и Камчатки по полиморфизму Y-хромосомы далеко не так очевидны, что может объясняться 1) относительно недавним интенсивным притоком N3-хромосом из Якутии в популяции Берингии, 2) формированием мужского генного пула популяций Якутии, Чукотки и Камчатки в результате последовательных миграций из ареала, общего для всех сибирских регионов, который характеризовался высокой частотой гаплогруппы N3. Первое предположение не подтверждается результатами филогенетического анализа STR-линий – N3-гаплотипы якутов не совпадают с N3-гаплотипами чукчей, эскимосов, коряков и эвенов,



Направления древних миграционных потоков из соседних регионов на территорию Якутии (указаны стрелками). Желтым цветом указаны гаплогруппы, происхождение которых связано с регионами Южной Сибири, Северного Китая и Средней Азии, голубым – с регионами Чукотки и Камчатки

формируя отдельную специфическую ветвь в N3-сети [19]. Таким образом, второе предположение, на наш взгляд, выглядит более вероятным. Недавний приток N3-хромосом из регионов Чукотки и Камчатки в Якутию может быть действительным для северо-восточных популяций юкагигов и эвенов, непосредственных соседей чукчей и коряков.

Содержание западноевразийских линий в генофонде популяций РС(Я) объясняется не только смешением с русскоязычным населением. Анализ совпадающих линий между популяциями Якутии, Европы, Южной и Западной Сибири показывает, что более вероятным источником некоторых западноевразийских линий генофонда коренных этносов Якутии может быть древнее население Южной Сибири. Полученные нами данные свидетельствуют о наличии древнего палеоевропейского компонента в генофонде якутов и эвенков [5].

Гаплогруппы, характерные для популяций Америки (A2, B2, C1b, C1c, C1d, C4c, D1, X2a и D4h3), не обнаружены в митохондриальном генофонде популяций Якутии. Гаплогруппа D2, которая связана с более поздними миграциями в Берингию [21], представлена единственной D2b-линией, распространенной в азиатских популяциях. Гаплогруппы Q и C3\* Y-хромосомы, типичные для аборигенных популяций Америки, выявлены в популяции юкагигов. Так как численность юкагигов составляет менее 1% от

общей численности населения РС(Я), то можно предположить, что очень незначительная часть палеолитических линий древнего населения Якутии сохранилась в генофонде современного населения.

Получены генетические портреты отдельных этносов Якутии и однозначная генетическая оценка по некоторым вопросам этногенеза коренных народов Якутии [5]. В частности, гипотеза о значительном вкладе палеоазиатского населения в генофонд современного якутского этноса не нашла подтверждения, полученные результаты соответствуют традиционным взглядам историков на большой вклад тунгусо-язычных племен. В целом результаты оценки генетических взаимоотношений между популяциями по данным полиморфизма мтДНК и Y-хромосомы свидетельствуют о большей генетической близости популяций якутов к звенкам Якутии и отдаленности якутов от юкагиров.

Проведены оценки уровня генетического разнообразия и степени генетической дифференциации популяций региона в целом. Генофонд популяций Якутии характеризуется низким уровнем различий митохондриального пула ( $F_{st}=1.0\%$ ) и высоким уровнем дифференциации по линиям Y-хромосомы ( $F_{st}=20.7\%$ ). Особенности генетических портретов популяций Якутии по отцовским линиям намного более ярко выражены, чем по материнским. Различия в степени дифференцированности материнского и отцовского генофондов населения Якутии обусловлены эффектом основателя в популяциях якутов и эффектом патрилокальности [5].

Степень генетической подразделенности популяций Якутии по линиям мтДНК ниже, чем во всех остальных регионах Сибири и Средней Азии, несмотря на значительные географические расстояния между изученными популяциями, что определяется, по-видимому, как общностью происхождения народов Якутии, так и достаточно интенсивным потоком генов между популяциями. Уровень генетических различий между популяциями Якутии по разнообразию типов Y-хромосомы ниже, чем в Западной Сибири, и сравним с такими регионами, как Дальний Восток, Южная Сибирь, Чукотка и Камчатка.

Результаты анализа аутосомных локусов (8 Alu-инсерций, CTG-локуса

DMPK-гена) свидетельствуют о выраженности восточноевразийского компонента в популяциях Якутии, что хорошо соответствует данным, полученным по мтДНК и Y-хромосоме [8, 15]. Степень дифференциации между популяциями Якутии по аутосомным локусам намного ниже, чем по линиям Y-хромосомы и более сопоставима с уровнем подразделенности по линиям мтДНК.

Полученные характеристики структуры и формирования генофонда популяций Якутии имеют принципиальное значение для понимания причин накопления некоторых наследственных заболеваний в регионе. В частности, особенности структуры генофонда якутов позволяют предположить, что для наследственных болезней, имеющих редкую частоту возникновения и получивших распространение в популяции, как правило, должен наблюдаться эффект основателя или наличие в генах, ответственных за наследственные болезни, одной мажорной мутации.

Обобщая все вышеизложенное, отметим, что проведенные исследования позволили охарактеризовать структуру генофонда коренного населения Якутии, получить генетические портреты отдельных этносов, определить соотношение западно- и восточноевразийского компонентов, оценить генетические взаимоотношения между популяциями, проследить эволюционные процессы на примере основных типов мтДНК и Y-хромосомы, распространенных в РС(Я), сопоставить генетические реконструкции с историческими данными о происхождении коренных народов Якутии.

## Литература

- Пузырев В.П., Степанов В.А., Голубенко М.В. и др. Линии мтДНК и Y хромосомы в популяции якутов // Генетика. 2003. Т.39. С.975-981
- Степанов В.А., Харьков В.Н., Пузырев В.П. Эволюция и филогеография линий Y-хромосомы человека // Вестник ВОГиС. 2006. Т.10. С.57-73.
- Тарская Л.А., Мелтон П. Сравнительный анализ мтДНК якутов и других азиатских популяций // Генетика. 2006. Т.42. С.1703-1711.
- Федорова С.А., Бермишева М.А., Виллемс Р., Максимова Н.Р., Кононова С.К., Степанова С.К., Куличкин С.С., Хуснутдинова Э.К. Структура генофонда якутов по данным о полиморфизме митохондриальной ДНК // Якутский медицинский журнал. 2003. №1. С.16-21.
- Федорова С.А. Генетические портреты народов Республики Саха (Якутия): анализ линий митохондриальной ДНК и Y-хромосомы. Якутск: Изд-во ЯНЦ СО РАН. 2008. 235 с.
- Федорова С.А., Бермишева М.А., Виллемс Р. и др. Анализ линий митохондриальной ДНК в популяции якутов // Молекулярная биология. 2003. Т.37. №4. С.643-653.
- Федорова С.А., Степанов А.Д., Адоаян М. и др. Анализ линий древней митохондриальной ДНК в Якутии // Там же. - 2008. Т.42. №3. С.445-453.
- Федорова С.А., Хусаинова Р.И., Кутуев И.А. и др. Полиморфизм CTG-повторов гена миотонинпротеинкиназы в популяциях Республики Саха (Якутия) и Средней Азии // Там же. - 2005. Т.39. №3. С.385-393.
- Карает Т.М., Степанов В.А., Медведева О.Ф. Происхождение якутов: анализ гаплотипов Y-хромосомы // Там же. - 2008. Т. 42. С. 226-237.
- Хитринская И.Ю., Степанов В.А., Пузырев В.П. и др. Генетическое своеобразие населения Якутии по данным аутосомных локусов // Там же. - 2003. Т.37. С.234-239.
- Comas D., Plaza S., Wells R.S. et al. Admixture, migrations, and dispersals in Central Asia: evidence from maternal DNA lineages // Eur. J. Hum. Genet. 2004. V.12. P.495-504.
- Derenko M., Malyarchuk B., Grzybowski T. Et al. Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA in Northern Asian populations // Am. J. Hum. Genet. 2007. V.81. P.1025-1041.
- Karafet T.M., Osipova L.P., Gubina M.A. et al. High levels of Y-chromosome differentiation among native Siberian populations and the genetic signature of a boreal hunter-gatherer way of life // Hum. Biol. 2002. V.74. P.761-789.
- Kivisild T., Tolk H.-V., Parik J. et al. The emerging limbs and twigs of the east Asian mtDNA tree // Mol. Biol. Evol. 2002. V.19. P.1737-1751.
- Kutuev I., Khusainova R., Karunas A. et al. From east to west: patterns of genetic diversity of populations living in four Eurasian regions // Human Heredity. 2006. V.61. P.1-9.
- Pakendorf B., Morar B., Tarskaia L.A. et al. Y-chromosomal evidence for a strong reduction in male population size of Yakuts // Hum. Genet. 2002. V.110. P.198-200.
- Pakendorf B., Novgorodov I.N., Osakovskij V.L. et al. Investigating the effects of pre-Historic migrations in Siberia: genetic variation and the origins of Yakuts // Jbid. 2006. V.120. P.334-353.
- Pakendorf B., Wiebe V., Tarskaia L.A. et al. Mitochondrial DNA evidence for admixed origins of Central Siberian populations // Am. J. Phys. Anthropol. 2003. V.120. P.211-224.
- Roots S., Zhivotovsky L.A., Baldovic M. Et al. A counter-clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe // Eur. J. Hum. Genet. 2007. V.15. P.204-211.
- Schurr T.G., Sukernik R.I., Starikovskaya Y.B. et al. Mitochondrial DNA variation in Koryaks and Itel'men: population replacement in the Okhotsk Sea - Bering Sea region during the Neolithic // Am. J. Phys. Anthropol. 1999. V.108. P.1-39.
- Tamm E., Kivisild T., Reidla M. et al. Beringian standstill and spread of Native American founders // PLoS ONE. 2007. Issue 9, e829.
- Volodko N.V., Starikovskaya E.B., Mazunin I.O. et al. Mitochondrial genome diversity in arctic Siberians, with particular reference to the evolutionary History of Beringia and pleistocenic peopling of the Americas // Am. J. Hum. Genet. 2008. V.82. P.1084-1100.
- Yao Y.-G., Kong Q.-P., Wang C.-Y. et al. Different matrilineal contributions to genetic structure of ethnic groups in the Silk Road region in China // Mol. Biol. Evol. 2004. V.21. P.2265-2280.
- Zerjal T., Dashnyam B., Pandya A. et al. Genetic relationships of Asians and Northern Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis // Am. J. Hum. Genet. 1997. V.60. P.1174-1183.
- Zlojutro M., Tarskaia L.A., Sorensen M. Et al. The origin of the Yakut people: evidence from mitochondria DNA diversity // Int. J. Hum. Genet. 2008. V.8. P.119-130.



А.Л. Данилова, Н.Р. Максимова, А.Л. Сухомясова, А.Н. Ноговицына,  
А.Н. Кучер

## ГЕНЕТИКО-ДЕМОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАРОДОНАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК 575.17:599:9с

**Цель исследования.** Изучение генетико-демографической структуры и генетического разнообразия территориальных групп Республики Саха (Якутия).

**Результаты.** Проведено генетико-демографическое исследование 12 населенных пунктов из 8 улусов Республики Саха (Якутия). Установлено, что обследованные населенные пункты различаются по генетико-демографической структуре, особенности которой определяются историей их формирования, национальным составом и уровнем социально-экономического развития региона их локализации.

**Ключевые слова:** генетико-демографическое исследование, миграция, гаметный вклад, фамильная структура.

Genetic-demographic research of 12 settlements from 8 areas Republics Sakhas (Yakutia) is conducted. It is established that the surveyed settlements differ on the genetic-demographic structure which features are defined by History of their formation, national structure and level of social and economic development of region of their localisation.

**Keywords:** Genetic-demographic research, migration, gamete deposit, family structure.

### Введение

Одним из подходов, с помощью которого можно установить значимость факторов популяционной динамики для формирования генетического разнообразия популяций, является генетико-демографический анализ. Генетико-демографические сведения информативны для характеристики популяционной структуры этнотерриториальных групп населения, для объяснения специфичности формирования структуры генофондов [17, 15], а, также и для оценки значимости роли факторов популяционной динамики в формировании величины и структуры генетического груза популяций [2, 11].

На территории Якутии происходили сложные этнические процессы [4, 8]. На протяжении многих лет были характерны небольшая численность популяций, низкая плотность населения и высокий уровень рождаемости, что предполагает значимую роль дрейфа генов как фактора популяционной динамики. Это может способствовать формированию генетической подразделенности этнотерриториальных групп. О генетической гетерогенности населения Якутии свидетельствуют данные о генетическом разнообразии [1], а также результаты изучения распространенности моногенной патологии и врожденных пороков развития [7]. В Якутии имеет место накопление ряда этнически специфических моногенных заболеваний, которые на территории республики распространены неравномерно [5, 9, 12], что поставило

вопрос об актуальности изучения генетико-демографических процессов в этнотерриториальных группах Якутии. Исследования, посвященные генетико-демографическому изучению народонаселения Республики Саха (Якутия), немногочисленны и, как правило, ограничиваются описанием небольшого числа параметров.

**Целью** данного исследования было изучение генетико-демографической структуры и генетического разнообразия территориальных групп Республики Саха (Якутия).

### Материалы исследования

Материалы для исследования были получены в ходе экспедиционных работ в 12 населенных пунктах из 8 улусов РС (Я), различающихся по географическому расположению. Для получения демографической информации использовались данные похозяйственных книг населенных пунктов (с. Харбала-1 Чурапчинского улуса, с. Хомустах Верхневиллюйского, с. Сатагай и с. Кюлякан Виллюйского, с. Кулун-Ельбут и с. Индигирский Момского, с. Жиганск Жиганского, п. Зырянка и с. Нелемное Верхнеколымского, с. Абый и с. Сыганнах Абыйского, с. Олекминский Олекминского улусов), всего собрано информация для более 7097 чел. На основании данных похозяйственных книг получены сведения о половозрастном и национальном составе; по фамильной структуре оценены коэффициент родства по изонимии [16], показатели разнообразия фамилий, случайной изонимии, индекс миграции, показатель разнообразия фамилий [14, 18]. Статистическую обработку данных проводили с использованием общепринятых в популяционно-генетических исследованиях подходов [3].

### Результаты и обсуждение

**Национальный состав и половозрастной состав.** Население сел Хар-

бала-1, Кюлякан, Сатагай, Хомустах, Абый и Сыганнах можно отнести к моноэтническим популяциям, где более 98% - якуты. Населенные пункты Индигирский, Кулун-Ельбут, Жиганск, Зырянка, Нелемное и Олекминский характеризуются смешанным национальным составом. В селах Индигирский и Кулун-Ельбут наибольший процент составляет коренное население: якуты (70%) и эвены (20%). В с. Нелемное 62% населения представлено юкагирами, якуты составляют 21%, пришлое население - 16% (в т.ч. 14% - русские). В с. Жиганск проживают эвенки (48%), якуты (30%) и пришлое население - 21% (в основном русские). В п. Зырянка и в с. Олекминский преобладает русское население (71 и 65% соответственно), а коренное население представлено главным образом якутами (29 и 35% соответственно). Для населенных пунктов Харбала-1, Сатагай, Кюлякан, Хомустах, Индигирский, Кулун-Ельбут и Нелемное характерны высокая доля лиц дорепродуктивного возраста (38-46%) и низкая доля лиц старше 50 лет (12-17% от всего населения) (табл. 1). В Абыйском улусе наблюдается иное соотношение возрастных групп: менее 35% населения приходится на возрастную группу до 20 лет, а лица старше 50 лет составляют около 20%. В населенных пунктах, где проживает коренное и пришлое население (с. Жиганск и п. Зырянка), как для всех жителей, так и для отдельных этнических групп наблюдается преобладание лиц репродуктивного возраста (46-49%) и характерен более высокий средний возраст. В с. Олекминский относительно высока доля лиц дорепродуктивного возраста (37%). Для ряда популяций показано неблагоприятное соотношение полов в группах дорепродуктивного и репродуктивного возрастов (табл. 1), что может привести к сокращению эффективно-репродуктивной численности населения, к распространению

Сотрудники ЯНЦ КМП СО РАМН: **ДАНИЛОВА Анастасия Лукична** – н.с., ana-danilova@yandex.ru, **МАКСИМОВА Надежда Романовна** – к.м.н., гл.н.с., **СУХОМЯСОВА Айтилина Лукична** – к.м.н., зав. МГК РБ №1-НЦМ, зав. лаб., 39-54-94, **НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна** – к.м.н., зав. лаб., 39-54-57; **КУЧЕР Аксана Николаевна** – д.б.н., зав. лаб. НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск).

Таблица 1

Показатели половозрастного состава жителей обследованных населенных пунктов Республики Саха (Якутия)

Населенный пункт	Этническая группа	N	Половозрастной состав, % (♂:♀)		
			<20 лет	21-50 лет	>51 лет
Харбала-1	Якуты	500	41,2(1,00)	45,6 (1,04)	13,2 (0,88)
Сагагай	Якуты	295	44,1 (0,94)	42,0 (1,17)	13,9 (0,86)
Кюлякан	Якуты	443	43,8 (0,92)	43,6 (0,95)	12,6 (0,81)
Хомустах	Якуты	1291	45,9 (1,07)	40,2 (0,88)	13,9 (0,75)
Жиганск	Все	1707	34,6 (0,94)	46,5 (0,86)	18,9 (0,66)
	Якуты	509	29,1 (0,92)	47,9 (0,79)	23,0 (0,63)
	Эвенки	825	39,5 (0,91)	44,5 (0,72)	16,0 (0,54)
	Русские	287	31,7 (1,12)	48,4 (1,32)	19,9 (1,11)
Кулун-Ельбут	Все	279	44,1 (1,08)	40,2 (1,11)	15,8 (0,83)
	Якуты	195	41,3 (0,93)	42,8 (1,10)	15,8 (0,94)
	Эвены	82	52,4 (1,53)	32,9 (1,01)	14,6 (0,50)
Индибирский	Все	437	42,1 (1,14)	36,4 (0,96)	21,5 (0,74)
	Якуты	330	36,9 (1,49)	38,8 (0,97)	24,2 (0,74)
	Эвены	89	57,3 (0,65)	29,2 (1,00)	13,5 (0,50)
Абый	Якуты	434	33,2 (1,00)	47,2 (0,97)	19,6 (0,77)
Сыганнах	Якуты	447	34,9 (0,88)	44,9 (1,07)	20,1 (0,69)
Зырянка	Все	342	28,1 (1,34)	49,7 (0,90)	22,2 (0,43)
	Якуты	78	24,4 (1,00)	46,2 (0,80)	29,5 (0,27)
	Русские	212	30,2 (1,20)	51,9 (0,98)	17,9 (0,52)
Нелемное	Все	268	38,8 (1,31)	43,7 (1,16)	17,5 (1,24)
	Якуты	55	34,6 (1,37)	40,0 (0,69)	25,5 (1,33)
	Юкагиры	165	46,1 (1,24)	40,6 (1,48)	13,3 (0,83)
Олекминский	Все	654	37,2 (0,87)	43,7 (0,93)	19,1 (0,74)
	Якуты	217	37,8 (0,91)	43,3 (0,77)	18,9 (0,77)
	Русские	412	36,6 (0,82)	45,1 (1,00)	18,2 (0,70)

Примечание. N – объем выборки.

межнациональных браков или интенсификации миграционных процессов.

**Характеристика миграционных процессов и гаметного вклада.** В большинстве обследованных популяций жители являются уроженцами тех улусов, где проживают в настоящее время: более 92% в возрастной группе до 20 лет и от 77% (Момский улус) до 89% (Олекминский улус) в возрасте старше 20 лет. Наиболее открыт для миграционного притока Верхнеколымский улус, где развита промышленность, так в возрастной группе старше 20 лет более 52% составляют мигранты (13% - из других улусов, 39% - из-за пределов РС (Я)). Миграционная активность мужчин и женщин для большинства населенных пунктов существенно не различается за исключением Чурапчинского (неместные женщины на 15% регистрировались чаще, чем мужчины) и Жиганского (мигрантов среди мужчин на 11% больше, чем среди женщин) улусов. В возрастной группе до 20 лет все представители коренных национальностей в Жиганском (якуты), Момском (якуты и эвены), Верхнеколымском (якуты, юкагиры) и Олекминском (якуты) улусах являлись уроженцами соответствующих улусов. В возрастной группе старше 20 лет выявлена дифференциация между миграционной активностью как представителей различных национальностей в пределах улусов, так и между

Олекминском улусе 10% якутов были выходцами из других улусов.

Более информативен для оценки влияния миграций на генетическое разнообразие анализ гаметной структуры (мест рождения родителей лиц, проживающих в определенных населенных пунктах). Вклад в структуру генофонда местных гамет в большинстве обследованных улусов для возрастной группы до 20 лет выше, чем группы лиц старше 20 лет. Максимальные различия по доле гамет внутриулусного происхождения между возрастными группами зарегистрированы в Чурапчинском (разница между долей внутриулусных женских гамет составила 29 и 18%), Жиганском (27 и 16% для женских и мужских гамет соответственно), Верхнеколымском (25% для женских гамет) и Верхневилуйском (21% для женских гамет) улусах. Для всех популяций местная женская составляющая преобладает в структуре генофонда, максимальные различия по частоте женских и мужских гамет внутриулусного происхождения зарегистрированы в Жиганском (в возрастной группе до 20 лет – 23%, старше 20 лет – 12%) мужских – и Верхнеколымском (21% для возрастной группы до 20 лет) улусах, а также в селах Чурапчинского и Верхневилуйского улусов (19 и 18% соответственно). Также для большинства улусов характерны внутриулусные миграции, так, в Момском улусе для

якутами, проживающими на различных территориях. В Жиганском улусе 42% якутов являлись выходцами из других улусов РС (Я), тогда как среди эвенков доля мигрантов составила 10%. В Момском улусе среди якутов 24% - это мигранты, а среди эвенов преобладали (90%) местные уроженцы. В Верхнеколымском улусе 66% якутов и 100% юкагиров являлись местными жителями. В

Олекминском улусе 10% якутов были выходцами из других улусов. Более информативен для оценки влияния миграций на генетическое разнообразие анализ гаметной структуры (мест рождения родителей лиц, проживающих в определенных населенных пунктах). Вклад в структуру генофонда местных гамет в большинстве обследованных улусов для возрастной группы до 20 лет выше, чем группы лиц старше 20 лет. Максимальные различия по доле гамет внутриулусного происхождения между возрастными группами зарегистрированы в Чурапчинском (разница между долей внутриулусных женских гамет составила 29 и 18%), Жиганском (27 и 16% для женских и мужских гамет соответственно), Верхнеколымском (25% для женских гамет) и Верхневилуйском (21% для женских гамет) улусах. Для всех популяций местная женская составляющая преобладает в структуре генофонда, максимальные различия по частоте женских и мужских гамет внутриулусного происхождения зарегистрированы в Жиганском (в возрастной группе до 20 лет – 23%, старше 20 лет – 12%) мужских – и Верхнеколымском (21% для возрастной группы до 20 лет) улусах, а также в селах Чурапчинского и Верхневилуйского улусов (19 и 18% соответственно). Также для большинства улусов характерны внутриулусные миграции, так, в Момском улусе для

более 50% индивидов местом рождения и матери, и отца являются населенные пункты данного улуса. Для населенных пунктов Верхнеколымского улуса показана крайне низкая генетическая преемственность в ряду поколений (происходит из обследованного населенного пункта только 5% гамет в возрастной группе старше 20 лет и 30% в группе до 20 лет), а также интенсивный приток гамет из-за пределов РС (Я) (около 40%).

**Фамильная структура.** Для оценки генетического разнообразия были использованы фамилии, которые рассматриваются как квазигенетической маркер [19]. Во всех популяциях имеет место накопление отдельных фамилий, частота самой распространенной фамилии варьирует от 4% в п. Зырянка до 30% в с. Индибирский. Характер накопления фамилий определил величину случайной изонимии: максимальные значения были получены у якутов и эвенов Момского улуса и якутов с. Абый; минимальные – у коренных народов, проживающих в селах Харбала-1, Хомустах и Жиганск. Для пришлого (русского) населения зарегистрированы самые низкие значения случайной изонимии (п. Зырянка, с. Жиганск); только в с. Олекминский как у якутов, так и у русских величины этого показателя были близки по значению (табл.2).

Индекс миграции для большинства этнотерриториальных групп согласуется с данными прямой оценки миграционного притока населения в соответствующие популяции. Исключение составили только юкагиры с. Нелемное и эвены с. Кулун-Ельбут, для которых при незначительном миграционном притоке населения зарегистрированы относительно высокие значения индекса миграции по изонимии. Это может быть связано с «потерей» и «приобретением» фамилий при вступлении в межнациональный брак. Максимальные значения индекса миграций показаны в п. Зырянка для якутов и русских. Это является результатом интенсивных миграционных процессов на данной территории, что согласуется с данными официальной статистики [13]. Показатель избыточности фамилий (R), отражающий степень накопления фамилий в популяциях, оказался минимальным у пришлого населения (с. Жиганск – 20 и п. Зырянка – 17), у коренного населения варьировал от 30 у якутов с. Жиганск до 50 у эвенов с. Индибирский.

Коэффициент родства по изонимии Ri между обследованными населенными пунктами зависел от географичес-

Таблица 2

Показатели, характеризующие популяционное разнообразие, рассчитанные на основании частот фамилий

Населенный пункт	Этническая группа	$N_n$	$N_f$	$I_r$	$v$	$\alpha$	R
Харбала-1	Якуты	500	90	0,02505	0,07944	43,1	34,3
Сагагай	Якуты	295	48	0,04533	0,07163	22,7	39,7
Кюлякан	Якуты	443	48	0,04697	0,04591	21,3	44,5
Хомустах	Якуты	1291	155	0,02126	0,03569	47,8	39,3
Жиганск	Якуты	509	133	0,02311	0,08322	46,2	30,1
	Эвенки	826	131	0,02252	0,05248	45,8	36,4
	Русские	287	107	0,01264	0,27317	283,2	20,5
Кулун-Ельбут	Якуты	196	33	0,07960	0,05929	12,4	43,9
	Эвены	82	17	0,09191	0,12198	11,4	41,5
Индибирский	Якуты	331	53	0,12969	0,02034	6,9	49,4
	Эвены	89	15	0,14228	0,06850	6,5	49,6
Абый	Якуты	434	47	0,07319	0,02924	13,1	48,8
Сыгагнах	Якуты	447	56	0,04006	0,05372	25,4	42,1
Зырянка	Якуты	78	24	0,05950	0,20528	20,2	31,6
	Русские	212	98	0,01397	0,33444	106,5	17,5
Нелемное	Якуты	55	21	0,08231	0,20646	14,3	30,4
	Юокагиры	165	30	0,07107	0,07969	14,3	41,4
Олекминский	Якуты	241	42	0,05903	0,05803	15,0	42,5
	Русские	434	62	0,06699	0,03682	16,6	43,5

Примечание.  $N_n$  – число человек;  $N_f$  – число фамилий;  $I_r$  – случайная изонимия;  $v$  – индекс миграции;  $\alpha$  – показатель разнообразия фамилий; R – показатель избыточности фамилий [18, 14]; \* – расчет проведен для якутов и представителей других национальностей, доля которых незначительна.

ких расстояний и их открытости для миграционного притока населения. Высокие величины коэффициента  $R_i$  наблюдались между этническими группами, проживающими в одном населенном пункте: (между якутами и эвенками с. Индибирский - 0,04727, с. Кулун-Ельбут - 0,01724; между якутами и русскими с. Олекминский - 0,02290); между жителями населенных пунктов одного улуса (с. Сагагай и с. Кюлякан -  $R_i$  равен 0,01051 для всего населения, 0,01041 для якутов, с. Кулун-Ельбут и с. Индибирский -  $R_i = 0,03212$  для всего населения,  $R_i = 0,03738$  для якутов). Более низкий уровень родства по фамильной структуре показан для популяций соседних улусов, так и для популяций северо-восточных улусов ( $R_i = 0,00105$ -0,02848 для всего населения,  $R_i = 0,00200$ -0,05355 для якутов), западных и северо-западных улусов ( $R_i = 0,00508$ -0,00877 для всего населения,  $R_i = 0,00655$ -0,00902 якутов). Еще большие различия по фамильной структуре показаны при сравнении населенных пунктов различной географической локализации: северо-востока и запада ( $R_i = 0,00004$ -0,00421 для всего населения,  $R_i = 0,00016$ -0,00408 для якутов), северо-востока и Центральной Якутии ( $R_i = 0,00024$ -0,00227 для всего населения,  $R_i = 0,00024$ -0,00312 для якутов).

Особое место занимает по фамильной структуре с. Олекминский: несмотря на географическую близость

### Заключение

Проведено генетико-демографическое исследование для 12 населенных пунктов из 8 улусов Якутии различной географической локализации. Установлено, что обследованные популяции различаются по генетико-демографической структуре, особенности которой определяются историей их формирования, национальным составом и уровнем социально-экономического развития региона их локализации. Изученные населенные пункты различаются по национальному составу - выделены четыре группы: моноэтнические якутские популяции; популяции, где проживают якуты и малочисленные коренные народы Севера и популяции, где преобладает пришлое (русское) население, отличающееся по происхождению (п. Зырянка – вновь прибывшие, с. Олекминский - русские старожилы). Особенности национального состава, уровня рождаемости определили различия по половозрастной структуре популяций. Населенные пункты с моноэтническим и смешанным национальным составом, где проживают якуты и малочисленные народы Севера, характеризуются расширенным характером воспроизводства. В популяциях, где проживает коренное и пришлое население, показано сужение основания половозрастной пирамиды, что может свидетельствовать о межэтническом влиянии на репродуктивные установки, как это ранее было показано и для других этничес-

ких групп населения [10, 6]. Уровень социально-экономического развития улусов определяет интенсивность и направленность миграций. Для большинства популяций характерны интенсивные внутриулусные миграции. При анализе вкладного вклада установлено, что вклад мужчин и женщин в свою же популяцию выше младшей возрастной группы, чем старшей. Для всех обследованных популяций вклад местных женщин в свою же популяцию более высок, чем мужчин. Обследованные населенные пункты и этнические группы отличаются по распространенности фамилий, характер накопления которых определяется демографической структурой – высокой рождаемостью, интенсивностью миграционных процессов. Накопление фамилий выявлено в труднодоступных населенных пунктах, что и определило высокие величины индекса изонимии, но низкие показатели миграции и разнообразия фамилий. Для русских с. Жиганск и п. Зырянка получены относительно низкие значения индекса изонимии, наиболее высокие оценки индекса миграции и разнообразия фамилий. Этнические группы в пределах населенных пунктов характеризуются общностью фамилий. Величины коэффициента родства по изонимии зависели от географического расстояния между сравниваемыми группами и интенсивности миграций.

Следует отметить с. Олекминский, где пришлое русское население проживает с XVII в. и рассматривается как старожильческое [13]. Для данной популяции показано сходство по половозрастному составу, особенностям миграционных процессов, фамильной структуры как с коренным населением Олекминского улуса, так и с другими популяциями, где наиболее представлено коренное население.

Следует отметить с. Олекминский, где пришлое русское население проживает с XVII в. и рассматривается как старожильческое [13]. Для данной популяции показано сходство по половозрастному составу, особенностям миграционных процессов, фамильной структуры как с коренным населением Олекминского улуса, так и с другими популяциями, где наиболее представлено коренное население.

Следует отметить с. Олекминский, где пришлое русское население проживает с XVII в. и рассматривается как старожильческое [13]. Для данной популяции показано сходство по половозрастному составу, особенностям миграционных процессов, фамильной структуры как с коренным населением Олекминского улуса, так и с другими популяциями, где наиболее представлено коренное население.

### Литература

1. Генофонд и геногеография народонаселения / Под ред. Ю.Г. Рычкова: Том I. Генофонд населения России и сопредельных стран. – СПб.: Наука, 2000. – 611 с.
2. Гинтер Е.К. Влияние генетической структуры на груз наследственных болезней в русских популяциях // Вестник РАМН. – 1994. - № 9. – С. 69-75.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
4. Гоголев А.И. История Якутии. - Якутск: Изд-во ЯГУ, 2006. – 239 с.
5. Коротов М.Н., Кузьмина З.М. К вопросу о распространении семейно-наследственных заболеваний нервной системы в Республике Саха (Якутия) // Тез. докл. 1-го Рос. съезда мед. генетиков.- Ч.1. - М., 1994. - С. 108.
6. Кучер А.Н., Ондар Э.А., Степанов В.А. и др. Тувинцы: гены, демография, здоровье. - Томск: Из-во «Печатная мануфактура», 2003. - 232 с.
7. Ноговицына А.Н. Отягощенность населения

Республики Саха (Якутия) наследственной патологией и анализ работы региональной медико-генетической консультации: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Томск, 2001. - 24 с.

8. Окладников А.П. История Якутской АССР. М.: Ленинград: Из-во АН СССР, 1957. - Т.II. - 418 с.

9. Платонов Ф.А. Наследственная мозжечковая атаксия в Якутии: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. - Москва, 2003. - 49 с.

10. Пузырев В.П., Эрдыниева Л.С., Кучер А.Н., Назаренко Л.П. Генетико-демографическое исследование населения Тувы. - Томск: STT, 1999. - 256 с.

11. Пузырев В.П., Назаренко Л.П. Генетико-

эпидемиологическое исследование наследственной патологии в Западной Сибири. Томск: Наука. - 2000. - 187 с.

12. Сухомясова А.Л. Аутосомно-доминантная миотоническая дистрофия в Республике Саха (Якутия): Дисс. ... канд. мед. наук. - Томск, 2005. - 189 с.

13. Федорова Е.Н. Населения Якутии: Прошлое и настоящее (геодемографическое исследование). - 2-е изд. - Новосибирск: Наука, 1999. - 207 с.

14. Barrai I., Formica G., Scapoli C. et al. Microevolution in Ferrara - isonymy 1890-1990 // Ann. of Hum. Biol. - 1992. - V. 19. - № 4. - P. 371-385.

15. Carvajal-Carmona L.G., Soto I.D., Pineda N. Stron Amerind/white sex bias and a possible sephardic contribution among the founders of a population in Northwest Colombia // Am. J. Hum. Genet. - 2000. - V. 67. - P. 1287-1295.

16. Lasker G.W. Surnames in the study of human biology // Am. J. Anthropol. - 1977. - V. 82. - P. 525.

17. Lasker G.V., Kaplan B.A. Demography in biological anthropology - human-population structure and evolution // Am. J. Hum. Biol. - 1995. - V. 7. - №4. - P. 425-430.

18. Zei G., Guglielmino C.R., Siri E. et al. Surnames as Neutral alleles: Observations in Sardinia // Hum. Biol. - 1983. - V. 55. - № 2. - P. 357-365.

Е.А. Трифонова, М.Г. Спиридонова, Н.Р. Максимова, А.Н. Ноговицына, В.А. Степанов

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И СТРУКТУРА ГАПЛОТИПОВ ЛОКУСА MTHFR В ЯКУТСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

УДК 575.22

Архитектура неравновесия по сцеплению в геноме человека является в настоящее время предметом интенсивных исследований. В представленной работе изучены генетическая дифференциация и структура неравновесия по сцеплению в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) в популяции якутов в сравнении с выборками европеоидов, китайцев и японцев из проекта HapMap. Показаны частоты аллелей, генотипов и гаплотипов 10 полиморфизмов гена MTHFR (rs2066470, rs17037397, rs4846052, rs1801133 (C677T), rs6541003, rs2066462, rs1801131 (A1298C), rs17375901, rs2274976 (G1793A) и rs1537516) в исследованных группах. Продемонстрирован популяционно-специфический характер структуры неравновесия по сцеплению в гене MTHFR.

**Ключевые слова:** ген метилентетрагидрофолатредуктазы, неравновесие по сцеплению, однонуклеотидный полиморфизм.

The architecture of linkage disequilibrium (LD) in human genome is now the subject of intensive studie. In the present work genetic differentiation and structure of LD in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) was examined in population of Yakuts in comparison with the samples of Caucasians, Chinese and Japanese from HapMap project. In the explored groups we examined haplotype, genotype and allele frequencies at 10 SNPs of MTHFR gene: rs2066470, rs17037397, rs4846052, rs1801133 (C677T), rs6541003, rs2066462, rs1801131 (A1298C), rs17375901, rs2274976 (G1793A) and rs1537516. Population-specific nature of structure of LD in MTHFR gene was demonstrated.

**Keywords:** methylenetetrahydrofolate reductase gene, linkage disequilibrium, single nucleotide polymorphiism.

### Введение

Выявление структуры неравновесия по сцеплению (НС) вносит значительный вклад в изучение генома человека. Последние исследования показали, что человеческий геном организован в дискретные блоки низкого гаплотипического разнообразия, в пределах которых маркеры находятся в состоянии сильного НС. Степень гаплотипического разнообразия и протяженность блоков варьируют в разных популяциях, отражая демографическую историю населения, давление естественного отбора, мутации, и рекомбинации [1]. Тем не менее существуют сведения о согласованности в пространственном размещении некоторых гаплотипических блоков в различных популяциях, указывая на возможность существования общего механизма образования данных блоков [2].

В данном исследовании в качестве локуса для изучения неравновесия по сцеплению в популяциях был выбран

ген метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR). Метилентетрагидрофолатредуктаза - катализатор единственной внутриклеточной реакции образования 5-метилтетрагидрофолата, который необходим для восстановления гомоцистеина до метионина. Снижение активности данного фермента приводит к накоплению гомоцистеина и развитию умеренной гипергомоцистеинемии [3].

### Материалы и методы исследования

В представленной работе обследована выборка якутов из поселка Дюяса (Республика Саха). Изучены 10 полиморфных вариантов гена MTHFR: rs2066470, rs17037397, rs4846052, rs1801133 (C677T), rs6541003, rs2066462, rs1801131 (A1298C), rs17375901, rs2274976 (G1793A) и rs1537516. Данные SNPs равномерно распределены в кодирующей части гена MTHFR [NSBI]. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Про-

дукты амплификации и рестрикции анализировались с помощью электрофореза в 2 или 3 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Искомые бенды визуализировали в ультрафиолетовом трансиллюминаторе. Структура праймеров, условия амплификации и рестрикции для локусов C677T, A1298C, rs17037397, rs4846052, rs1537516, rs17375901, rs2274976 гена MTHFR описаны ранее [4, 5, 6, 7]. Для 3 SNPs: в настоящей работе были подобраны праймеры, условия генотипирования, специфические эндонуклеазы и условия рестрикции (табл.1).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакетов статистических программ «STATistica 7.0», «ARLEQUIN» и «Haploview4.0». Частоты гаплотипов определялись с помощью EM-алгоритма. НС между парами однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) оценивалось

Таблица 1

Исследуемый локус	Праймеры	Температура отжига	Фермент рестрикции
rs2066462	F: 5'-ATTCCAGCCTTGGGTTGA-3' R: 5'-CAAAACCCAGCAACAGTGTC-3'	60°C	BstSI I
rs2066470	F: 5'-GAGGAAACAGCAGCCTCAAC-3' R: 5'-ACCCACTCTGCCTTCTCCTT-3'	60°C	Bpu10 I
rs6541003	F: 5'-ATTCCAGCCTTGGGTTGA-3' R: 5'-CAAAACCCAGCAACAGTGTC-3'	62°C	Erh I

**ТРИФОНОВА Екатерина Александровна** - аспирант, врач-биохимик НИИ медицинской генетики СО РАМН (г.Томск), ekaterina.trifonova@medgenetics.ru; **СПИРИДОНОВА Мария Геннадьевна** - к.б.н., н.с. ГУ НИИ МГ СО РАМН, e-mail: maria.spiridonova@medgenetics.ru; **МАКСИМОВА Надежда Романовна** - к.м.н., гл.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН; **НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна** - к.м.н., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; **СТЕПАНОВ Вадим Анатольевич** - д.б.н., зам. директора по науке ГУ НИИ СО РАМН.

с помощью коэффициента  $D'$ , предложенного Левонтином и коэффициента корреляции  $r^2$  Пирсона. Блочная структура определялась посредством алгоритма «Правило четырех гамет» [8], предусмотренного программным обеспечением «Haploview 4.0».

### Результаты

Частоты аллелей, генотипов и гаплотипов в исследованных группах

Частоты генотипов и аллелей по 10 изученным ОНП представлены в табл.2. В исследованных группах практически по всем изученным локусам выполняется равновесие Харди-Вайнберга, исключение составляет только rs2066470 в популяции якутов.

В исследованных выборках обнаружено 40 гаплотипов из 1024 возмож-

**Таблица 2**

**Распределение генотипов и аллелей изученных полиморфных вариантов гена MTHFR в исследованных выборках**

№	Исследованные SNPs	Частоты, %				
		Генотип, аллель	Якуты (N=81)	Китайцы, (N=45)	Японцы, (N=45)	Европейцы, (N=60)
1	rs2066470	CC	76	82	82	78
		CT	19	16	18	22
		TT	5	2	-	-
		C	86	90	91	89
2	rs17037397	T	14	10	9	11
		AA	3	2	-	-
		AC	17	16	18	12
		CC	80	82	82	88
3	rs4846052	A	11	10	9	6
		C	89	90	91	94
		CC	40	64	67	27
		CT	53	31	31	53
4	rs1801133 (C677T)	TT	7	5	2	20
		C	66	80	82	53
		T	34	20	18	47
		CC	61	27	40	58
5	rs6541003	CT	33	44	47	35
		TT	6	29	13	7
		C	77	71	63	76
		T	23	29	37	24
6	rs2066462	AA	37	64	67	27
		AG	52	31	31	53
		GG	11	5	2	20
		A	63	80	82	53
7	rs1801131 (A1298C)	G	37	20	18	47
		CC	89	82	71	77
		CT	11	16	29	23
		TT	-	2	-	-
8	rs17375901	C	94	90	86	88
		T	6	10	14	12
		AA	46	64	67	42
		AC	48	31	31	45
9	rs2274976 (G1793A)	CC	6	5	2	13
		A	70	80	82	64
		C	30	20	18	36
		CC	94	100	100	88
10	rs1537516	CT	6	-	-	12
		TT	-	-	-	-
		C	97	100	100	94
		T	3	-	-	6
		AA	3	2	-	-
		AG	17	16	18	13
		GG	80	82	82	87
		A	11	10	9	7
		G	89	90	91	93
		CC	80	82	82	80
		CT	17	16	18	20
		TT	3	2	-	-
		C	89	90	91	90
		T	11	10	9	10

Примечание: N – количество индивидуумов в выборке

ных. Наибольшее число гаплотипов (31) выявлено в выборке якутов, наименьшее (4) – в выборке китайцев, в популяциях японцев и европеоидов наблюдались 6 и 10 гаплотипов соответственно.

Гаплотипы, встречающиеся с частотой более 5% обозначены как основные гаплотипы (табл.3). Гаплотипы с частотой менее 1% были исключены из анализа. Всего найдено 6 основных гаплотипов, частоты которых в сумме составляют более 90% наблюдаемых хромосом в выборках европеоидов, китайцев и японцев, и более 70% – в популяции якутов.

### Структура неравновесия по сцеплению в гене MTHFR

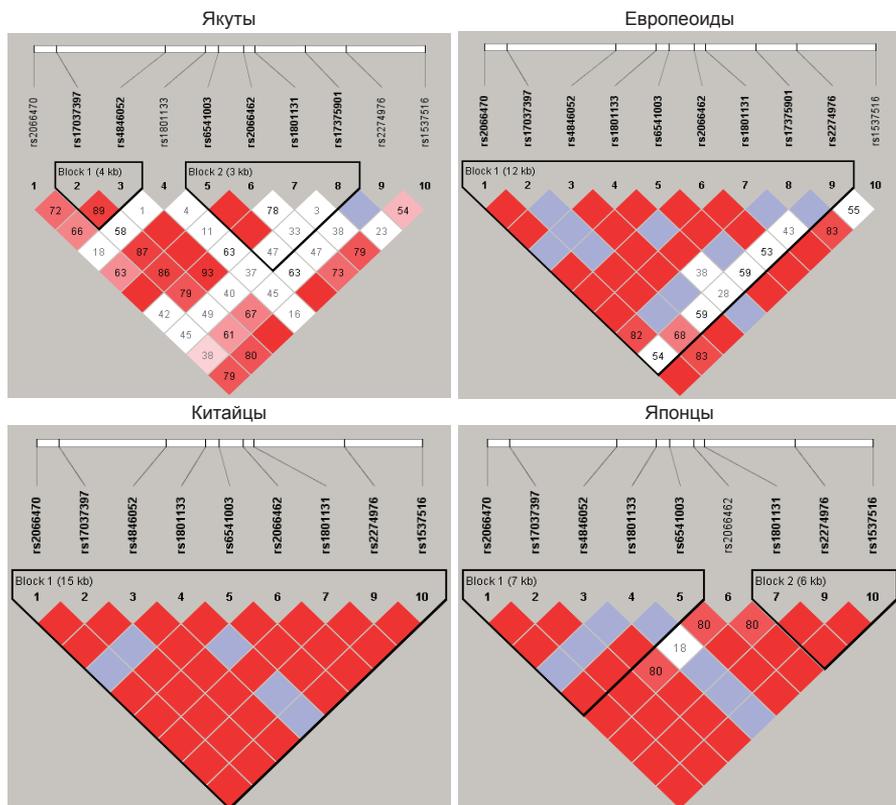
На рисунке показана структура HC между исследованными локусами в четырех популяционных

**Таблица 3**

**Распределение частот гаплотипов гена MTHFR в исследованных выборках**

№	Гаплотип	Частота, %			
		Яку-ты	Ки-тайцы	Япон-цы	Евро-пеоиды
1	<b>CCCCACGCGC</b>	<b>0,466</b>	<b>0,289</b>	<b>0,456</b>	<b>0,293</b>
2	<b>CCCTACACGC</b>	<b>0,110</b>	0,511	<b>0,342</b>	<b>0,225</b>
3	<b>CCTCGCCCGC</b>	0,142	<b>0,100</b>	<b>0,058</b>	<b>0,250</b>
4	<b>TATCGTCCAT</b>	0,029	<b>0,100</b>	<b>0,089</b>	<b>0,042</b>
5	<b>CCTCGCACGC</b>	-	-	-	<b>0,092</b>
6	<b>TCTCGTCTGT</b>	-	-	-	<b>0,050</b>
7	<b>CCCTACACAC</b>	0,012	-	-	0,017
8	<b>CCTCGCACAC</b>	0,013	-	-	0,008
9	<b>CCTCGTCTGC</b>	-	-	-	0,008
10	<b>TATCGTACGT</b>	-	-	-	0,008
11	<b>TATCGTCCGC</b>	-	-	-	0,008
12	<b>CCCTATACGC</b>	-	-	0,025	-
13	<b>CCTCGTCCGC</b>	-	-	0,031	-
14	<b>CATCGCCCAT</b>	0,018	-	-	-
15	<b>CCCCACACAC</b>	0,011	-	-	-
16	<b>CCCCGCCCGC</b>	0,012	-	-	-
17	<b>CCTTGCACGC</b>	0,023	-	-	-
18	<b>CCTTGCCTGC</b>	0,028	-	-	-
19	<b>TATTGCCCGT</b>	0,013	-	-	-
20	<b>TCCTACACGC</b>	0,012	-	-	-
21	<b>TCCCACACGC</b>	0,014	-	-	-
Число наблюдаемых гаплотипов		31	4	6	10

\*Нумерация SNPs: 1–rs2066470, 2–rs17037397, 3–rs4846052, 4 – rs1801133 (C677T), 5 – rs16541003, 6 – rs2066462, 7 – rs1801131 (A1298C), 8 – rs17375901, 9 – rs2274976 (G1793A) и 10 – rs1537516; жирным шрифтом выделены основные гаплотипы.



Структура неравновесия по сцеплению в гене MTHFR в исследованных группах. В ячейках указано значение коэффициента сцепления  $D'$  (пустая ячейка –  $D'=1$ ), цветовая гамма отображает силу сцепления между SNPs: темно-серый – сильное ( $D'=1$ ,  $LOD>2$ ), серый и светло-серый – значительное ( $D'<1$ ,  $LOD>2$ ), белый – слабое ( $D'<1$ ,  $LOD<2$ ). Ячейка светло-серого цвета без указанного значения  $D'$  обозначает невозможность расчета неравновесия по сцеплению вследствие низкой частоты минорного аллеля полиморфизма ( $D'=1$ ,  $LOD<2$ )

выборках. У якутов обнаружено 2 небольших сцепленных блока. Первый, охватывающий примерно 4 т.п.н. в 5'-области гена, включает 2 ОНП (rs17037397 и rs4846052). Второй блок в 3'-области MTHFR длиной около 3 т.п.н. составляют 4 ОНП (rs 654100, rs2066462, rs180113 и rs17375901). В популяции японцев из проекта HarMap также найдено два блока сцепления (1-й блок включает в себя rs2066470, rs17037397, rs4846052, rs1801133 (C677T), и rs16541003; 2-й – 8 - rs17375901, 9 - rs2274976 и 10 - rs1537516). В то же время китайцы демонстрируют тесное сцепление всех 10-и проанализированных в настоящей работе ОНП, формирующих единый блок длиной 15 т.п.н. Также сильное сцепление исследованных локусов наблюдается в выборке европеоидов (выявлен один гаплотипический блок из 9 ОНП).

#### Заключение

Ранее на меньшем количестве маркеров нами была выявлена популяци-

онная специфичность структуры HC гена MTHFR в различных популяциях Евразии [6]. Настоящая работа подтверждает наличие межпопуляционных различий в структуре HC локуса MTHFR. Предполагается, что характеристика HC в геноме человека позволит реконструировать демографическую историю популяций и займет центральное место при картировании генов мультифакториальных заболеваний [9, 10, 11].

*Данная работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 07-04-01629-а).*

#### Литература

1. Трифонова Е.А., Спиридонова М.Г., Степанов В.А. Генетическое разнообразие и структура неравновесия по сцеплению в локусе метилентетрагидрофолатредуктазы // Генетика. – 2008. – № 10. С. 1410-1419.
2. Трифонова Е.А., Спиридонова М.Г., Пузырёв В.П., Степанов В.А. Структура гаплотипов локуса метилентетрагидрофолатредуктазы: популяционная специфичность и ассоциация с коронарным атеросклерозом // Медицинская генетика. – 2009. – № № 1(79) стр. 39-47.
3. Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and

haplotype maps // Bioinformatics. 2005. № 21. P. 263-265.

4. Daly M.J., Rioux J.D., Schaffner S.F., et al. High-resolution haplotype structure in the human genome // Nature genetics. 2001. V. 29. P. 229-232.

5. Friedman G., Goldschmidt N., Friedlander Y. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations // J Nutr. 1999. № 129. P. 1656-1661.

6. Frosst P., Blom H.J., Milos R., et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation methylenetetrahydrofolate reductase // Nat Genet. 1995. № 10. P. 111-113.

7. Gabriel S.B., Schaffner S.F., Nguyen H., et al. The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome // Science. 2002. V. 296. P. 2225-2229.

8. Goyette P., Pai A., Milos R., et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase // Mammalian Genome. 1998. V. 9. P. 652-656.

9. Rana N.A., Ebenezer N.D., Webster A.R., et al. Recombination hotspots and block structure of linkage disequilibrium in the human genome exemplified by detailed analysis of PGM1 on 1p31 // Human Molecular Genetics. 2004. V. 24. P. 3089-3102.

10. Reich D.E., Cargill M., Bolk S., Ireland J., Sabeti P.C. Linkage disequilibrium in the human genome // Nature. 2001. V. 411. P. 199-204.

11. Shifman S., Kuypers J., Kokoris M., et al. Linkage disequilibrium patterns of the human genome across populations // Human Molecular Genetics. 2003. V. 7. P. 771-776.

Л.А. Конева, А.В. Конев, А.Н. Кучер

## ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ СПИНОЦЕРЕБЕЛЛЯРНОЙ АТАКСИИ I ТИПА В СМОДЕЛИРОВАННЫХ ЯКУТСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ

УДК 575.174

**Цель исследования.** Прогнозирование накопления спиноцеребеллярной атаксии I типа (СЦА1) в смоделированных якутских популяциях.

**Материалы и методы.** Разработана компьютерная программа для имитационного моделирования распространения болезней экспансии тринуклеотидных повторов в популяциях человека, которая включает в себя моделирование естественного воспроизводства населения и имитацию накопления динамической мутации в популяции.

**Результаты.** Прогноз накопления заболевания показывает, что для элиминации мутации из популяции за счет сокращения продолжительности жизни больных и снижения у них уровня рождаемости понадобится около 1290 лет. При оказании медико-генетической помощи населению, в результате которой рождаются только потомки без мутации в гене SCA1, в объеме 1% от числа носителей мутантного аллеля на момент 2000 года этот период сокращается до 180 лет.

**Ключевые слова:** спиноцеребеллярная атаксия I типа, имитационное моделирование, прогнозирование заболеваемости СЦА1.

**Aim.** Prediction of prevalence of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) in the simulated Yakut populations.

**Materials and methods.** The computer program for simulation of prevalence of Unstable Triplet Repeat Diseases in human populations which includes modelling natural reproduction of the population and imitation of accumulation of dynamic mutation in a population is developed.

**Results.** The prediction of the disease accumulation shows that it requires 1290 years to eliminate a mutation from population by reducing life expectancy of the patients and decreasing their birthrate. At rendering medical and genetic assistance to the population, which results in the descendants born without a mutation in SCA1 gene in the volume of 1% from the number mutant alleles of the carriers by 2000 this period is reduced to 180 years.

**Keywords:** spinocerebellar ataxia type 1, simulation, prediction of SCA1 prevalence.

#### Введение

В структуре груза наследственной патологии отдельных этнотерриториальных групп населения могут выявляться специфические заболевания, накопление которых является актуаль-

ной проблемой для популяций. Одно из таких заболеваний - спиноцеребеллярная атаксия I типа (СЦА1) - имеет широкое распространение в Республике Саха (Якутия). СЦА1 – тяжелое нейродегенеративное прогрессирующее заболевание с поздним возрастом манифестации, наследуется по аутосомно-доминантному типу. Частота встречаемости СЦА1 в Якутии составляет около 38 случаев на 100 тыс. населения [10], что является самым высоким показателем по распространённости данной патологии в мире (1-2 случая на 100 тыс. населения) [5].

Работа по профилактике СЦА1 в Якутии началась с 90-х гг. 20-го в. В 1995 г. в лаборатории Института здоровья АН РС(Я) был внедрен метод прямой ДНК-диагностики СЦА1, в 2000 г. – в Отделе молекулярной генетики МГК РБН№1-НЦМ МЗ РС(Я) внедрен метод ДНК-тестирования пациентов из семей с СЦА1, и в 2002 г. впервые проведена пренатальная диагностика СЦА1 в отягощенной семье [6]. Актуальным представляется прогноз заболеваемости СЦА1 в якутских популяциях при различном уровне оказания медико-генетической помощи населению.

**КОНЕВА Лада Анатольевна** – м.н.с. НИИ медицинской генетики СО РАМН (Томск), e-mail: lada.koneva@ssmu.ru; **КОНЕВ Артур Валерьевич** – руководитель отдела IT ОАО «Медтехника», e-mail: arty@medtech.tomsknet.ru; **КУЧЕР Аксана Николаевна** – д.б.н., руководитель лаб. НИИ медицинской генетики СО РАМН, e-mail: aksana.kucher@medgenetics.ru.

СЦА1 относится к группе полиглутаминовых болезней; причиной развития патологии является экспансия CAG-повтора в десятом экзоне гена SCA1, картированного в области 6p22-23 [14, 15]. Нормальные аллели этого гена содержат от 6 до 39 CAG-повторов, патологические – от 39 до 82 триплетов [16]. Экспандированные CAG-повторы транскрибируются в протяженный полиглутаминовый тракт, который является токсичным для клетки сам по себе и, кроме того, белок атаксин-1 с удлинённым полиглутаминовым трактом приобретает новые свойства, что приводит к нарушению метаболических связей и, как следствие, к дегенерации нейронов в специфических отделах мозга [5, 15]. Клинические проявления болезни разнообразны, основными из них являются прогрессирующие нарушения координации движения, равновесия, затруднения глотания, мышечная спастичность, когнитивные нарушения. Наблюдается дегенерация мозжечковых структур, атрофия клеток Пуркинье. Возраст начала заболевания и тяжесть проявлений зависят от числа CAG-повторов в гене SCA1.

### Материалы и методы исследования

Для имитационного моделирования распространения СЦА1 в популяциях Якутии была разработана компьютерная программа в среде Borland Delphi 7. Программный комплекс имеет многооконный интерфейс и позволяет генерировать популяции, наблюдать

их эволюцию, работать с отдельными индивидами в моделируемых популяциях, родословными (рис. 1). Для генерации популяций задается исходный размер - число основателей (200 чел. в данной серии итераций), соотношение среди них мужчин и женщин (50:50), возраст поселенцев (20-40 лет), количество носителей мутантного аллеля (3 чел.) и пороговое число триплетов повторов в гене SCA1 у носителей мутации (39 CAG-повторов). Время заселения моделируемых популяций – 1650 год (расселение якутов со средней Лены в другие регионы Якутии происходило в XVII в.). Фамилии и имена индивидам в модели присваиваются случайным образом из прилагаемого к программе файла со списком мужских и женских имен и фамилий и не соответствуют реальным людям. Потомки наследуют фамилию отца. Далее начальная популяция в соответствии с задаваемыми параметрами рождаемости и смертности начинает изменяться. На каждом шаге времени индивиды рождаются, растут, образуют брачные пары, оставляют потомство, заболевают, мигрируют и умирают; кроме этих событий у носителей мутации происходит изменение длины аллеля при передаче его в последующее поколение. При рождении индивида случайным образом, с вероятностью  $\frac{1}{2}$ , задается его пол. Наследование мутантного гена происходит в соответствии с менделевской моделью для аутосомно-доминантного заболевания.

В модели для эволюции популяций использован дискретный алгоритм с шагом в один год. В программе на каждом шаге для каждого индивида с помощью генератора псевдослучайных чисел в зависимости от задаваемых параметров (пол, возраст, количество повторов и т.д.) рассчитывается вероятность наступления на данном шаге итерации одного или нескольких событий: вероятность умереть, заболеть, родить ребенка, мигрировать и т.д. В зависимости от типа события для расчета вероятности используются функции, генерирующие псевдослучайные числа, распределенные как в ходе изучения их популяционно-генетической структуры [8, 9], так и из статистических сборников [2, 3] и работ по демографическим исследованиям [1, 12, 13], а также данные исторической демографии [4, 11]. Генетико-демографическая характеристика семей с СЦА1 и клинико-генетические особенности заболевания были оценены на основе анализа родословных семей больных из Абыйского и Усть-Алданского улусов Республики Саха (Якутия) [7].

### Результаты и обсуждение

Верификацию параметров модели и оценку результатов моделирования проводили на основе анализа данных, полученных в серии смоделированных популяций; это дает интервальные оценки анализируемых показателей, отражающие роль случайных процессов. Для разных периодов «жизни» моделируемых популяций задавали различные демографические параметры, пытаясь имитировать структуру народонаселения реальных популяций Якутии. На ранних этапах эволюции задавали высокий уровень рождаемости и высокий уровень смертности, особенно младенческой. На период войны – низкий уровень рождаемости и высокий уровень смертности для взрослого мужского населения. В послевоенный период – после некоторого повышения уровня рождаемости и смертности постепенно эти показатели снижались.

В серии из 90 смоделированных популяций без миграций и без возникновения мутаций de novo для 8 популяций (около 9%) было показано, что носители мутантного аллеля элиминировались на начальных этапах эволюции за счет случайных процессов.

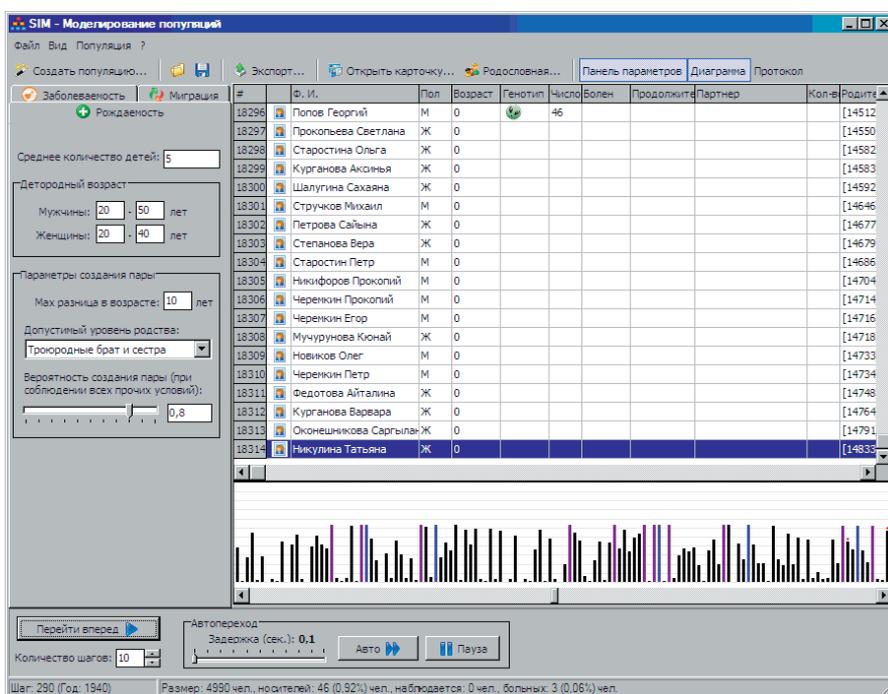


Рис. 1. Основное окно работы программы. Панель параметров «Рождаемость»

**Число лет до исчезновения мутантного аллеля гена SCA1 в моделируемых популяциях при разном уровне оказания медико-генетической помощи населению**

	Без МГК	1% МГК		3% МГК		5% МГК	
		a	b	a	b	a	b
Min	937	97	138	35	82	18	69
Max	1693	242	296	45	100	25	84
Среднее	1289,54	154,11	200,86	40,07	94,21	22,25	78,14

Примечание. a – все носители мутантного гена попали под наблюдение в МГК; b – все носители мутации элиминированы из популяции.

Для оставшихся 82 популяций были получены следующие данные: к 2000 г. (за 350 шагов итерации) популяции достигали размеров в среднем около 8000 чел. (разброс от 3270 до 11885 чел.); среднее число носителей мутации составило 359 чел. (разброс от 50 до 866) и среднее число больных – 57 чел. (разброс от 7 до 164). Реальная численность населения Абыйского и Усть-Алданского улусов в 2000 г. составила 5300 и 22300 чел. соответственно, а распространенность заболевания в 2003 г. – около 1182 и 273 чел. на 100 тыс. населения соответственно [7]. Таким образом, в смоделированных

популяциях демографические показатели (общая численность населения, число больных и носителей мутации) имеют значения, средние для данных по Абыйскому и Усть-Алданскому улусам.

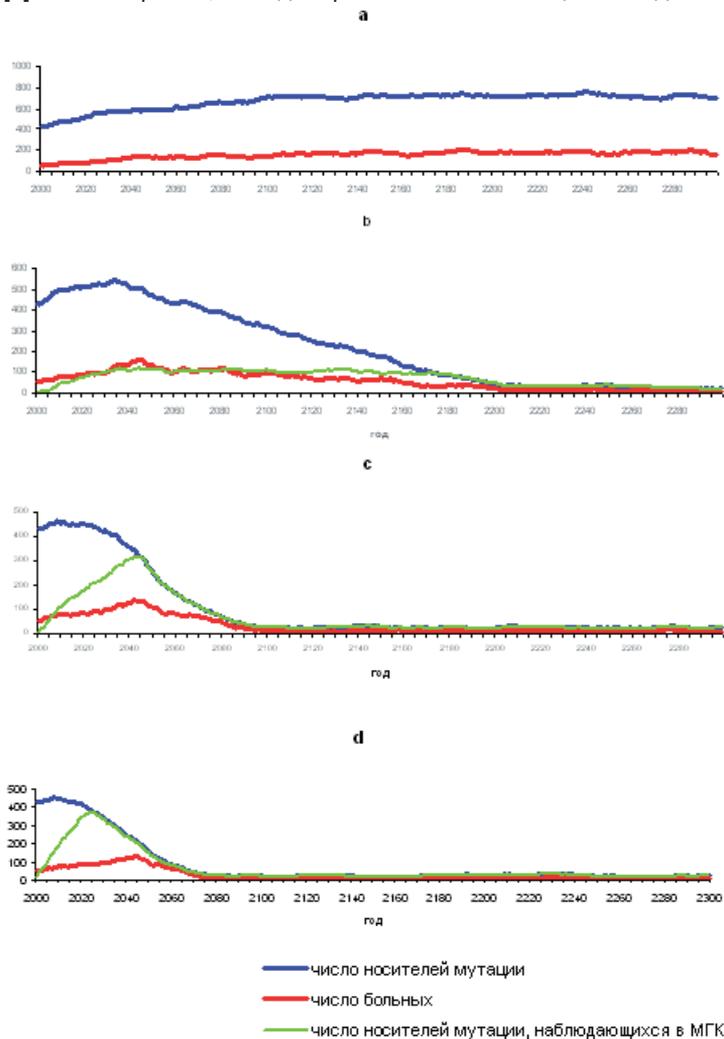
Для прогнозирования влияния медико-генетического консультирования (МГК) на распространенность СЦА1 в моделируемых популяциях начиная с 2000 г. в программе вводили еще один параметр - МГК, т.е. задавали определенный процент носителей мутации, которые проходили «обследование», аналогичное пренатальной или преимплантационной диагностике, в результате чего у

данных лиц рождались только потомки, не несущие мутантного аллеля гена SCA1. В модели рассматривается идеальная ситуация эффективного медико-генетического консультирования, когда носитель мутации и больной в популяции, попавший в поле зрения МГК, остается до конца жизни в этой группе, т.е. в последующие годы жизни при наступлении беременности в его семье рождаются только здоровые дети. В серии из 30 смоделированных популяций при сохранении на весь про-

гнозируемый период времени уровня воспроизводства населения, соответствующего задаваемому на 2000-й г., получили следующие результаты. Временной интервал, необходимый для того, чтобы данная мутация элиминировалась из популяции за счет естественного отбора (сокращения продолжительности жизни у больных с более длинным мутантным аллелем и снижения у них уровня рождаемости), составил около 1290 лет (разброс от 937 до 1693 лет) (таблица).

В случае, когда в семьях носителей мутации рождаются только потомки, не унаследовавшие мутантный аллель гена SCA1, этот период сокращается. Для того, чтобы рассчитать период времени, необходимый для элиминации мутации из популяции при разном уровне оказания медико-генетической помощи, задавали число людей, попадающих под наблюдение в МГК, как процент от числа носителей мутации в 2000 г. При 1%-ном уровне охвата носителей мутации (1% МГК) в среднем через 154 года все они были зарегистрированы в регистре МГК, и через 201 год мутантный ген был элиминирован из популяции. При интенсивности МГК 3% и 5% мутантный аллель гена SCA1 был элиминирован из популяции в среднем через 94 и 78 лет соответственно.

На рис.2 представлен пример динамики числа носителей мутации и больных в течение 300 лет в типичной смоделированной популяции при разном уровне оказания медико-генетической помощи. В данной серии итераций учитывались миграционные процессы. Миграции в модели происходят в соответствии с задаваемым пользователем параметром – долей прибывших и выбывших от общей численности популяции. При этом для эмигрантов вычисляется вероятность выбыть из популяции для каждого индивида на каждом шаге жизни в этой группе, т.е. события происходят с уже «существующими» людьми, а при моделировании иммиграции вычисляется процент прибывших лиц и для них необходимо задать не только долю, но и разброс показателя. Значение параметра для миграций рассчитывали на основе данных о структуре мест рождения жителей Абыйского улуса [9]. В 2000 г. общая численность рассматриваемой типичной популяции составила 4899 чел., носителей мутации – 431 и больных – 53 чел. Таким образом, распространенность больных СЦА1 в этот момент времени в данной смоделированной популяции составила 1081,8 чел. на 100 тыс. населения. За триста про-



**Рис. 2.** Динамика числа носителей мутации и больных СЦА1 в типичной смоделированной популяции за 300 лет при разном уровне оказания медико-генетической

лет при отсутствии медико-генетической помощи численность носителей мутации в данной популяции не только не сократилась, но даже возросла до 700 чел. (рис. 2, а). Введение практики медико-генетического консультирования приводит к заметному снижению распространения СЦА1. При этом в отличие от ситуации без миграций в данном случае некоторое количество носителей мутации ежегодно поступает в популяцию извне, и мы можем лишь оценить время, когда все носители мутантного аллеля попадают под наблюдение в МГК. При 1% МГК все носители мутации были зарегистрированы в МГК через 183 года (1% МГК означает, что ежегодно в регистр МГК попадает около 4 носителей мутации), при 3% МГК – через 49 лет (регистрируется 12 носителей мутации ежегодно), и при 5% МГК – через 28 лет (21 чел. ежегодно) (рис. 2, б, с, д). При 3 и 5% МГК все носители мутантного аллеля были учтены в регистре МГК через относительно непродолжительное время, но такой объем оказания медико-генетической помощи трудно достижим в реальных популяциях.

### Заключение

Рассмотренная серия имитационных экспериментов не противоречит выводу, что высокий уровень заболеваемости СЦА1 в популяциях Якутии может поддерживаться за счет особенностей их демографической структуры. На прогнозируемый период были заданы такие демографические параметры, при которых моделируемые популяции постепенно переходили от расширенного характера воспроизводства населения к простому и, затем, - к суженному. В этом случае элиминация носителей мутации из популяции лишь за счет сокращения продолжительности

жизни больных в последующих поколениях и, соответственно, меньшего числа оставляемых ими потомков-носителей мутации, может происходить в течение очень длительного периода времени, как минимум 37 поколений. Эффективной мерой снижения заболеваемости СЦА1 в популяции является медико-генетическая помощь населению, и результаты имитационного моделирования позволяют планировать необходимый ее объем. В смоделированной популяции, если ежегодно лишь 4 носителя мутации (1% МГК) проходят обследование, аналогичное пренатальной или преимплантационной диагностике, понадобится около 180 лет до момента, когда все носители мутантного аллеля будут учтены в регистре МГК. При наличии миграций ситуация полной элиминации мутации из популяции не достижима, а число носителей мутантного аллеля, остающихся в популяции, зависит от интенсивности миграционных процессов. Таким образом, при планировании работы МГК с реальными популяциями следует проводить работу по профилактике заболеваемости СЦА1 в улусах накопления данной патологии с учетом интенсивности миграционных процессов. В идеальном случае, в МГК должны быть зарегистрированы семьи с СЦА1 не только из улусов накопления, но и из тех популяциях, где случаи заболевания единичны.

### Литература

1. Винокурова Т.З., Федорова Е.Н. Возрастная структура населения Якутии: Геодемографическое исследование. Новосибирск: Наука, 2001. - 148 с.
2. Возрастно-половой состав населения Республики Саха (Якутия) в 2002 году. Часть I. Статистический сборник № 234/6000// Комстат Республики Саха (Якутия). - Якутск, 2003. - 28 с.
3. Возрастно-половой состав населения Республики Саха (Якутия) в 2002 году. Часть II. Статистический сборник № 262/6027// Комстат Рес-

публики Саха (Якутия). - Якутск, 2003. - 75 с.

4. Гоголев А.И. История Якутии (Обзор исторических событий до начала XX в.). Якутск: Изд-во Якутского ун-та, 1999. 201 с.

5. Горбунова В.Н., Савельева-Васильева Е.А., Красильников В.В. Молекулярная неврология (заболевания координаторной, пирамидной и экстрапирамидной систем, болезни экспансии). СПб: «Интермедика», 2002. 364 с.

6. Кононова С.К., Федорова С.А., Коротов М.Н., Сидорова О.Г., Платонов Ф.А. К вопросам профилактики спиноцереbellарной атаксии I-го типа в Якутии // Якутский медицинский журнал. 2003. №1. С. 13-15.

7. Кучер А.Н., Данилова А.Л., Конева Л.А., Максимова Н.Р., Ноговицина А.Н. Генетико-демографическое изучение народонаселения Республики Саха (Якутия) // Там же. 2005. Т.2. №10. С.4-12.

8. Кучер А.Н., Данилова А.Л., Конева Л.А., Ноговицина А.Н., Пузырев В.П. Популяционная структура сельских населенных пунктов Республики Саха (Якутия): национальный и половозрастной состав, витальные статистики // Генетика. 2006. Т. 42. №. X. С. 1718-1726. (Kucher A.N., Danilova A.L., Koneva L.A., Nogovitsina A.N., Puzyrev V.P. Population Structure of Rural Settlements in the Sakha Republic (Yakutia): National, Sex and Age Composition, Vital Statistics // Rus. J. Genetics. 2006. V. 42. № 12. P. 1452-1459).

9. Кучер А.Н., Данилова А.Л., Конева Л.А., Ноговицина А.Н., Пузырев В.П. Популяционная структура сельских населенных пунктов Республики Саха (Якутия): миграционные процессы // Генетика. 2007. Т. 43. №. 5. С. 706-714. (Kucher A.N., Danilova A.L., Koneva L.A., Nogovitsina A.N., Puzyrev V.P. Population Structure of Rural Settlements in the Sakha Republic (Yakutia): Migrations // Rus. J. Genetics. 2007. V. 43. № 5. P. 579-586.).

10. Платонов Ф.А. Наследственная мозжечковая атаксия в Якутии: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. М., 2003. 50 с.

11. Серошевский В.Л. Якуты. Опыт этнографического исследования М., 1993. 736 с.

12. Сукнева С.А., Мостахова Т.С. Демографическое развитие региона: оценка, прогноз, политика. Новосибирск: Наука, 2002. 192 с.

13. Федорова Е.Н. Население Якутии: прошлое и настоящее (геодемографическое исследование). Новосибирск: Наука. Сиб. предприятие РАН, 1999. 207 с.

14. <http://www.ensembl.org>

15. Orr H., Chung M.-Y., Banfi S. et al. Expansion of an unstable trinucleotide GAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1 // Nature Genet. 1993. V. 4. P. 221-226.

16. Zoghbi H. Y., Orr H.T. Pathogenic Mechanisms of a Polyglutamine Mediated Neurodegenerative Disease: SCA1 <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/R800041200v1>

## КЛИНИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА И ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

### Н.И. Капранов, Н.Ю. Каширская, В.Д. Шерман НЕОБХОДИМОСТЬ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ И АДЕКВАТНОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ В РОССИИ

УДК 616.-053.2

Муковисцидоз (МВ) в настоящее время стал национальной приоритет-

**КАПРАНОВ Николай Иванович** – д.м.н., проф., засл. деятель науки РФ, руковод. научно-клинического отдела Медико-генетического научного центра РАМН (г. Москва); **КАШИРСКАЯ Наталья Юрьевна** – д.м.н., проф., вед.н.с. МГ НЦ РАМН; **ШЕРМАН Виктория Давидовна** – к.м.н., врач-педиатр МГ НЦ РАМН, зав. отделением поликлиники ДГКБ №13 им. Н.Ф. Филатова.

ной программой в Российской Федерации. Совершенствование лечебно-реабилитационных режимов способствует постоянному увеличению количества таких больных. Это ведет к трансформации некогда фатальной патологии детского возраста в хроническую болезнь взрослых. По данным J.Dodge, средняя ожидаемая продолжительность жизни больных МВ для рожденных в 2000 г. в Великобритании превысит 50

лет [4]. По данным M. Hodson (2007), имеется 50% вероятности того, что пациенты, достигшие возраста 40 лет, доживут до 53 лет, и 35%-ная вероятность достижения ими 60 лет.

Несмотря на существенные достижения в терапии муковисцидоза, диагностика заболевания все еще остается не на должном уровне. В Российском центре МВ на учете состоит около 2200 больных, а предполагается

мое их число в стране - более 12000. По данным нашего центра (наблюдаются дети до 18 лет), возраст, в котором впервые был установлен диагноз муковисцидоза, колебался от первого дня жизни до 17,5 лет, и в среднем по группе составил 2,54±0,62 года [2]. В Великобритании средний возраст постановки диагноза с 2001 г. составляет 4-5 месяцев жизни, при этом 64% всех вновь диагностированных в 2003 г. составили дети первого года жизни [3].

До настоящего времени сохраняются объективные сложности ранней диагностики заболевания, связанные как с генетической гетерогенностью основного дефекта в гене МВТР (регулятор белка трансмембранной проводимости муковисцидоза), низкой частотой распространенности большинства мутаций, нахождением их преимущественно в компаундном состоянии, так и проблемой проведения потового теста. Генетический полиморфизм заболевания, наряду с влиянием генов-модификаторов, факторов внешней среды (медикаментов, поллютантов, курения и др.) обуславливает выраженное фенотипическое разнообразие форм МВ от тяжелых до субклинических, при последних хлориды потовой жидкости могут быть пограничными и даже нормальными. По нашим данным, среди российских больных (до 18 лет) положительный потовый тест отмечался у 89,2%, пограничные цифры - у 10,3%, а отрицательный потовый тест у 0,5% [2].

У больных МВ в неонатальном периоде течение заболевания может быть малосимптомным или бессимптомным. Обнаружение в 70-е гг. повышенного уровня иммунореактивного трипсина (ИРТ) в плазме крови больных МВ послужило началом массового скрининга новорожденных на данное заболевание [5]. Первым этапом во всех протоколах является определение ИРТ в высушенном пятне крови новорожденного. Повышение в первую неделю жизни в крови ИРТ является весьма чувствительным (85-90%), но не специфичным признаком. Поэтому обязательен второй этап обследования (ретест на ИРТ на 3-4 неделе жизни), позволяющий исключить здоровых детей [6]. Практически во всех протоколах неонатального скрининга в качестве основного этапа используется потовая проба – золотой стандарт прижизненной диагностики МВ. Особое значение потовый тест приобретает в случае неинформативности ДНК-диагностики [7].

В соответствии с рекомендациями

Всемирной организации здравоохранения, при неонатальном скрининге учитываются такие факторы, как тяжесть проявления заболеваний, частота их распространения, а также простота и достоверность применяемых методов диагностики, наличие доступных и эффективных средств лечения. Муковисцидоз не полностью отвечает этим требованиям, тем не менее в развитых странах он включен в перечень наследственных болезней, подлежащих неонатальному скринингу (Франция, Дания, Австрия, Новая Зеландия, Великобритания, США, Австралия, Италия, Испания, Бельгия, Польша, Чехия) [7,8].

С 2006 г. в ряде регионов, а с первого января 2007 г. во всех субъектах Российской Федерации, в рамках национального приоритетного проекта «Здоровье» проводится массовый скрининг новорожденных на муковисцидоз. Как правило, скрининг на МВ интегрируется в уже существующие программы. Так, и в нашей стране МВ, наряду с фенилкетонурией, галактоземией, гипотиреозом и адреногенитальным синдромом, был включен в перечень наследственных заболеваний, подлежащих обязательному неонатальному скринингу. Протокол скрининга на МВ в России включает 4 этапа: ИРТ, повторный ИРТ, потовый тест и ДНК-диагностику, причем только первые три являются обязательными.

Потовая проба - ключевой компонент протокола скрининга на МВ.

В настоящее время в большинстве европейских центров для подтверждения диагноза используют определение концентрации хлоридов в поте биохимическим методом (Гибсон-Кук, 1959), который до сих пор считается золотым стандартом прижизненной диагностики муковисцидоза. Тест позволяет количественно определить концентрацию хлора и натрия в потовой жидкости. У большинства здоровых детей концентрации натрия и хлора в поте не превышают 40 ммоль/л, а нередко не достигают и 20 ммоль/л. В случае пограничных значений (40-60 ммоль/л) требуется повторное проведение потовой пробы. Диагностическими считаются значения, превышающие 60 ммоль/л, хотя у большинства детей, больных муковисцидозом, концентрация хлора оказывается выше 80 ммоль/л.

Сложностью классического теста является его четырехэтапность и необходимость достаточной навески пота, используемой для расчетов. При навесках от 50 до 75 мг увеличивается вероятность получения ложноположи-

тельных результатов, поэтому потовую пробу рекомендуется повторить. Навеска обязательно должна быть отражена в записи результатов потового теста. При соблюдении необходимых условий данный тест позволяет получить точные результаты. Ошибки обычно связаны с такими техническими погрешностями, как недостаточная очистка кожных покровов, неаккуратность при сборе пота, транспортировке и взвешивании фильтров, определении концентрации электролитов. Для избежания ошибок и как следствия – гипо- (до 30%) и гипердиагностики (до 50%) МВ, потовую пробу необходимо проводить в медицинских центрах и лабораториях, в которых накоплен достаточный опыт регулярного проведения таких исследований: не менее 3-4 анализов в неделю. Безусловно, необходимо учитывать как возраст, так и массу тела тестируемого, особенно в случае обследования новорожденных (табл.1).

В последние годы разработаны аппараты, которые позволяют унифицировать методику, упростить и удешевить ее проведение, уменьшить количество пота, необходимое для проведения теста, время его постановки.

В РФ зарегистрированы и успешно применяются две системы для анализа проводимости пота. Система для сбора и анализа пота Макродакт в комплексе с потовым анализатором Sweat-Chek фирмы Вескор (США) позволяет провести потовую пробу вне лаборатории, время сбора пота составляет 30 мин, успешно применяется и у детей первых месяцев жизни. Специально для обследования ново-

Таблица 1

Результативность потовых тестов у новорожденных

Возраст	Кол-во	% успешного сбора пота
Все дети < 35 нед.		
Гестационный возраст < 35 нед.		
35-36 нед.		
> 35 нед.		
Возраст в день пробы 3-7 дней		
8-14 дней		
15-42 дня		
Масса тела в день пробы < 2000 г		
2000-3500 г		
> 3500 г		

Eng W., et al. Presented at: North American Cystic Fibrosis Conference, 2004

рожденных фирмой Вескор был разработан аппарат «Нанодакт», объединяющий в себе систему для стимуляции потоотделения путем электрофореза 1,5 % раствора пилокарпина и анализатор проводимости пота. Для теста необходимо минимальное количество потовой жидкости, всего 3-6 мкл, что делает этот аппарат незаменимым при обследовании новорожденных в рамках массового скрининга. Важно помнить, что проводимость пота определяется совокупностью всех ионов, присутствующих в потовой жидкости (калий, натрий, хлор, бикарбонат, аммоний и др.), и полученный результат превышает истинную концентрацию хлоридов натрия и калия примерно на 15-20 ммоль/л. Таким образом, положительными считаются результаты выше 80 ммоль/л, а показатели 60-80 ммоль/л – пограничными, менее 60 ммоль/л – отрицательные.

При отрицательном результате потовой пробы (менее 40 ммоль/л при классическом методе Гибсона-Кука и/или 60 ммоль/л при работе с потовыми анализаторами) ребенок в течение первого года жизни наблюдается по месту жительства с диагнозом неонатальной гипертрипсиногемии для исключения случаев гиподиагностики.

В случае пограничных результатов потового теста (40-60 ммоль/л – Гибсон-Кук и 60-80 ммоль/л – потовые анализаторы) потовую пробу следует повторить 2-3 раза. Кроме того, целесообразна ДНК-диагностика. Генетическое обследование в РФ в настоящее время осуществляется лишь в ряде регионов. Доступность генодиагностики ограничена еще и высокой стоимостью (ДНК-анализ на 23 мутации гена MBTP, встречающиеся у больных МВ, в России стоит 2500-3000 руб.).

По данным нашей лаборатории (Н.В. Петрова, 2008), в Москве и Московской области удается идентифицировать 83% мутаций (F508del-58,8%, CFTRdela2,3(21kb)-8,8%, W1282X-2,8%, N1303K-1,9%, 3821delT-0,31%, 2143delT-2,2%, 2184insA-1,25%, 3849+10kb-T- 1,25%, G542X- 1,57% и др.).

При положительном результате потовой пробы, а также при обнаружении мутаций гена MBTP (при пограничном результате потовой пробы) ребенку ставится диагноз МВ. В сомнительных случаях могут помочь дополнительные методы обследования (анализ кала на панкреатическую эластазу 1, микроскопическое копрологическое исследование, компьютерная томография или рентгенография органов грудной клетки, посев мазка из зева на микрофлору).

Постановка диагноза МВ, равно как и приглашение семьи для проведения потовой пробы после положительных тестов на ИРТ, является большой психологической проблемой для родителей, особенно когда это касается новорожденных без клинических проявлений заболевания. В странах, где скрининг новорожденных проводится в течение нескольких лет, процедура сообщения результатов обследования родителям отработана до мелочей. Мы считаем эту тактику оправданной и рекомендуем ее внедрение в региональных центрах МВ.

Как подчеркивается в Европейском консенсусе по диагностике и лечению МВ, подробные и щадящие объяснения диагноза следует давать в присутствии обоих родителей, акцентируя внимание на существенное улучшение прогноза, успешных разработках новых методов лечения, необходимости длительного активного диспансерного наблюдения у специалистов регионального (межрегионального) центра МВ [9]. Кроме того, не рекомендуется сообщать о подтверждении диагноза МВ семье накануне выходных или праздничных дней. Следует предоставить номера телефонов, по которым можно обратиться родителям при их беспокойстве и/или в экстренных случаях. В течение первых дней с момента установки диагноза ребенок должен быть детально обследован для оценки общего состояния и тяжести заболевания, после чего необходимо назначить лечение и дать заключение об инвалидности. Особое внимание нужно уделить образованию членов семьи больного МВ. Образовательная программа должна начинаться с подробного обсуждения заболевания, включая патофизиологию вовлеченных органов, осложнения, обоснование терапии, генетические механизмы и прогноз в аспекте возможных вариантов течения и выживаемости. Для получения дополнительной информации следует сообщить родителям адреса соответствующих интернет-сайтов, одновременно заверив их, что специалисты будут готовы и в будущем ответить на любые вопросы. Очень важно подчеркивать готовность сотрудников центра МВ прийти на помощь и их доступность. Стратегию терапии нужно объяснять в оптимистичной манере, подчеркивая успех в предотвращении или, как минимум, замедлении развития осложнений. Также необходимо обсудить в доступной форме текущие и будущие направления научных исследований, что помогает повысить мотивацию и вселяет надежду. В ряде

случаев родителям может потребоваться консультация психолога. Членам семей больных МВ следует предложить обратиться в генетическую службу. Показано проведение потовых проб у сибсов.

Внедрение в последние годы массового скрининга новорожденных в ряде стран Европы свидетельствует о значительном разбросе частоты МВ по странам (табл.2).

По данным МЗ и СР РФ, за 2006-2008 гг. в России было обследовано 3 074 402 новорожденных. Предварительная частота заболевания по России составляет 1 на 11 тыс. новорожденных. Следует отметить, что еще не всем детям с повторными высокими значениями ИРТ проведены потовые пробы, т.к. по разным причинам родители отказываются от данного исследования. Следовательно, истинная частота МВ в России будет уточняться и варьировать по регионам (табл.2).

Европейской ассоциацией МВ создана рабочая группа по неонатальному скринингу, в 2007 г. в нее вошла и Россия. Задачей этой группы является анализ данных разных стран и регионов Европы и оптимизация программ по скринингу.

Результаты скрининга на МВ в России могут быть оценены только через несколько лет. В странах, где скрининг проводится уже около 20 лет (Италия, Франция, Англия), удалось снизить среднюю частоту МВ на 30-50% [10].

Для контроля за состоянием больного МВ, в том числе за новорожденными без клинических проявлений заболевания, необходимо регулярное наблюдение специалистами центра МВ. По нашему мнению, осмотры должны проводиться каждые 2 недели до 3 месяцев жизни ребенка, далее ежемесячно до полугодия, каждые 2 месяца с полу-

Таблица 2

**Частота муковисцидоза по данным неонатального скрининга в Европе (2007 г.)**

Страна	Частота встречаемости на кол-во новорожденных
Западная Чехия	1: 9100
Великобритания	1: 2700 – 1: 2850
Италия	1: 2500 – 1: 5200
Австрия	1: 3500
Испания	1: 4000 – 1: 10500
Франция	1: 4700
Польша	1: 5000
Приморский край	1: 4000
Омская область	1: 6000
Оренбургская область	1: 14 000
Татарстан	1: 8 000
Кемеровская область	1: 11 500
Свердловская область	1: 5500
Астраханская область	1: 6000

года до 1 года и далее ежеквартально. При условии полного комплексного обследования ребенка в условиях специализированного стационара или регионального центра МВ сразу после подтверждения диагноза, в течение последующих месяцев, особенно важно динамическое наблюдение за прибавкой массы тела, результатами копрологического исследования (не менее 1 раза в месяц до 1 года), показателями панкреатической эластазы 1 в стуле (каждые полгода при изначальных нормальных значениях), результатами исследования микрофлоры в посевах мазка из ротоглотки и клиническими анализами крови (1 раз в 3 месяца). В случае манифестации респираторного синдрома, развития обострения бронхолегочного процесса или отсутствия желаемого контроля над симптомами заболевания может потребоваться и дополнительное обследование (рентгенографическое исследование легких или компьютерная томография, липидограмма кала, биохимический анализ крови, протеинограмма и др.).

Классический муковисцидоз характеризуется прогрессирующим бронхолегочным изменением, панкреатической дисфункцией, увеличением хлоридов пота и мужским бесплодием. До 20% новорожденных с МВ имеют меконияльный илеус. Другие диагностируются с иными проявлениями, начиная от периода новорожденности и до взрослого состояния.

Лечение ребенка, больного МВ, нужно начинать сразу после постановки диагноза. Объем терапии зависит от клинических проявлений и результатов лабораторных и инструментальных методов обследования. Всем новорожденным и детям первых месяцев жизни с МВ показана кинезитерапия, независимо от наличия у них признаков бронхолегочного поражения. У грудных детей применяется пассивная техника кинезитерапии, включающая терапевтические положения, контактное дыхание, легкую вибрацию, поглаживания, а также занятия на мяче. На этом этапе очень важен тесный контакт с ребенком, все занятия должны быть приятны малышу. У детей с малейшими симптомами бронхиальной обструкции кинезитерапия применяется в комплексе с муколитическими препаратами и бронходилататорами.

По данным Verhaeghe С. с соавторами из Бельгии, в легочной ткани плодов с МВ отмечено достоверное повышение уровня провоспалительных белков, что говорит о раннем начале воспалительных процессов,

предшествующих развитию инфекции [11]. В связи с этим, как свидетельствуют наши клинические наблюдения и исследования, оправдано раннее назначение Дорназы-альфа, так как у этого препарата наряду с выраженным муколитическим и противомикробным эффектом отмечено противовоспалительное действие, характеризующееся снижением в бронхоальвеолярной жидкости маркеров воспаления (нейтрофильная эластаза, ИЛ-8).

По данным ряда авторов [2, 10], Дорназа-альфа препятствует образованию биофильма вокруг микробных колоний *Ps.aeruginosa*. Таким образом, раннее назначение Дорназы-альфа способствует снижению бактериальной колонизации и инфекции бронхального тракта.

Результаты многолетнего изучения и клинического наблюдения в рамках эпидемиологического исследования (ESCF), проведенного Konstan M. в 2007 г., убедительно показали значительное замедление (на 35%,  $p < 0,001$ ) ежегодного падения ОФВ1 у больных, получавших Дорназу-альфа, тогда как у контрольной группы в возрасте 8-17 лет падение ОФВ1 нарастало ( $p < 0,001$ ), а у взрослых не изменилось.

Клинические наблюдения [1,2,10] и специальные исследования эффективности Дорназы-альфа указывают на улучшение общего состояния, увеличение показателей функции легких, снижение числа обострений хронического бронхолегочного процесса у больных с легким и среднетяжелым течением МВ. Однако, положительная динамика наблюдается не у всех больных, получающих Дорназу-альфа. Ученые из Бельгии, изучая роль ряда факторов, влияющих на лечебный эффект Дорназы-альфа, нашли, что низкое содержание в бронхолегочном секрете  $Mg^{2+}$  и в меньшей степени  $K^{+}$  снижает эффективность Дорназы-альфа [12]. Более того, добавление  $Mg^{2+}$  (прием внутрь) этой группе больных МВ увеличивает эффективность Дорназы-альфа.

Не потерял своего клинического значения и всем хорошо известный муколитик N-ацетилцистеин и амброксол (например, АЦЦ или амброгексал, фирмы Sandoz, группы Но-вартис). Как свидетельствуют работы отечественных и зарубежных авторов, N-ацетилцистеин оказывает наряду с муколитическим выраженное антиоксидантное действие [2,13]. Более того, в связи с разным механизмом действия мы сами, нередко, в период обострения и/или у тяжелых детей с МВ, назначаем

Дорназу-альфа вместе с N-ацетилцистеином и видим синергизм их эффекта.

Всем новорожденным с МВ, имеющим низкую массу тела и/или клинические проявления кишечного синдрома (49%), или низкие значения фекальной Эластазы 1, показана заместительная терапия микросферическими панкреатическими ферментами с pH-чувствительной оболочкой (например Креон, фирмы Солвей Фарма) под контролем ко-программы, частоты и характера стула, ежемесячной прибавки веса. Обязательным является назначение жирорастворимых витаминов [14]. Следует заметить, что в 2009 г. в РФ появится новая, более активная по липазе, форма Креона. Таким образом, на российском рынке будут присутствовать Креон 10 000, Креон 25000 и Креон 40 000.

До настоящего времени открытым остается вопрос о целесообразности профилактического назначения урсодезоксихолевой кислоты (УДХК), в частности препарата Урсосан, фирмы ПроМедПрага.ЦС, для предупреждения и/или замедления формирования цирроза печени. Наши многолетние наблюдения убеждают в необходимости раннего назначения УДХК больным со смешанной формой муковисцидоза.

Очень важным является вопрос о рациональной антибиотикотерапии. Хорошо известно, что больным МВ нецелесообразно часто госпитализироваться по ряду социальных, медицинских, психологических и экономических причин. Поэтому появление ингаляционных эффективных антибиотиков (Брамитоб, фирма КБЭЗИ; ТОБИ, фирма Новартис; Колистин, производитель фирма Грюненталь, дистрибьютер Витафарм) на российском фармацевтическом рынке, безусловно, является прорывом в эффективном лечении первичного высева, интермиттирующей колонизации и хронической *Ps.aeruginosa* инфекции.

В заключение следует отметить, что 2006-2007 гг. в России, безусловно, войдут в историю значимыми государственными решениями вопросов ранней диагностики и лекарственного обеспечения больных МВ всех возрастов. Беспрецедентное решение Правительства РФ и соответствующий Приказ МЗ и СР РФ №185 о включении МВ в Перечень наследственных заболеваний, подлежащих обязательному скринингу новорожденных, следует признать поворотным пунктом в клинической истории ранней диагностики муковисцидоза.

Закон «О внесении изменений в Федеральный закон N 238-ФЗ «О Фе-

деральном бюджете на 2007 год» с последующим распоряжением Правительства РФ N 1328-р утвердил дорназу-альфа как препарат, централизованнокупаемый за счет средств федерального бюджета лекарственных средств, предназначенных для лечения больных муковисцидозом на 2008-2009 гг. Т.е. наиболее дорогостоящий препарат дорназу-альфа будет предоставляться всем больным при наличии диагноза муковисцидоз, вне зависимости от наличия инвалидности. В совокупности с продолжением действия Национальной программы дополнительного лекарственного обеспечения (ДЛО) жизненно важными медикаментами больных МВ создается реальная возможность значительного повышения не только качества, но и средней продолжительности их жизни.

Еще раз хотелось бы подчеркнуть, что для получения ощутимых результа-

тов по улучшению жизни больных МВ, сопоставимых с экономически развитыми странами, необходимо понимание государством важности не только своевременного выявления больных МВ, но и создания необходимых условий для их наблюдения и лечения на всей территории России.

### Литература

- Капранов Н.И. Муковисцидоз – современное состояние проблемы//Ппульмонология 2006, с. 3-11 (приложение по муковисцидозу).
- Муковисцидоз. Современные достижения и актуальные проблемы. Метод. рекомендации. Издание второе (первое 2001) переработанное и дополненное / Капранов Н.И., Каширская Н.Ю., Воронкова А.Ю. и др. М.: 2005. – 109с.;
- Cystic Fibrosis Trust. UK CF Database Annual Data Report 2003. Bromley, UK, 2005.
- Dodge JA, Lewis PA, Stanton M et al. Cystic fibrosis mortality and survival in the United Kingdom, 1947 to 2003// Eur Respir J. 2006 Dec 20.
- Crossley JR, Elliott RB, Smith PA. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the new-born. Lancet 1979;1(8114):472-4.

6. Rock MJ, Mishler EH, Farrell PM et al. Newborn screening for cystic fibrosis is complicated by age-related decline in immunoreactive trypsinogen levels. Pediatrics 1990;85(6):1001-7.

7. Parad RB, Comeau AM, Dorkin HL et al. Sweat testing infants detected by cystic fibrosis newborn screening. J Pediatr 2005;147(3 Suppl):S69-72

8. Wilcken B. Newborn screening for cystic fibrosis: techniques and strategies. J Inher Metab Dis. 2007 Aug;30(4):537-43.

9. Kerem E., Conway S., Elborn S., Hejerman H. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus // Journal of Cystic Fibrosis 4 (2005) 7 – 26.

10. Bush A., Gotz M. Cystic fibrosis// Chapter 15, p. 234-289 In Eur Resp Mon, 2006; 37.

11. Verhaeghe C, Delbecq K, de Leval L, et al. Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus // J Cyst Fibros. 2007 Jul;6(4):304-8.

12. Sanders NN, Franckx H, De Boeck K, et al. Role of magnesium in the failure of rDNase therapy in patients with cystic fibrosis // Thorax. 2006 Nov;61(11):962-8.

13. Smyth A, Elborn J. Exacerbations in cystic fibrosis: 3. Management// Thorax.2008; 63: 180-184.

14. Kosciak RL, Lai HJ, Laxova A. et al. Preventing early, prolonged vitamin E deficiency: an opportunity for better cognitive outcomes via early diagnosis through neonatal screening. J.Pediatr 2005;147(3 Suppl):S51-6.

Н.А. Барашков, Л.У. Джемилева, С.А. Федорова, Ф.М. Терютин, Э.Е. Федотова, А.М. Тазетдинов, С.К. Кононова, А.Л. Сухомясова, Е.Е. Гуринова, С.П. Алексеева, А.Н. Ноговицына, Н.Р. Максимова, Э.К. Хуснутдинова

## НАСЛЕДСТВЕННАЯ НЕСИНДРОМАЛЬНАЯ АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНАЯ ГЛУХОТА В ЯКУТИИ: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И ОПЫТ КОХЛЕАРНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

УДК 616-036.22; 616/618; 61:575

**Цель исследования:** изучение причин возникновения одной из частых моногенных патологий в Республике Саха (Якутия) - наследственной несиндромальной аутосомно-рецессивной глухоты

**Материал и методы:** проведен поиск мутаций в кодирующей области гена GJB2 (коннексин-26) с помощью анализа конформационных полиморфизмов однонуклеотидных фрагментов (SSCP-анализ) с последующим определением нуклеотидной последовательности на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems) у 79 пациентов из 65 неродственных семей с диагнозом «несиндромальная двухсторонняя сенсоневральная тугоухость III-IV степени»

**БАРАШКОВ Николай Алексеевич** – к.б.н., н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН; **ДЖЕМИЛЕВА Лиля Усеиновна** – к.м.н., с.н.с. Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН; **ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна** – д.б.н., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; **ТЕРЮТИН Федор Михайлович** – врач сурдолог-оториноларинголог Сурдологического центра РБ №1 – НЦМ; **ФЕДОТОВА Эльвира Егоровна** – к.м.н., зав. Сурдологическим центром РБ №1 – НЦМ; **ТАЗЕТДИНОВ Андрей Маулетдзянович** – к.б.н., стажер-исследователь Института биохимии и генетики УНЦ РАН; **КОНОНОВА Сардана Кононова** – к.б.н., с.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН; **СУХОМЯСОВА Айтилина Лукична** – к.м.н., зав. МГК РБ №1 – НЦМ; **ГУРИНОВА Елизавета Егоровна** – врач генетик МГК РБ №1 – НЦМ; **АЛЕКСЕЕВА Светлана Петровна** – врач генетик медико-генетической консультации РБ №1 – НЦМ; **НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна** – к.м.н., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; **МАКСИМОВА Надежда Романовна** – к.м.н., гл.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН; **ХУСНУТДИНОВА Эльза КАМИЛЕВНА** – д.б.н., проф., зав. Отделом геномики Института биохимии и генетики УНЦ РАН.

**Результаты.** Спектр мутаций гена GJB2 у больных в Республике Саха (Якутия) представлен пятью рецессивными мутациями - 35delG, V37I, 312-326del14, 333-334delAA, R127H и 3 полиморфными вариантами - V27I, M34T, E114G. В исследованной выборке больных показана этническая неоднородность по спектру и частоте идентифицированных мутаций и полиморфных вариантов. Мутации гена GJB2 выявлены у 50.1% не родственных больных европеоидного происхождения (русские, украинцы, ингуши) и 7.2% - у пациентов якутов. В работе представлен первый отечественный опыт проведения кохлеарной имплантации ребенку с врожденной наследственной несиндромальной аутосомно-рецессивной сенсоневральной потерей слуха обусловленной мутацией 35delG

**Заключение.** Низкий вклад мутаций гена GJB2 в развитие несиндромальной сенсоневральной глухоты в популяции якутов, вероятно, определяется мутациями в других генах, контролирующих процесс звуковосприятия

**Ключевые слова:** глухота, ген GJB2, кохлеарная имплантация, Республика Саха (Якутия)

**Aim of study:** To study the reasons of nonsyndromic sensorineural hearing loss, one of frequent hereditary pathologies in the Republic of Sakha (Yakutia), the search of mutations is conducted in the coding region of GJB2 gene in 79 patients from 65 families with a sensorineural hearing loss of III-IV degree (moderate and profound).

**Results.** In GJB2 gene in patients from the Republic of Sakha (Yakutia) we identified 5 different recessive mutations 35delG, V37I, 312-326del14, 333-334delAA, R127H and three sequences variant V27I, M34T, E114G. In Caucasian patients (Russians, Ukrainians, Ingush) the mutations 35delG (41.7%), 312-326del14 (4.2%), 333-334delAA (4.2%) were found. In Yakut patients with non-syndromic sensorineural hearing loss the mutations 35delG (2.1%), V37I (2.1%), R127H (1.0%) and sequences variants V27I (6.3%), M34T (1.0%), E114G (1.0%) were identified. GJB2 mutations were found in 50.1% Caucasians patients and 7.2% Yakut patients.

**Conclusion.** Low frequency of GJB2 mutations in Yakut individuals with non-syndromic sensorineural hearing loss, can testify to the presence in Yakut population of mutations in other genes, responsible for infringement of sound perception process.

**Keywords:** deafness, GJB2 gene, cochlear implantation, Republic Sakha (Yakutia)

Принятые сокращения: GJB2 (gap-junction B2) - ген коннексина-26, SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) – анализ конформационных полиморфизмов однонитевых фрагментов.

### Введение

В настоящее время известно более 65 генов и около 110 картированных локусов, ответственных за возникновение наследственных форм потери слуха [16]. Среди всех идентифицированных генов наследственной тугоухости наибольшее значение имеет ген GJB2 (коннексин-26), картированный в локусе DFNB1 (13q11-q12) [5, 16]. В настоящее время в гене GJB2 известно более 100 различных мутаций [11]. Наиболее распространенными из них являются рецессивные мутации: делеции - 35delG, 167delT и 235delC и нонсенс замены - R143W, W24X, большинство из которых этноспецифичны [7, 8, 10, 13, 17].

В Республике Саха (Якутия) наследственная сенсоневральная тугоухость является одной из пяти наиболее частых наследственных патологий с распространенностью 6.2 на 10<sup>5</sup> населения наряду с такими частыми моногенными заболеваниями, как спиноцеребеллярная атаксия 1 типа и миотоническая дистрофия Россолимо-Куршмана-Штейнерта-Баттена [4]. В связи с этим, в Якутии актуальным является проведение молекулярно-генетических исследований, направленных на поиск мутаций в генах, контролирующих процесс звуковосприятия.

### Материал и методы

В качестве материала были использованы образцы ДНК 79 пациентов из 65 не родственных семей с диагнозом несиндромальная двухсторонняя сенсоневральная тугоухость (преимущественно III-IV степени) наследственной этиологии, а также образцы ДНК членов их семей (всего 86 человек). Материал для исследования предоставлен Медико-генетической консультацией, Сурдологическим центром Республиканской больницы №1 – Национального центра медицины Республики Саха (Якутия), а также получен в ходе выездов в республиканские специализированные (коррекционные) школы-интернаты для глухих и слабослышащих детей. Все пациенты были осмотрены врачами сурдологами-оториноларингологами и генетиками. Больным были проведены тональные аудиометрические исследования по костному и воздушному проведению,

в некоторых случаях, по показаниям, была проведена импедансометрия и РКТ (рентгеновская компьютерная томография) височных костей. В ходе исследования уточнялись данные об этнической принадлежности больных путем опроса и выяснения национальной принадлежности родителей. Возраст пациентов на момент исследования варьировал от 4 до 22 лет. По этническому составу больные распределились следующим образом: 59 якутов из 48 семей, 11 русских из 10 семей, 1 украинец, 3 ингуша из 1 семьи, 1 эвенк, 1 эвен, 3 метиса - русский/якут из 2 семей, 1 метис (украинец/якут).

Молекулярно-генетический анализ ДНК выделяли из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Исследование образцов ДНК на наличие мутаций и полиморфных вариантов в гене GJB2 проводили методом SSCP-анализа (Single Strand Conformation Polymorphism) с использованием праймеров [7, 8, 18], с последующим определением последовательности нуклеотидов на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems) с помощью набора реагентов Big DYEEnamictm ET terminator cycle sequencing premix kit (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden).

### Результаты и обсуждение

#### Этническая специфичность спектра и частоты мутаций гена GJB2

Молекулярно-генетический анализ кодирующей области гена GJB2 у больных наследственной несиндромальной сенсоневральной тугоухостью позволил идентифицировать пять рецессивных мутаций – 35delG, V37I, 312-326del14, 333-334delAA, R127H и три полиморфных варианта - V27I, M34T, E114G [3].

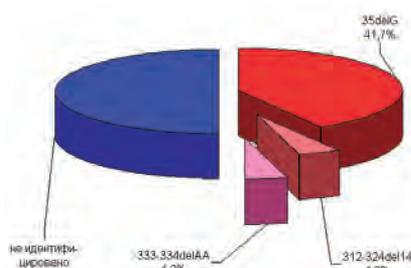
При анализе распределения спектра и частоты, найденных изменений нуклеотидной последовательности у пациентов из представленных этни-

ческих групп были выявлены следующие особенности (Рис. 1). У больных европейского происхождения (русских, украинцев и ингушей) в гене GJB2 идентифицированы три мутации 35delG, 312-326del14 и 333-334delAA с преобладанием мутации 35delG (41.7%), встречающейся с высокой частотой в Европе и Северной Америке [7, 8, 15, 18]. У пациентов якутов были идентифицированы мутации и полиморфные варианты, встречающиеся как в популяциях Азии - V37I, V27I, E114G, R127H [12, 13], так и в популяциях Европы - 35delG, M34T [7, 8, 15, 18]. Мутации V37I, R127H наряду с полиморфными вариантами E114G и V27I обнаружены только у пациентов якутов и не идентифицированы у больных европейского происхождения.

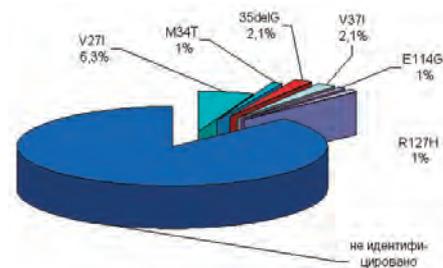
Таким образом, суммарный вклад мутаций гена GJB2 в изученной выборке больных составил 50.1% у не родственных пациентов европейского происхождения и 7.2% у пациентов якутов (Рис.1). Низкий вклад мутаций гена GJB2 в развитие несиндромальной сенсоневральной глухоты в популяции якутов, вероятно, определяется мутациями в других генах, контролирующих процесс звуковосприятия. Более подробно спектр и частота мутаций гена GJB2 рассмотрены ранее [1, 3].

#### Кохлеарная имплантация ребенку с мутацией 35delG гена GJB2

Поскольку врожденные дефекты органов слуха в настоящее время не поддаются лечению, а реабилитация и абилитация таких детей возможна лишь с помощью слухопротезирования и длительной педагогической коррекции, в настоящем разделе представлены результаты кохлеарной имплантации ребенку с врожденной сенсоневральной глухотой, обусловленной мутацией 35delG. Одному пациенту, участвовавшему в молекулярно-генетическом исследовании в возрасте 2 г. 7 мес. на базе ФГУ «Российский научно-практический центр аудиологии и слухопро-

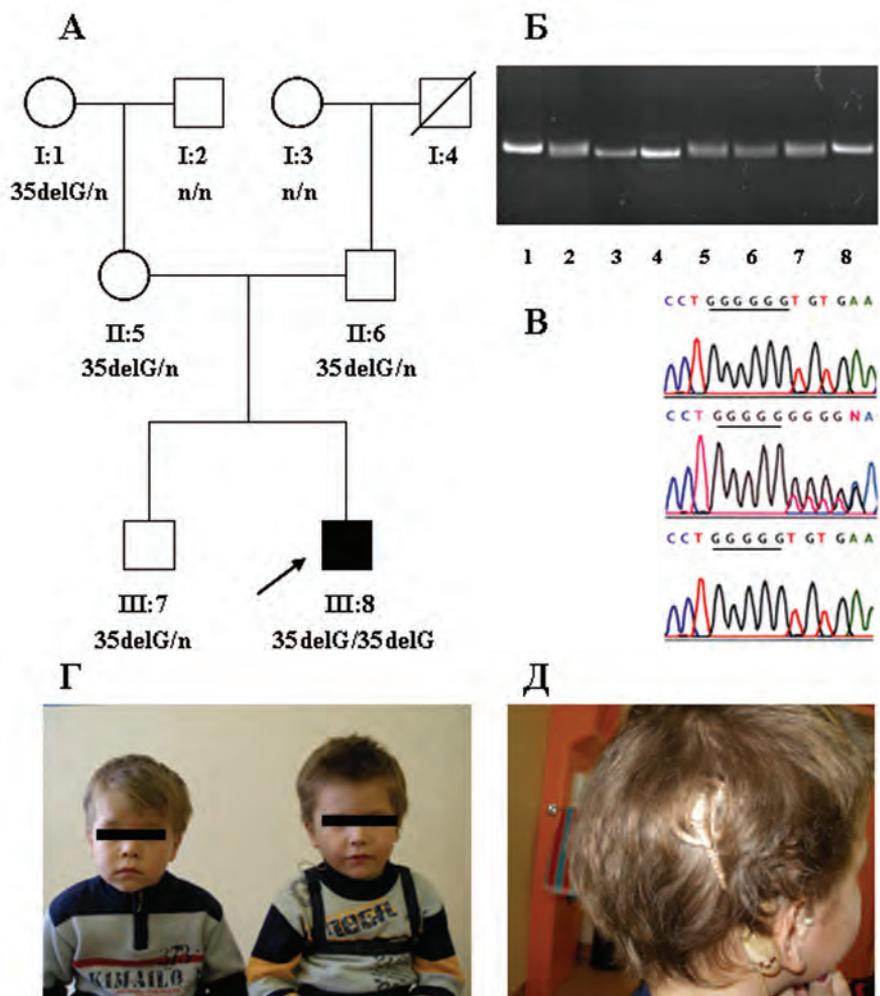


Спектр и частота мутаций гена GJB2 у пациентов европейского происхождения (русские, украинцы, ингуши) N=12



Спектр и частота мутаций и полиморфных вариантов гена GJB2 у пациентов якутов N=48

Рис. 1



**Рис.2.** Кохлеарная имплантация ребенку, гомозиготному по мутации 35delG в гене GJB2 (коннексин 26).

А) Фрагмент родословной семьи Б. Гетерозиготные носители мутации обозначены 35delG/n, гомозигота (пробанд, показан стрелкой) - 35delG/35delG, норма - n/n. Б) Детекция мутации 35delG в 10%-ном полиакриламидном геле. Дорожки 1 (I:2) и 8 (I:3) - образцы n/n, 2 (I:1), 5 (II:5) 6 (II:6), 7 (III:7) - гетерозиготы 35delG/n, 3 (III:8) - гомозигота 35delG/35delG, 4 - контрольный образец с генотипом 35delG/35delG. В) Секвенирование гена GJB2: сверху - норма n/n, в центре - гетерозигота 35delG/n, внизу - гомозигота 35delG/35delG. Г) Фотография братьев Б. Слева - старший брат с нормальным слухом (генотип 35delG/n); справа - пациент с имплантом (генотип 35delG/35delG). Д) Фото пациента с кохлеарным имплантом «Nucleus 24».

тезирования» (г. Москва) проведена кохлеарная имплантация системой «Nucleus 24». Имплант впервые включен через 1 месяц после операции, активировано 16 электродов, процессор настроен на 4 различные программы. По данным акуметрии в настоящее время с включенным имплантом пациент различает шепотную речь справа около уха и разговорную речь справа с 6 м. Течение послеоперационного периода без особенностей [2].

По результатам молекулярно-генетического исследования у данного пациента была идентифицирована мутация 35delG в гомозиготном состоянии; у родителей, бабушки и брата - в гетерозиготном (Рис. 2). В настоящее

время многими исследователями высказывается мнение, что наилучшими кандидатами для кохлеарной имплантации являются индивиды, у которых потеря слуха обусловлена мутациями в гене GJB2 [6, 9, 14]. Наличие мутаций гена GJB2 выявляется у значительной части пациентов (до 30%), прошедших кохлеарную имплантацию [6, 9], что может свидетельствовать о том, что критерии оптимального отбора пациентов для кохлеарной имплантации наиболее эффективны именно для этой группы пациентов [14]. В свою очередь, оптимальный отбор кандидатов для проведения кохлеарной имплантации будет способствовать их более успешной абилитации.

Авторы выражают искреннюю признательность старшему научному сотруднику лаборатории рекомбинационного и сегрегационного анализа Института цитологии и генетики СО РАН к.б.н. О.Л. Посух (г. Новосибирск) и директору ФГУ Российского научно-практического центра аудиологии и слухопротезирования д.м.н., профессору Г.А. Таварткиладзе (г. Москва) за оказанную научно-методическую помощь.

Работа выполнена при частичном финансировании из грантов РФФИ (08-04-90730 моб\_ст), РФФИ (09-04-94323-а), РФФИ (09-04-09288 моб\_з), РГНФ (08-06-84602а/У), МК-2575.2008.4 и Президента Республики Саха (Якутия) в области здравоохранения и медицинской науки (№ 327РП).

#### Литература

1. Анализ локуса Cx26AU гена GJB2 у больных наследственной несиндромальной нейросенсорной глухотой в Республике Саха (Якутия) / Н.А. Барашков [и др] // Якутский медицинский журнал. - 2006. Т.№2. - №14. - С.11-15.
2. Кохлеарная имплантация у ребенка с врожденной сенсоневральной глухотой, обусловленной мутацией 35delG в гене GJB2 (коннексин 26) / Ф.М. Терютин [и др] // Вестник оторинолар. - 2009. - №2. - С.17-19.
3. Мутации гена коннексина 26 (GJB2) у больных наследственной несиндромальной сенсоневральной тугоухостью в Республике Саха (Якутия) / Н.А. Барашков [и др] // Вестник оторинолар. - 2008. - №5. - С.21-28.
4. Структура и разнообразие наследственной патологии в Республике Саха (Якутия). Л.А. Тарская [и др] // Генетика. - 2004. - 40. - С.1530-1539.
5. Assignment of connexin 26 (GJB2) and 46 (GJA3) genes to human chromosomes 13q11-q12 and mouse chromosome 14D1-E1 by in situ hybridization. / C. Mignon [et al] // Cytogenet. Cell. Genet. - 1996. - 72. - P.185-186.
6. Auditory responses in cochlear implant users with and without GJB2 deafness / E.J. Probst [et al] // Laryngoscope. - 2006. - 116(2). - P.317-327.
7. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterranean / L. Zelante [et al] // Hum. Mol. Genet. - 1997. - 6. - P.1605-1609.
8. Connexin 26 mutations in hereditary nonsyndromic sensorineural deafness / D.P. Kelsell [et al] // Nature. - 1997. - 387. - P.80-83.
9. Connexin 26 (GJB2) gene-related deafness and speech intelligibility after cochlear implantation / A.R. Sinnathuray [et al] // Otol. Neurotol. - 2004. - 25(6). - P.935-942.
10. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa / G. Brobby [et al] // N. Engl. J. Med. - 1998. - № 19. - Vol. 338(8). - P. 548-550.
11. Connexins and deafness Homepage. / E. Ballana [et al] // World wide web URL. <http://www.crg.es/deafness>.
12. Contribution of connexin26 (GJB2) mutations and founder of non-syndromic hearing loss in India / M. RamShankar [et al] // J. Med. Genet. - 2003. - 40. - P.1-6.
13. GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent

founder mutation / A. Ohtsuka [et al] // Hum. Genet. – 2003. – 112. – P.329-333.

14. GJB2 gene mutations in cochlear implant recipients: prevalence and impact on outcome / L.R. Lustig [et al] // Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg. – 2004. – 130(5). – P.541-546.

15. High carrier frequency of the 35delG deafness

mutation in European populations / P. Gasparini [et al] // Eur. J. Hum. Genet. – 2000. – 8. – P.19-23.

16. Morton C. Newborn Hearing Screening – A Silent Revolution / C. Morton, W.C. Nance // The New England Journal of Medicine. – 2006. – 354. – P.2151-2164.

17. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2)

among Ashkenazi Jews with non-syndromic recessive deafness / R.J. Morell [et al] // Nat. Engl. J. Med. – 1998. – 339. – P.1500-1505.

18. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss / P.M. Kelley [et al] // Am. J. Hum. Genet. – 1998. – 62. – P.792-799.

И.А. Николаева, М.Н. Коротов, Е.Е. Гуринова, С.К. Степанова,  
Н.Р. Максимова, А.Л. Сухомясова, А.Н. Ноговицына

## НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК 616.8-575.17

По данным Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии Республики Саха (Якутия) с 2001 по 2008 г. всего диагностировано 26 форм моногенной наследственной патологии нервной системы, из них 16 – у детского населения. Преобладают аутосомно-доминантные НБНС. Наиболее широкий спектр различных нозологических форм представлен в группе нервно-мышечных заболеваний.

**Ключевые слова:** наследственные болезни нервной системы, медико-генетическое консультирование, ДНК – диагностика.

According to the Republican genetic register of a hereditary and congenital pathology of Republic Sakha (Yakutia) from 2001 to 2008 26 forms of a monogenic hereditary pathology of nervous system are diagnosed in total, from them 16 - in the children's population. Autosomal dominant HINS prevail. The widest spectrum of various nosological forms is presented in group of nervous-muscular diseases.

**Keywords:** hereditary illnesses of nervous system, medical-genetic consultation, DNA-diagnostics.

Перечень моногенных наследственных болезней нервной системы (НБНС) включает более 350 форм [2]. Однако большинство из них встречается редко. По результатам генетико-эпидемиологических исследований, наследственная патология в якутской популяции отличается высоким разнообразием и территориальной гетерогенностью в распределении [3,4]. Ведущее место в структуре генетической патологии в Республике Саха (Якутия) занимают наследственные болезни нервной системы [5]. Наиболее распространены из них спинально-бульбарная амиотрофия I типа (СЦА1), миотоническая дистрофия (МД), окулофарингеальная миодистрофия (ОФМД). Распространенность СЦА1 составляет от 43,8 до 243,2 на 100 тыс. якутского населения, одним из мест накопления больных СЦА1 является центральная (Лено-Алданское междуречье) и северная группа улусов (бассейн реки Индигирки) [7]. Миотоническая дистрофия встречается с частотой 21,3 на 100 тыс. среди якутского населения с преимущественным накоплением в вилюйской и центральной группе улусов [8]. Высокое накопление

окулофарингеальной миодистрофии наблюдается также в центральных улусах, преимущественно в Усть-Алданском, при этом у всех больных якутов выявляется одинаковое увеличение GCG – повторов (до 10) в гене PAPB2 [6]. Современные молекулярно-генетические технологии в диагностике наследственных заболеваний помогают уточнить генетическую причину большого числа нозологических форм наследственных болезней нервной системы. Определение локализации генов, расшифровка типа мутаций позволяют проводить точную диагностику отдельных генетических вариантов, осуществлять пренатальную диагностику, выявлять гетерозиготное носительство.

**Целью** данной работы являлось изучение спектра и частоты отдельных форм наследственных болезней нервной системы в Республике Саха (Якутия).

### Материал и методы исследования

Материал получен в ходе обследования больных в медико-генетической консультации РБ№1 - НЦМ и экспедиционных выездов отдела молекулярной генетики Якутского научного центра КМП СО РАМН в улусы и города РС(Я) (Вилюйский, Сунтарский, Ленский, Олекминский, Амгинский, Чурапчинский, Усть-Алданский, Горный, Абыйский, Верхнеколымский, г.Мирный, г.Нерюнгри, г.Алдан) в период 2001-2008гг. Диагноз НБНС основывался на анализе родословной, общепринятых клинических критериях (клинико-фенотипических признаках),

а также данных ряда дополнительных исследований, таких как электрокардиография, эхокардиография, электромиография, электроэнцефалография, магнитно-резонансная томография головного и спинного мозга, определение степени увеличения активности некоторых ферментов в сыворотке крови. Молекулярно-генетическая диагностика (СЦА1, МД, ОФМД, невральной амиотрофии Шарко-Мари-Тус 1А типа, спинальной амиотрофии Верднига-Гофмана, спинально-бульбарной амиотрофии Кеннеди, атаксии Фридрейха), биохимическая диагностика (болезни Вильсона-Коновалова) осуществлялись в лаборатории медико-генетической консультации РБ№1-НЦМ, молекулярно-генетическая диагностика хорей Гентингтона и дентаторубро-паллидолюсисовой атрофии проведена в НИИ мозга Университета Ниигаты (Япония).

### Результаты исследования и обсуждение

По данным Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии Республики Саха (Якутия) с 2001 по 2008 г. проконсультировано 593 больных с НБНС из 349 семей. Всего диагностировано 26 форм моногенной наследственной патологии нервной системы, из них 16 – у детского населения (таблица).

Нервно-мышечные болезни занимают первое место по частоте в Республике Саха (Якутия) среди всех наследственных моногенных неврологических заболеваний, как и во всем мире [1]. Всего на наблюдении в МГК состоят 312 больных с нервно-мышечной патологией из 206 семей. В данную группу

Сотрудники ОМГ ЯНЦ КМП СО РАМН:  
**НИКОЛАЕВА Ирина Аверьевна** – н.с.,  
nia0505@rambler.ru, **КОРОТОВ Мефодий Николаевич** – врач невролог высшей квалификационной категории, н.с., **ГУРИНОВА Елизавета Егоровна** – врач-генетик МГК Перинатального центра РБ№1-НЦМ, н.с., **СТЕПАНОВА Светлана Кимовна** – биолог МГК ПЦ РБ№1-НЦМ, н.с., **МАКСИМОВА Надежда Романовна** – к.м.н., гл.н.с., **СУХОМЯСОВА Айтиалина Лукична** – к.м.н., зав. МГК, зав. лаб., **НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна** – к.м.н., врач-генетик МГК, зав. лаб.

**Наследственные заболевания нервной системы по данным Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии РС(Я)**

№	Нозология	ОМIM	Тип наследования	Всего	
				Больных	Семей
<b>Наследственные атаксии</b>					
1	Спиноцеребеллярная атаксия I типа	164400	АД	147	33
2	Атаксия Фридрейха	229300	АР	12	12
3	Денторубро-паллидолюисова атрофия	125370	АД	2	1
	<b>Всего</b>			<b>161</b>	<b>46</b>
<b>Наследственные нервно-мышечные заболевания</b>					
1	Миотоническая дистрофия Россолимо-Куршманна-Штейнерга-Баттена	160900	АД	114	51
2	Окулофарингеальная миодистрофия	164300	АД	50	45
3	Наследственная мотосенсорная невропатия, болезнь Шарко-Мари-Тус	118200	АД	37	22
4	Наследственная мотосенсорная невропатия, болезнь Шарко – Мари-Тус	214400	АР	49	47
5	Мышечная дистрофия, тип Дюшенна/Беккера	310200	ХР	24	18
6	Миотония Томсена	160800	АД	18	7
7	Спинально-бульбарная амиотрофия Кеннеди	313200	ХР	6	4
8	Спинальная амиотрофия Верднига-Гоффмана	253300	АР	2	2
9	Миопатия Эрба	253600	АР	4	2
10	Пароксизмальная миоплегия	170400	АД	2	2
11	Миодистрофия Эмери-Дрейфуса	310300	ХР	2	2
12	Наследственная мотосенсорная невропатия Руси-Левы	180800	АД	2	2
13	Спинальная амиотрофия Кугельбера-Веландера	253400	АР	1	1
14	Рефсума синдром	266500	АР	1	1
	<b>Всего</b>			<b>312</b>	<b>206</b>
<b>Наследственные паралигии</b>					
1	Параплегия спастическая семейная (болезнь Штрюмпелля)	270800	АД, АР	12	8
	<b>Всего</b>			<b>12</b>	<b>8</b>
<b>Наследственные заболевания с преимущественным вовлечением экстрапирамидной системы</b>					
1	Болезнь Вильсона-Коновалова	277900	АР	4	2
2	Хорея Гентингтона	143100	АД	1	1
3	Болезнь Паркинсона	601508	АД	8	8
4	Эссенциальный тремор	190300 602134	АД	3	3
	<b>Всего</b>			<b>16</b>	<b>16</b>
<b>Прочие наследственные моногенные заболевания</b>					
<b>Факоматозы</b>					
1	Нейрофиброматоз	162200	АД	78	59
2	Туберозный склероз	191100	АД	5	5
<b>Лейкодистрофии</b>					
1	Лейкодистрофия	202370 271900	АД, АР	7	7
<b>Митохондриальные энцефалопатии</b>					
1	MELAS синдром	540000	АР	2	2
	<b>Всего</b>			<b>92</b>	<b>73</b>

Примечание. ОМIM - номер менделирующего заболевания по каталогу МакКьюсика; АД – аутосомно-доминантный тип наследования; АР – аутосомно-рецессивный тип наследования; ХР – Х-сцепленный тип наследования.

заболеваний входят 14 форм НБНС. Группа миотоний в Якутии представлена двумя формами. В таблице приведены данные о 114 консультированных в МГК РБ№1-НЦМ больных из 51 семьи с подтвержденным молекулярно-генетическими методами диагнозом, из которых 111 больных – из 49 якутских семей. Распространенность МД среди всего населения составила 10,3 на 100 тыс. населения, среди якутов – 21,3, среди русских – 0,8 на 100 тыс. чел. [8]. Миотония Томсена диагностирована у 18 больных, в том числе у четырех детей.

Следующим по частоте заболеванием является окулофарингеальная миодистрофия (50 больных из 45 семей, из них 48 больных из 43 якутских семей). Распространенность окулофарингеальной миодистрофии в Республике Саха (Якутия) составляет 5,3 на

100 тыс. населения, среди якутов – 11,1 на 100 тыс. якутского населения. Наблюдается накопление заболевания в Центральной Якутии - Усть-Алданском, Намском, Нюрбинском улусах и г. Якутске [6]. В МГК молекулярно-генетическая диагностика ОФМД внедрена с 2007 г.

Из наследственных мото-сенсорных невропатий одной из самых распространенных форм является нервальная амиотрофия Шарко-Мари-Тус, данный диагноз был выставлен 86 больным. В семьях наблюдаются аутосомно-доминантный и аутосомно-рецессивный типы наследования, клиническая гетерогенность, вариабельность возраста начала заболевания. Дупликации в 4 и (или) 5 экзонах гена PMP22 при проведении ДНК диагностики обнаружены только у 29 больных, подтверждая 1А тип заболевания. Прогрессирующие

мышечные дистрофии представлены четырьмя формами, большая часть которых приходится на миодистрофию Дюшенна. Нами было клинически диагностировано 24 случая миодистрофии Дюшенна. При ДНК-диагностике наличие делеции в гене дистрофина обнаружено у 4 больных. С диагнозом миодистрофия Беккера наблюдается один ребенок. Миодистрофия Эмери-Дрейфуса диагностирована у двоих больных. Конечностно-поястная форма миопатии Эрба выявлена у 4 больных из двух семей.

Спинально-бульбарная амиотрофия Кеннеди – редкое Х-сцепленное рецессивное наследственное заболевание, проявляющееся у мужчин в позднем возрасте. В республике болезнь Кеннеди встречается только среди якутского населения. Распространенность болезни среди якутов мужчин составила 2,8 на 100 тыс. якутов, что сопоставимо с мировыми данными (2,5 на 100 тыс. нас.). Молекулярно-генетическими методами установлено, что причиной развития спинально-бульбарной амиотрофии Кеннеди у всех больных якутов является увеличение числа CAG - повторов в гене AR.

Спинальная амиотрофия Верднига-Гоффмана была выявлена у 5 детей. Для подтверждения диагноза в лаборатории МГК проводится ДНК-диагностика на выявление частых мутаций в 7 и 8 экзонах гена SMN с 2006 г. В 3 случаях из них заболевание закончилось летальным исходом в раннем периоде жизни.

Один ребенок наблюдается со спинальной амиотрофией Кугельбера-Веландера. Так называемый синдром Руси-Левы диагностирован у двоих пациентов, в том числе у одного ребенка.

Группа наследственных атаксий представлена тремя формами. Наиболее распространена в Якутии спиноцеребеллярная атаксия I типа, в регистре учтено более 210 больных, а в таблице приведены данные о 147 больных из нескольких поколений 33 якутских семей с подтвержденным молекулярно-генетическим диагнозом СЦА1.

В Республиканском генетическом регистре наследственной и врожденной патологии зарегистрировано 12 больных из 11 якутских и 1 русской семьи с атаксией Фридрейха (АФ). Распространенность атаксии Фридрейха в Республике Саха (Якутия) составляет 1,26 на 100 тыс. населения, среди якутов – 2,78 на 100 тыс. якутского населения. Молекулярно-генетической причиной АФ является экспансия GAA-повторов в гене FRDA, диагностика

этого тяжелого заболевания проводится в МГК с 2006 г. Интересным фактом является то, что АФ обнаружена в якутской популяции, которая относится к азиатской расе, среди которой АФ до сих пор не была зарегистрирована.

С денторубро-паллидоллюисовой атрофией наблюдаются 2 больных из одной семьи, с подтвержденным молекулярно-генетическим анализом.

Наследственные заболевания с преимущественным поражением экстрапирамидной системы представлены в таблице 4 формами. У троих больных из двух семей диагностирована гепатолентикулярная дегенерация, болезнь Вильсона-Коновалова. С хореей Гентингтона наблюдается один больной. С болезнью Паркинсона проконсультировано 8 больных, эссенциальный тремор выявлен у 4 больных.

Спастика паралича Штрюмпеля представлена 12 случаями, из них 2 детей, в семьях наблюдается аутосомно-доминантный и аутосомно-рецессивный типы наследования, клиническая гетерогенность.

Среди других моногенных наследственных болезней, сопровождающихся нарушениями нервной системы, следует выделить группу факоматозов. Одним из самых частых заболеваний с аутосомно-доминантным типом наследования является нейрофиброматоз Реклингаузена (78 больных из 59

семей, из них 56 больных из 44 якутских семей). С туберозным склерозом наблюдается 2 больных.

Среди заболеваний с пароксизмальными расстройствами наблюдаются 7 больных с лейкодистрофией и двое с MELAS синдромом.

Таким образом, диагностируется довольно широкий, на наш взгляд, спектр наследственных неврологических синдромов (26 форма у взрослых и 16 форм у детей). Преобладают аутосомно-доминантные НБНС. Все перечисленные формы встречаются преимущественно в якутской популяции, характерен меж- и внутрисемейный клинический, генотипический полиморфизм. Наиболее широкий спектр различных нозологических форм представлен в группе нервно-мышечных заболеваний. Организация адекватной медико-генетической помощи с применением молекулярно-генетических и цитогенетических технологий, позволяющая точно диагностировать у пациентов большую часть наследственных заболеваний, позволит снизить груз наследственных болезней нервной системы среди населения Республики Саха (Якутия).

## Литература

1. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. ДНК-диагностика и медико-

генетическое консультирование в неврологии. М.: Медицинское информационное агентство. – 2002. – 591 с.

2. Коротов М.Н., Николаева И.А., Максимова Н.Р., Алексеева С.П., Сухомясова А.Л., Ноговицына А.Н. Наследственно-дегенеративные заболевания нервной системы в Якутии // Якутский медицинский журнал. – 2005 - № 1(9) - С.30-31.

3. Назаренко Л.П., Салюкова О.А., Ноговицына А.Н. Груз наследственной патологии среди коренных популяций сибирского региона // Там же. - С. 34-39

4. Ноговицына А.Н. Отягощенность населения Республики Саха (Якутия) наследственной патологией и анализ работы региональной медико-генетической консультации: Автореф. дис...канд. медиц. наук. – Томск, 2001. - 24с.

5. Максимова Н.Р., Сухомясова А.Л., Гуринова Е.Е., Николаева И.А., Коротов М.Н., Павлов Р.Н., Ноговицына А.Н., Пузырев В.П. Генетико-эпидемиологические и социально-экономические аспекты наследственной этноспецифической патологии в Якутии // Медицинская генетика. 2008. №10. С. 35-43.

6. Максимова Н.Р., Николаева И.А., Коротов М.Н., Икеучи Т., Онодера О., Нишизава М., Степанова С.К., Куртанов Х.А., Сухомясова А.Л., Ноговицына А.Н., Гуринова Е.Е., Степанов В.А., Пузырев В.П. Клинико-генеалогическая и молекулярно-генетическая характеристика окулофарингеальной миодистрофии в Республике Саха (Якутия) // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2008. - №6. – С.52-60.

7. Платонов Ф.А., Иллариошкин С.Н., Кононова С.К., Гоголев М.П., Иванова-Смоленская И.А. Спинаocerebellарная атаксия первого типа в Якутии: распространенность и клинико-генетические сопоставления // Медицинская генетика. – 2004. - №5(Т.3). – С. 242-248.

8. Сухомясова А.Л. Аутосомно-доминантная миотоническая дистрофия в Республике Саха (Якутия): Автореф. дис. канд.мед.наук. Томск, 2005. 22 с.

## Х.А. Куртанов, Н.Р. Максимова, А.В. Марусин, В.А. Степанов ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСА ОФМД В ПОПУЛЯЦИЯХ ЯКУТИИ

УДК 575.22+575.174.5

В статье рассматриваются три однонуклеотидных полиморфных участка (rs2231301, rs1950252, rs2268330) в локусе окулофарингеальной миодистрофии (ОФМД). ОФМД - это миопатия с поздней манифестацией вследствие мутации (экспансии (GCN)10 повтора до (GCN)12-17) на хромосоме 14q11.2-13в 1-м экзоне гена PABPN1. Результаты исследования позволили выявить коэффициент генетической дифференциации популяций Якутии в сравнении мировыми данными. Определены частоты гаплотипов, которые показали, что три популяции якутов практически идентичны по гаплотипическому составу и по частотам распространенных гаплотипов. Анализ структуры неравновесия по сцеплению показал высокое сцепление по первой и третьей SNP (rs2231301 и rs2268330). На основании частот гаплотипов локуса ОФМД было смоделировано филогенетическое древо генетических расстояний между шестью изученными популяциями Якутии.

**Ключевые слова:** окулофарингеальная мышечная дистрофия, PABPN1, однонуклеотидный полиморфизм, гаплотип, популяции человека, неравновесие по сцеплению.

In article three one-nucleotide polymorphic sites (rs2231301, rs1950252, rs2268330) in a locus of oculopharyngeal myodystrophy (OPhMD) are examined. OPhMD is a myopathy with late manifestation due to a mutation (expansion (GCN) 10 repetitions to (GCN) 12-17 on a chromosome 14q11 in the 1st exon of gene PABPN1. Results of research have allowed revealing factor of genetic differentiation of populations of Yakutia in comparison with world data. Haplotypes frequencies which have shown, that three populations of Yakuts are practically identical on haplotype structure and on frequencies of extended haplotypes. The analysis of un-equilibrium structure on coupling has shown high coupling on the first and the third SNP (rs2231301 and rs2268330). On the basis of frequencies of genotypes of OPhMD locus the phylogenetic tree of genetic distances between six studied populations of Yakutia has been simulated.

**Keywords:** oculopharyngeal muscular dystrophy, PABPN1, one-nucleotide polymorphism, haplotype, human populations, un-equilibrium on coupling.

### Введение

Аутосомно-доминантная окулофарингеальная мышечная дистрофия (ОФМД, MIM 164300) - миопатия

с поздней манифестацией, которая распространена во всем мире. Она обычно начинается в течение пятого или шестого десятилетия жизни с

**КУРТАНОВ Харитон Алексеевич** – м.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, e-mail: Hariton\_kurtanov@mail.ru; **МАКСИМОВА Надежда Романовна** – к.м.н., гл.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, e-mail: nogan@yandex.ru; **МАРУСИН Андрей Викторович** – к.б.н., н.с. НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск), e-mail: andrey.marusin@medgenetics.ru; **СТЕПАНОВ Вадим Анатольевич** – д.б.н., зам. директора по науке НИИ медицинской генетики СО РАМН, e-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru.

прогрессирующим птозом, дисфагией и слабостью проксимальных отделов конечностей. В 1998 г. Braise с соавторами изолировали на хромосоме 14q11.2-13 ген поли-(A)-связывающего белка 2 (PAB2, PABPN1) [4]. Мутации аутосомно-доминантного ОФМД были идентифицированы как короткие (GCN)12-17 экспансии в 1-м экзоне гена. (GCN)10 повторы кодируют N-конечный полиаланиновый домен поли-(A)-связывающего ядерного белка (PABPN1), служащего фактором полиаденилирования мРНК. Уникальные ядерные филаментозные включения в фибриллах скелетной мускулатуры являются патологическим признаком ОФМД. Мутантный PABPN1 протеин является составной частью ядерных филаментозных включений [6].

Частота ОФМД в якутской популяции составляет 1:11680 [3], что в 10-20 раз выше частоты, регистрируемой во Франции и Европе [4]. В Якутии заболевание впервые было зарегистрировано в 1932 г. под названием «беттоген - своеобразная наследственная форма бульбарного паралича среди якутов», описана клиника болезни в виде опущения верхних век, затруднения прохождения твердой пищи по пищеводу [2]. Последующие исследования выявили высокое накопление ОФМД у якутов. Молекулярно-генетический анализ по определению длин аллелей и прямому секвенированию гена PABPN1, проведенный в период с 2005 по 2006 г. совместно с японскими коллегами в НИИ мозга Университета г. Ниигата (Япония) выявил, что причиной развития окулофарингеальной миодистрофии у больных якутов является увеличение (GCN) повторов до 14 копий в гене PABPN1 [3].

Для непрямой молекулярно-генетической диагностики ОФМД необходимо изучить структуру неравновесия по сцеплению (LD) полиморфизмов, расположенных в близлежащих с мутацией локусах.

**Цель** нашей работы – определить частоты генотипов и гаплотипов трех SNP в локусе ОФМД, описать структуру неравновесия по сцеплению у представителей различных этнических групп Якутии (якуты (вилюйские, центральные и северные улусы), эвены, эвенки, юкагиры) в сравнении с мировыми данными по популяциям Азии, Европы и Африки.

#### Материалы и методы

**Характеристика исследованных популяций.** Материал исследования составили три популяционные выбор-

ки якутов: центральная группа улусов (N = 96), вилюйская группа (N = 93), северная группа улусов (N = 88); популяционные выборки эвенов (N = 50), эвенков (N = 39) и юкагиров (N = 21). Территории центральной группы улусов, куда входят Хангаласский, Мегино-Кангаласский, Горный, Намский, Таттинский, Чурапчинский, Усть – Алданский, Амгинский улусы, расположены в экономически более развитой центральной части Якутии. Вилюйская группа улусов (Вилюйский, Верхневилюйский, Нюрбинский, Сунтарский) расположена по устью реки Вилюй на западе Якутии. Северная группа улусов расположена на севере Якутии, занимает обширную территорию, в основном за полярным кругом. В этих улусах – места компактного проживания малочисленных народов Севера. Из-за неразвитой транспортной системы и больших расстояний они характеризуются географической изолированностью. Материал был собран в ходе совместных экспедиций сотрудников отдела молекулярной генетики ЯНЦ КМП СО РАМН и Медико-генетической консультации РБ №1-Национального центра медицины за весь период работы. В исследование включались якуты, эвены, эвенки и юкагиры, не связанные родственными отношениями. Для сравнения с мировыми данными были взяты данные по четырем популяциям из ресурса HarMap (азиаты (Китай) N=40, азиаты (Япония) N=38, европейцы N=77, африканцы N=77) [5].

**Экспериментальная часть.** В качестве маркеров были выбраны три однонуклеотидных полиморфизма (SNP): rs2231301, rs1950252, rs2268330, находящихся в локусе ОФМД. Первый и второй SNP расположены в гене BCL2L, а третий в межгенном некодирующем участке между геном BCL2L и PABPN1.

ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови стандартными методами

[1]. Ампли-

фикацию участков ДНК, содержащих полиморфный сайт рестрикции, проводили методом полимеразной цепной реакции на программном

термоциклере BIORAD MJ Mini PTC-100. Анализ продуктов амплификации проводили методом рестрикции ферментами Asu HP I (rs1950252), Bst4 CI (rs2231301), Rsa I (rs2268330). В локусе rs1950252 идентифицировали два аллеля: A (44 и 195 п.н.) и G (239 п.н.), во втором локусе rs2231301 также два аллеля: A (165 и 33 п.н.) и G (198 п.н.) и в третьем локусе rs2268330 два аллеля: аллель G (204 п.н.) и аллель C (34 и 170 п.н.).

**Описание условий ПЦР и рестрикции.** Амплификацию проводили в 15 мкл объема реакционной смеси следующего состава: 100 нг геномной ДНК; по 0,3 мкл оригинальных олигопраймеров (табл. 1) по 200 мкМ каждого нуклеозидтрифосфата; 0,5 единиц активности ДНК-полимеразы (Applied Biosystems), Mg<sup>2+</sup> 40мМ, буфер SA (160 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 650мМ Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % TWIN 20, H<sub>2</sub>O), DMSO 10 %. Были использованы следующие эндонуклеазы рестрикции для rs1950252 2 единицы активности (ед.акт.) фермента Asu HP I, для rs2231301 2 ед. акт. Bst4 CI, для rs2268330 2 ед. акт. Rsa I, все ферменты производства фирмы: ООО «СибЭнзим» (г. Новосибирск). Так как для локусов rs2268330 и rs2231301 нет естественных сайтов рестрикции, в праймерах были созданы искусственные сайты рестрикции (мисматчи) путем замены одного нуклеотида (табл. 1).

Продукты амплификации и рестрикции анализировали с помощью электрофореза в 3 % агарозном геле в течение 30 мин при 120 Вт или 8%-ном полиакриламидном геле в течение 1 ч 30 мин при 300 Вт и последующего окрашивания бромистым этидием.

**Статистические методы.** Уровень генетического разнообразия и межпопуляционной дифференциации на уровне генотипов определяли в пакете программ ARLEQUIN. Для анализа сцепления и блочной структуры

**Таблица 1**

**Последовательность праймеров и температура отжига изученных SNP в локусе гена окулофарингеальной мышечной дистрофии**

Номенклатура SNP/Последовательность праймеров	T <sub>m</sub>
<b>rs2231301</b> F: 5'-TCATGCCAGTCTTTCATCCTT-3' R: 5'-AACTCATCTCCAGCTGCCCGCATGGCTTGGTACAG-3'	61°C
<b>rs1950252</b> F: 5'-TGTGCATGCTGGGCTGCCTGGCAAATCTGGTGGTG-3' R: 5'-CAGAACTGCTCTTCTCTCCAAAG-3'	60°C
<b>rs2268330</b> F: 5'-GAAAAGGTAGCTGGGTGCAG-3' R: 5'-TACTGACCTAATGGCGCTTTTGTGTGCTCCTGGTA-3'	60°C

Примечание. Жирным шрифтом и курсивом с подчеркиванием обозначены мисматчи (специально заменённые нуклеотиды, для создания сайтов рестрикции).

Таблица 2

Частоты аллелей, гетерозиготность и уровень значимости по трем SNP-маркерам в локусе ОФМД

Локус/Популяция	Генотипы			MAF	P	Hobs	Hexp
	2	3	4				
<b>rs2231301</b>	<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>AA</b>	<b>A</b>			
Якуты (Виллойские улусы)	39	38	16	0,376	0,2785	0,409	0,469
Якуты (Центральные улусы)	37	51	8	0,349	0,1628	0,531	0,454
Якуты (Северные улусы)	36	43	9	0,347	0,656	0,489	0,453
Эвены (Якутия)	15	31	4	0,390	0,0709	0,62	0,476
Эвенки (Якутия)	11	26	2	0,385	<b>0,0277</b>	0,667	0,473
Юкагиры (Якутия)	10	11	-	0,262	0,3375	0,524	0,387
Азиаты (Китай) (НарМар)	6	23	11	0,438	0,5059	0,575	0,492
Азиаты (Япония) (НарМар)	14	18	6	0,395	1	0,474	0,478
Европейцы (НарМар)	41	34	2	0,247	0,1871	0,442	0,372
Африканцы (НарМар)	68	9	-	0,013	1	0,026	0,026
<b>rs1950252</b>	<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>AA</b>	<b>A</b>			
Якуты (Виллойские улусы)	90	3	-	0,016	1	0,032	0,032
Якуты (Центральные улусы)	96	-	-	0	1	0	0
Якуты (Северные улусы)	86	2	-	0,011	1	0,023	0,022
Эвены (Якутия)	48	2	-	0,020	1	0,04	0,039
Эвенки (Якутия)	39	-	-	0	1	0	0
Юкагиры (Якутия)	21	-	-	0	1	0	0
Азиаты (Китай) (НарМар)	35	5	-	0,062	1	0,125	0,117
Азиаты (Япония) (НарМар)	34	4	-	0,053	1	0,105	0,1
Европейцы (НарМар)	66	11	-	0,071	0,143	0,143	0,133
Африканцы (НарМар)	75	2	-	0,058	1	0,117	0,11
<b>rs2268330</b>	<b>GG</b>	<b>GC</b>	<b>CC</b>	<b>G</b>			
Якуты (Виллойские улусы)	26	41	26	0,5	0,3232	0,5	0,3232
Якуты (Центральные улусы)	25	55	16	0,453	0,2021	0,496	0,2021
Якуты (Северные улусы)	23	46	19	0,477	0,8574	0,523	0,499
Эвены (Якутия)	8	28	14	0,440	0,5437	0,56	0,493
Эвенки (Якутия)	14	19	6	0,397	1	0,487	0,479
Юкагиры (Якутия)	10	10	1	0,286	0,9363	0,476	0,408
Азиаты (Китай) (НарМар)	12	22	6	0,425	0,6976	0,55	0,489
Азиаты (Япония) (НарМар)	7	17	14	0,408	0,8365	0,447	0,483
Европейцы (НарМар)	3	34	40	0,26	0,4420	0,442	0,385
Африканцы (НарМар)	-	-	77	0	1	0	0

Примечание. P – уровень значимости соответствия равновесию Харди-Вайнберга; MAF – частота минорного аллеля; Hobs – наблюдаемая, Hexp – ожидаемая гетерозиготности.

гаплотипов использовали программу Haploview 3.2. Дендограмму генетических взаимоотношений между популяциями строили при помощи программы PHYLIP.

### Результаты и обсуждение

Проанализированы три SNP маркера в локусе ОФМД, расположенные в участке размером около 19 т.п.н. Частоты аллелей, гетерозиготность и уровень статистической значимости соответствия распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга изученных маркеров представлены в табл.2. Распределение частот аллелей всех локусов и во всех изученных популяциях, а также в 4 популяциях из проекта НарМар соответствует равновесию Харди-Вайнберга, за исключением популяции эвенков для rs2231301. Это несоответствие равновесию Харди-Вайнберга является следствием увеличения наблюдаемой гетерозиготности на 19,4 % по сравнению с ожидаемой. Частота аллеля «А» rs2231301 меняется от 2,6 % у африканцев, достигая максимального значения у китайцев – 56,2 %. В трех популяциях якутов значение частоты этого аллеля 35-37 %. Генетическая изменчивость локуса rs1950252 не высока, ожидаемая гетерозиготность 10-15 % для популяций из проекта НарМар и 2-3 % для популяций из Якутии. При этом популяции якутов из центральных улусов, эвенков и юкагиров мономорфны. Генетическая изменчивость локуса rs2268330 высока, ожидаемая гетерозиготность почти по всем популяциям равна 38-49 %. Однако популяция народности йоруба мономорфна по этому локусу, а ожидаемая гетерозиготность в популяциях якутов из центральной и виллойской групп улусов понижена – 32,3 и 20,2 % соответственно.

Уровень генетической дифференциации трех популяций якутов в среднем по частотам аллелей трех SNP локуса ОФМД, оцененный с помощью коэффициента  $F_{st}$ , составил -0,00166. Анализ межпопуляционной дифференциации по частотам аллелей локуса ОФМД выявил, что 3 популяции якутов практически не различаются между собой. Среднее значение коэффициента генетической дифференциации имеет отрицательное значение, свидетельствующее о том, что внутривидовая вариация выше межпопуляционной вариации. При анализе 6 популяций (к 3 популяциям якутов добавлены три попу-

ляции - эвенков, эвенков, юкагиров)  $F_{st}$  составил 0,00252, а при добавлении к ним четырех популяций из НарМар средний  $F_{st}$  достигает 0,08877.

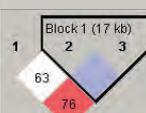
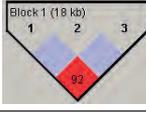
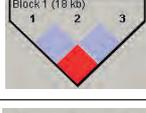
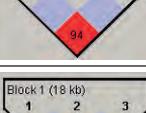
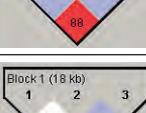
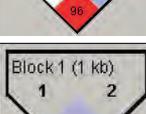
Сочетание трех диаллельных локусов теоретически дает 8 гаплотипов. В изученных популяциях обнаружено 6 из них (табл. 3). В популяции центральных якутов выявлены 4 гаплотипа, у виллойских якутов 5, у северных якутов 5, у эвенков 4, у эвенков 4 и у юкагиров 3. Три популяции якутов практически идентичны по гаплотипическому составу и по частотам распространенных гаплотипов. В трех якутских популяциях гаплотипы «GGG» и «AGC» встречаются с суммарной частотой 77-86 %. У центральных якутов не обнаружен гаплотип «GAG». У эвенков, эвенков и юкагиров представлены гаплотипы, которые были и у якутов, но отсутствует гаплотип «GAG», появляется гаплотип «AAC» у эвенков (2 %), присутствующий только у японцев (1,3 %). Гаплотип «GAC» представлен у китайцев, японцев, европейцев и африканцев, а в популяциях Якутии отсутствует. Гаплотип «GGG», самый распространенный среди популяций Якутии (наибольшая частота у цент-

ральных якутов – 52,9%), у китайцев, японцев, европейцев представлен с очень низкой частотой (в среднем 3%) и у африканцев йоруба он полностью отсутствует. В свою очередь, гаплотип «GGC», представленный во всех популяциях, с наибольшей частотой встречается у йоруба (92,9%), а наименьшую частоту имеет у центральных якутов (12,2%).

Структура неравновесия по сцеплению между изученными локусами показана в таб.3 в последнем столбце. Выявлены отдельные блоки из двух SNP, характеризующиеся высоким уровнем сцепления ( $D' > 0,85$ ). В большинстве популяций сильно сцеплены первый и третий SNP (rs2231301 и rs2268330), которые расположены на расстоянии друг от друга в 18 т.п.н. и образуют блок LD. Слабое сцепление этих SNP наблюдалось у эвенков, юкагиров и африканцев. Между первым и вторым SNP сцепления не наблюдается несмотря, что они очень близко расположены (примерное расстояние 1 т.п.н.), вероятно, из-за низкой гетерозиготности второго маркера (rs1950252). Гаплотипы, встречающиеся с частотой более 4 % в любой из групп, названы

Таблица 3

Структура неравновесия по сцеплению и частоты гаплотипов локуса ОФМД в популяциях Якутии (вилуйские, центральные, северные якуты; эвенки; эвенки и юкагиры), азиатов (Китай, Япония), европейцев и африканцев

ПОПУЛЯЦИИ	ГАПЛОТИПЫ							Блоки LD
	GGG	AGC	GGC	GAG	AGG	AAC	GAC	
Якуты (Вилуйские улусы)	0,440	0,333	0,167	0,043	0,016	-	-	
Якуты (Центральные улусы)	0,529	0,331	0,122	-	0,018	-	-	
Якуты (Северные улусы)	0,498	0,333	0,144	0,011	0,013	-	-	
Эвенки (Якутия)	0,440	0,370	0,170	-	-	0,020	-	
Эвенки (Якутия)	0,309	0,091	0,307	-	0,294	-	-	
Юкагиры (Якутия)	0,452	-	0,286	-	0,262	-	-	
Азиаты (Китай) (НарМар)	0,025	0,013	0,350	-	0,550	-	0,062	
Азиаты (Япония) (НарМар)	0,040	0,015	0,525	-	0,367	0,013	0,040	
Европейцы (НарМар)	0,020	-	0,665	-	0,238	-	0,069	
Африканцы (НарМар)	-	0,013	0,929	-	-	-	0,058	

Примечание. В последней колонке, в ячейках указано значение коэффициента сцепления ( $D'$ ). Оттенки серого указывают на силу сцепления: темно серый – сильное сцепление, серый – значительное сцепление, белый – слабое сцепление. Черные рамки – разделение на блоки методом «Solid Spine», который показывает на сильное неравновесие по сцеплению. Отсутствие значения  $D'$  в ячейке означает невозможность расчета неравновесия по сцеплению из-за низкой частоты аллеля.



Древо генетических расстояний между популяциями Якутии, построенное по частотам генотипов трёх SNP локуса ОФМД

нами основными гаплотипами (ОГ). Порог частоты, равный 4 %, выбран в соответствии с применяемым подходом [5]. Всего у якутов обнаружено 5 гаплотипов. Из них 4 у вилуйских якутов и по 3 у центральных и северных якутов встречаются с частотой более 4 %, а 3 из них являются общими для трёх популяций якутов. Наибольшими частотами характеризуются гаплотипы «GGC» (африканцы) и «GGG» (центральные якуты). Более низкое гаплотипическое разнообразие в популяции африканцев связано с высокой частотой гаплотипа GGC = 92,9 % (табл.3).

пов локуса ОФМД древо генетических расстояний между шестью изученными популяциями. На древе вилуйские якуты и эвенки образуют отдельный кластер, что вполне соответствует этнической истории и географии расселения эвенков и якутов. Вследствие проживания на одной территории, возможно, произошла метисация эвенков и якутов в Вилуйском регионе. Популяции эвенков и юкагир образуют другой отдельный кластер, а популяции якутов из центральных и северных улусов занимают промежуточное положение. Топология древа, вероятно, отражает территориальное проживание этих групп, а не структуру эволюционно-генетических взаимоотношений.

### Заключение

В работе были изучены частоты аллелей и гетерозиготность по трем SNP (rs2231301, rs1950252, rs2268330) в трёх популяциях якутов, а также в популяциях эвенков, эвенков и юкагиров, оценено соответствие равновесию Харди-Вайнберга. Определён уровень генетической дифференциации популяций с помощью коэффициента  $F_{st}$  в среднем по частотам аллелей трех SNP локуса ОФМД. Полученные данные говорят о том, что у якутов внутрипопуляционная межиндивидуальная вариабельность по изученным локусам выше межпопуляционной вариабельности. При сравнении якутских популяций с другими мировыми популяциями (европейцы, азиаты, африканцы) коэффициент  $F_{st}$  возрастает в 35 раз и составляет 8,9 %, что говорит о высокой дифференциации мировых популяций по изученным локусам. Определены частоты гаплотипов, которые показали, что три популяции якутов практически идентичны по гаплотипическому составу и по частотам распространённых гаплотипов. Структура неравновесия по сцеплению между

изученными локусами обнаруживает высокое сцепление по первой и третьей SNP (rs2231301 и rs2268330) практически во всех изученных популяциях Якутии и мира, за исключением эвенов, якутов из вилкойских улусов и африканцев. При этом у йоруба сцеплены rs2231301 и rs1950252. На основании частот генотипов локуса ОФМД было смоделировано филогенетическое древо генетических расстояний между шестью изученными популяциями Якутии (3 якутских популяции и эвенов, звенков и юкагиров). Топология древа, вероятно, отражает территориальное

проживание этих групп, а не структуру эволюционно-генетических взаимоотношений.

*Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (07-04-01629-а и 09-04-90744-моб\_ст).*

### Литература

1. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии / А.И. Карпищенко // СПб.: Интермедика. 1999. – С.604.
2. Зак М. «Бетюген» - своеобразная наследственная форма бульбарного паралича среди якутов / М. Зак // Советская невропатология и психигиена. - 1932. – Т.1, №12. - С.814-817.

3. Максимова Н.Р. Клинико-генеалогическая и молекулярно-генетическая характеристика окулофарингеальной миодистрофии в Республике Саха (Якутия) / Н.Р. Максимова [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2008. - №6. - С.32-35

4. Braise B. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy / B. Braise [et al.] // Nat Gen. - 1998. - 18. - С.164-167.

5. Tang K. Genomic evidence for recent positive selection at the human MDR1 gene locus / K. Tang [et al.] // Hum. Molec. Genet. - 2004. - 13. - С.783-797.

6. Tome F.M. Morphological changes in muscle fibers in oculopharyngeal muscular dystrophy / D. Chatheu, A. Helbling-Leclerc, M. Fardeau // Neuromuscular Disord. - 1997. - 7. - С.63-9

7. URL = www.hapmap.org

## МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ, ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

А.Л. Сухомясова, А.Н. Ноговицына, Н.Р. Максимова

### МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПОМОЩЬ НАСЕЛЕНИЮ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК 61:575

В статье отражены состояние и перспективы развития медико-генетической помощи населению Республики Саха (Якутия). Показана эффективность тесного сотрудничества практического и научного звена медико-генетической службы в регионе.

**Ключевые слова:** медико-генетическое консультирование, наследственные болезни.

In the article condition and prospects of medical-genetic assistance to population of Republic Sakha (Yakutia) are illustrated. The efficiency of close cooperation of practical and scientific sections of medical-genetic service in the region is shown.

**Keywords:** medical-genetic counseling, hereditary diseases.

#### Введение

Медико-генетическое консультирование представляет собой один из видов специализированной помощи населению. Основной задачей медико-генетической службы является профилактика врожденной и наследственной патологии путем организации и проведения ретро- и проспективного консультирования, пренатальной диагностики, прелиминационной диагностики наследственных болезней, направления на лечение и диспансерное наблюдение семей с наследственной патологией [7]. Актуальность данной задачи обусловлена существенным вкладом наследственной и врожденной патологии в структуру перинатальной, младенческой и детской смертности и инвалидности. С генетическими факторами связаны 20-30% детской смертности, 50% врожденной глухоты, 70% слепоты, 80% умственной отсталости, 40-50% спонтанных аборт и выкидышей. Уровень и качество медико-генетической помощи приобретают все большее значение в общей системе медико-социальных мероприятий [7].

В Республике Саха (Якутия) численность населения составляет по данным переписи 2002 г. 949280 чел., оно представлено более 120 национальностями. Особенности региона являются: огромная территория, низкая плотность расселения, относительная изоляция, подразделенность популяций, рост численности за счет высокой рождаемости, а также чрезвычайно высокая распространенность некоторых наследственных болезней, в особенности - спиноцеребеллярной атаксии I типа, миотонической дистрофии, наследственной энзимопенической метгемоглобинемии, окулофарингеальной миодистрофии, 3-М синдрома [3-6].

Становление медико-генетической службы в РС(Я) берет свое начало от медико-генетического кабинета (1989 г.) до медико-генетической консультации (МГК). Оказание медико-генетической помощи на территории республики, как и в других регионах России, носит многоуровневый характер [1,2]. Врачами общей лечебной сети, узкими специалистами выявляются больные с клиническими проявлениями и группа с высоким риском по наследственной патологии. В медико-генетических кабинетах двух улусов (г.Нерюнгри и г.Вилуйск) с 2004 г. ведется консультирование с отбором пациентов для специальных исследований.

Специализированная помощь населению РС (Я) оказывается в ре-

гиональной медико-генетической консультации, входящей в состав Перинатального центра РБ №1 – Национального центра медицины – ведущего медицинского учреждения республики. Структура, функции и задачи МГК регламентируются нормативными документами Министерства здравоохранения РФ и Министерства здравоохранения РС (Я).

МГК укомплектована квалифицированными кадрами клинических генетиков и специалистов по лабораторной генетике, оснащена современным диагностическим оборудованием. В своем составе МГК Перинатального центра РБ№1-НЦМ имеет консультативное отделение, кабинет пренатальной диагностики, специализированную лабораторию с биохимическим, цитогенетическим, молекулярно-генетическим отделами, лабораторию пренатальной диагностики. Лабораторная диагностика в МГК включает цитогенетические, биохимические, молекулярно-генетические методы диагностики наследственных болезней. Постоянно совершенствуются и внедряются новые методы диагностики.

#### Основные направления деятельности МГК

##### Медико-генетическое консультирование

В МГК ежегодно получают консультацию в среднем 2500 семей, регистрируется более 7 тыс. посещений, из

СУХОМЯСОВА Айтилина Лукична – к.м.н., зав. МГК РБ №1 – НЦМ, гл. внештатный генетик МЗ РС (Я), e-mail: AitalinaS@yandex.ru; НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна – к.м.н. врач-генетик МГК Перинатального центра, зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; МАКСИМОВА Надежда Романовна – к.м.н., гл.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН.

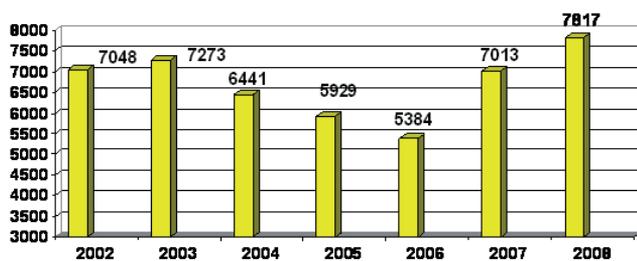


Рис. 1. Динамика посещений в МГК

них 55% - сельскими жителями (рис.1). По местам проживания более половины (54%) из консультируемых в МГК за 2008 г. являлись жителями улусов республики, 46% - г.Якутска. Наиболее часто консультируются из Мегино-Кангаласского, Хангаласского, Усть-Алданского, Чурапчинского улусов – территориально близких к столице республики (центральные улусы), меньше - из северных улусов. За счет активного консультирования семей с моногенной наследственной патологией в основном увеличилась доля сельских жителей, где в основном сосредоточена патология (55% посещений).

Каждый год проходит обследование более 1000 беременных женщин из отягощенных семей и группы высокого риска по прогнозу здоровья потомства. Частыми причинами обращения являются возраст женщины старше 35 лет, обнаружение при УЗИ аномалий развития плода и эхографических маркеров хромосомной патологии, прием лекарственных препаратов, обладающих тератогенной активностью, наследственная и врожденная патология в семье.

Расположение МГК в крупном многопрофильном лечебном учреждении республики обеспечивает доступность медико-генетической помощи для всех пациентов консультативных и стационарных подразделений центра, способствует преемственности в работе с другими службами (акушерско-гинекологической, педиатрической и др.). Из подразделений РБ№1-НЦМ направляется ежегодно 40% обратившихся в МГК пациентов. С каждым годом увеличивается обращаемость по поводу прогноза здоровья потомства, доля пациентов, направленных в МГК из центральных районных больниц. Кроме того, на число направлений в МГК из ЦРБ влияют выездное консультирование населения во время экспедиций в улусы совместно с научными сотрудниками Отдела молекулярной генетики ЯНЦ КМП СО РАМН и приглашение родственников больных, проведение семинаров среди населения, медицинских работников различного профиля. Выездному медико-генетическому кон-

сультированию в улусы республики уделяется особое внимание в связи с тем, что значительные расстояния, дороговизна проезда не позволяют получить медико-генетическую помощь в полном объеме жителям многих улусов.

Соотношение консультирующихся по направлению врачей и обратившихся самостоятельно в МГК составило 90 и 10% соответственно, что связано с повышением грамотности специалистов первичного звена, специализированных подразделений по медицинской генетике, расширением возможностей лабораторной диагностики. Среди консультирующихся в МГК преобладают якуты – 71%, русские составляют 21%, представители малочисленных народов Севера – до 5%.

В МГК с 2001 г. внедрен Республиканский регистр наследственной и врожденной патологии. За период с 2001 по 2008 г. зарегистрировано 11500 семейных карт. Автоматизированный регистр позволил совершенствовать медико-генетическое консультирование и улучшить эффективность, выделить наиболее частые моногенные заболевания в регионе, особенности их распространения, прогнозирования и профилактики новых случаев. По данным регистра из 1544 учтенных больных с уточненной наследственной патологией преобладают моногенные болезни нервной системы (34%), наследуемые синдромы (23%), хромосомные болезни (15%) (рис. 2).

Практическую помощь в консультировании больных оказывают научные сотрудники ЯНЦ КМП СО РАМН (нейрогенетик Коротов М.Н., неврологи Николаева И.А., Варламова М.А., ортопед, к.м.н. Павлов Р.Н. и др.).

#### Цитогенетическая диагностика

В МГК цитогенетическая диагностика хромосомной патологии проводится ежегодно 450-500 пациентам, из них 65% - дети. Согласно направлениям выделяются основные группы: до 35% - пациенты с нарушением физического и полового развития, 30% - с задержкой психомоторного развития, от 6 до 10% - с множественными пороками

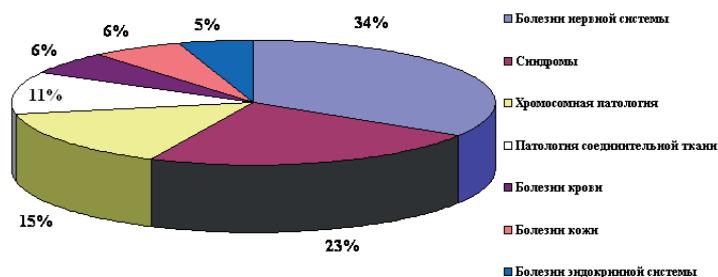


Рис. 2. Структура наследственной патологии по данным Республиканского регистра наследственной и врожденной патологии

развития. Наиболее часто диагностируются числовые нарушения, среди них - синдром Дауна (67% в 2008 г.). Хромосомная патология выявлена у 6,6% обследованных за 2006-2008 г.

#### Селективный и массовый биохимический скрининг

Качественные и количественные биохимические тесты проводятся для диагностики наследственных болезней обмена веществ. В лаборатории МГК проводится тонкослойная хроматография аминокислот и углеводов, определение церулоплазмينا и меди, VIII и IX факторов свертывания крови, альфа-1 антитрипсина, лактата и др. За 2008 г. проведено 67445 исследований.

Массовое обследование новорожденных в РС (Я) проводится на фенилкетонурию, врожденный гипотиреоз, адреногенитальный синдром, муковисцидоз и галактоземию. Охват скринингом по республике составляет 98-99%. Частота фенилкетонурии составила 1:48366 новорожденных, врожденного гипотиреоза – 1:4337, адреногенитального синдрома – 1:10372. Только за период с 2006 г. выявлено 8 больных с врожденным гипотиреозом, 2 - с фенилкетонурией, 3 - адреногенитальным синдромом. Все дети получают лечение, семьям проведено медико-генетическое консультирование, при фенилкетонурии и адреногенитальном синдроме проведена ДНК-диагностика в федеральных центрах.

#### Молекулярно-генетическая диагностика моногенных болезней

В МГК с 2000 г. проводилась ДНК-диагностика 5 заболеваний - спиноцеребеллярной атаксии I типа, нервной амиотрофии Шарко-Мари-Тус 1А типа, миодистрофии Дюшенна-Беккера, миотонической дистрофии, гемофилии А. За 2 последних года благодаря совместной работе с Отделом молекулярной генетики КМП ЯНЦ СО РАМН внедрена молекулярно-генетическая диагностика еще 7 наследственных моногенных болезней - атаксии Фридрейха, окулофарингеальной миодистрофии, спинальной амиотрофии

Вердника-Гоффмана, наследственной энзимопенической метгемоглобинемии, нейросенсорной несиндромальной тугоухости, спинально-бульбарной амиотрофии Кеннеди и 3-М синдрома. Только в 2008 г. молекулярно-генетическая диагностика моногенных болезней проведена у 831 чел., тогда как в 2006 г. ДНК-диагностику прошли 352 чел., в 2007 – 663.

#### Пrenатальная диагностика

Пrenатальное обследование беременных в МГК проводится неинвазивными и инвазивными методами.

Ультразвуковое исследование беременных женщин в республике проводится согласно приказу МЗ РФ №457 от 28.10.2000 года «О совершенствовании в профилактике наследственных и врожденных заболеваний у детей» и МЗ РС (Я) №663 от 29.12.2006 года «О совершенствовании пренатальной и постнатальной диагностики врожденной и наследственной патологии в Республике Саха (Якутия)» на базе женских консультаций, РБ№1-НЦМ. Оснащение МГК современным УЗ-оборудованием позволит оптимизировать своевременную диагностику врожденной патологии, увеличит эффективность профилактики ВПР и моногенных болезней в республике. Также селективно выполняются биохимические (сывороточные маркеры) исследования на ассоциированный с беременностью плазменный протеин А (РАРР-А) в комплексе с  $\beta$ -субъединицей хорионического гонадотропина (ХГЧ) в сроки 10-13 недель беременности, альфафетопротеина (АФП) и ХГЧ - в 15-20 недель.

Инвазивные методы пренатальной диагностики внедрены в 1999 г., проводятся хорионбиопсия, плацентобиопсия, кордоцентез, амниоцентез. За период с 1999 г. в МГК проведено более 1400 инвазивных процедур. Выявляемость хромосомной патологии плода составила 6%. В структуре хромосомной патологии плода преобладают числовые аномалии, среди которых трисомия по 21 хромосоме (синдром Дауна), трисомия по 18 хромосоме (синдром Эдвардса).

В отягощенных семьях проведена пренатальная ДНК-диагностика по заболеваниям – спиноцереbellлярной атаксии I типа, миотонической дистрофии, 3М-синдрому, миопатии Дюшенна/Беккера, спинальной амиотрофии Вердника-Гоффмана, невралной амиотрофии Шарко-Мари-Тус IA типа.

При выявлении ВПР, хромосомной, моногенной патологии у плода вопрос о дальнейшей тактике решается пренатальной комиссией в составе вра-

чей-генетиков, акушера-гинеколога, врача ультразвуковой диагностики, узких специалистов – в зависимости от выявленной аномалии. Во всех случаях окончательное решение остается за семьей.

#### Мониторинг врожденных пороков развития

В РС (Я) мониторинг врожденных пороков развития (ВПР) проводится с 2001 г., в МГК создана группа мониторинга. Извещения на случаи рождения детей с ВПР и прерванных плодов с ВПР поступают из всех родильных домов республики, прозектуры. В группу мониторинга за 2008 г. поступило 510 извещений на 357 случаев ВПР. Целью мониторинга является обеспечение единого подхода к слежению за частотой врожденных пороков развития в сочетании с уровнем загрязнения окружающей среды тератогенными и мутагенными веществами. По мониторингу ВПР проводится оценка эффективности пренатальной диагностики в республике.

Частота ВПР среди новорожденных в РС (Я) составила от 1,75% в 2001 г. до 2,7% в 2008 г. (рис. 3). Наибольший удельный вес в структуре ВПР занимают врожденные пороки сердца, множественные пороки развития, пороки костно-мышечной, мочевой и половой систем.

#### Заключение

В МГК Перинатального центра РБ№1-НЦМ объединены современные методы диагностики врожденной и наследственной патологии. Сосредоточенные на базе МГК технологии генетических анализов, коллектива квалифицированных врачей-генетиков, научных сотрудников работают на все население республики, что повышает эффективность медико-генетического консультирования. Внедрение новейших достижений в области ДНК-диагностики наследственной патологии является особенно актуальным для Якутии, отдаленной от центральных областей России.

Для дальнейшего улучшения медико-генетической помощи населению РС (Я) важными являются:

-поддержка органов здравоохранения (директивная, организационная, методическая, взаимодействие между службами);

-развитие сети территориальных медико-генетических кабинетов в крупных улусах и городах с целью достижения доступности медико-генетической помощи для всех категорий населения;

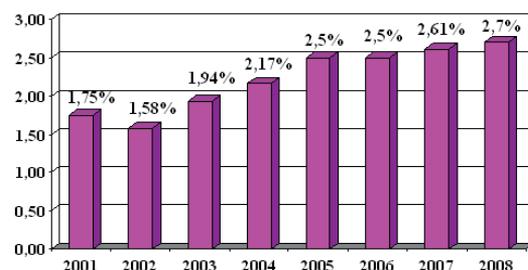


Рис. 3. Частота ВПР в Республике Саха (Якутия) по данным группы мониторинга МГК РБ№1-НЦМ

- проведение диагностики и профилактики врожденных и наследственных болезней на основе научно обоснованных рекомендаций, республиканской целевой программы;

-расширение возможностей диагностики наследственных болезней с учетом особенностей региона и с использованием современных методов;

-оказание психологической помощи больным и отягощенным семьям в адаптации больных с врожденной и наследственной патологией в семье и обществе;

-взаимодействие с другими специализированными службами (акушерско-гинекологической, педиатрической, неврологической, эндокринологической и др.);

-пропаганда медико-генетических знаний.

#### Литература

1. Матулевич С.А. Принципы организации и оценка эффективности медико-генетической службы в России: автореф. дисс. канд. мед. наук. - М., 2005. - 26 с.
2. Мурзабаева С.Ш., Магжанов Р.В., Хуснутдинова Э.К., Марданова А.К. Организация медико-генетической помощи в Республике Башкортостан // Медицинская генетика. - 2005. Т.4. - №10. - С. 482-488.
3. Ноговицына А.Н. Отягощенность населения Республики Саха (Якутия) наследственной патологией и анализ работы региональной медико-генетической консультации: Автореф. дис. ...канд. мед. наук. - Томск, 2001. - 24 с.
4. Платонов Ф.А., Иллариошкин С.Н., Кононова С.К. и др. Спиноцереbellлярная атаксия первого типа в Якутии: распространенность и клинико-генетические сопоставления // Медицинская генетика. - 2004. - Т.5. - С. 242-248.
5. Пузырев В.П., Максимова Н.Р. Наследственные болезни у якутов // Генетика. - 2008. - Т.44. - №10. - С. 1317-1324.
6. Сухомьясова А. Л. Аутосомно-доминантная миотоническая дистрофия в Республике Саха (Якутия): автореф. дисс. канд. мед. наук. - Томск. - 2005. - 22 с.
7. Филиппова Т.В., Самократов Д.В., Цветкова А.С. Медико-социологический анализ технологии генетического консультирования // Проблемы управления здравоохранением. - 2008. - №3 (40). - С. 45-50.
8. Maksimova N.R., Hara K., Miyashita A. et others. Clinical, molecular and Histopathological features of short STATURE syndrome with novel CUL7 Mutation in Yakutsk: new population isolate in Asia // J. Med. Genet. - 2007. - V. 44. - P.772-778.

Е.Л. Пестерева, А.Ю. Шатунов, О.Г. Сидорова, Л.В. Готовцева  
**ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА В РЕСПУБЛИКЕ САХА  
 (ЯКУТИЯ): ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
 ХРОМОСОМНОЙ ПАТОЛОГИИ**

УДК 618.33-007

**Цель исследования.** Анализ структуры хромосомной патологии в пренатальном периоде по результатам инвазивной цитогенетической диагностики в РС (Я) с 1999 по 2008 г.

**Материалы и методы.** В работе проведен анализ 72 случаев хромосомной патологии, установленной цитогенетическим методом с помощью инвазивных методов аспирации плодного материала.

**Результаты.** Выявлен широкий спектр хромосомной патологии у плодов с различным витальным прогнозом.

**Заключение.** Классический цитогенетический метод позволяет выявить значительную часть хромосомной патологии и является основным методом в дифференциальной диагностике причин врожденных пороков развития. Для диагностики редких и сложных случаев хромосомных aberrаций необходимо использование высокотехнологичных генетических методов исследования.

**Ключевые слова:** мутации, цитогенетический метод, пренатальная диагностика.

**The purpose of research.** Analysis of structure of a chromosomal pathology in prenatal period by results of invasive cytogenetic diagnostics in RS (Y) from 1999 to 2008.

**Materials and methods.** In work the analysis of 72 cases of the chromosomal pathology established by cytogenetic method by means of invasive methods of a fetal material aspiration is lead.

**Results.** The wide spectrum of a chromosomal pathology in fetuses with various vital forecast is revealed.

**The conclusion.** Classical cytogenetic method allows to reveal a significant part of a chromosomal pathology and is the basic method in differential diagnostics of the reasons of congenital developmental anomalies. For diagnostics of rare and difficult cases of chromosomal aberrations use of hi-tech genetic methods of research is necessary.

**Keywords:** mutations, cytogenetic method, prenatal diagnostics.

### Введение

Мутации наследственных структур происходят на трех уровнях их организации: геном, хромосомном и геномном. Носительство хромосомных мутаций часто несовместимо с жизнью и приводит к летальности в раннем эмбриогенезе. В редких случаях мутации хромосом приводят к развитию разнообразных форм врожденной мульти-системной патологии – хромосомных болезней.

Нарушения общего генетического баланса на ранних стадиях эмбриогенеза, вызываемые хромосомными аномалиями, обуславливают общность клинической картины разных хромосомных болезней. Главная роль в диагностике хромосомных заболеваний отводится цитогенетическому методу, позволяющему проанализировать весь набор хромосом. Цитогенетические методы также являются ведущими при выяснении причин пороков развития. Удельный вес хромосомной патологии в структуре множественных пороков развития может достигать 51% [2].

С внедрением в практическое здравоохранение новых технологий в области акушерства и медицинской генетики цитогенетические методы

**ПЕСТЕРЕВА Елена Львовна** – м.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, врач-лаборант-генетик МГК ПЦ РБ №1-НЦМ, e-mail: pestereval@gambler.ru; **ШАТУНОВ Алексей Юрьевич** - врач-лаборант-генетик МГК ПЦ РБ №1-НЦМ; **СИДОРОВА Оксана Гаврильевна** – н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, врач-генетик МГК ПЦ РБ №1-НЦМ, e-mail: okssi66@mail.ru; **ГОТОВЦЕВА Люция Васильевна** – с.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, врач-акушер-гинеколог МГК ПЦ РБ №1-НЦМ.

позволяют не только установить точный диагноз хромосомного заболевания на любой стадии эмбрионального развития, определить прогноз здоровья будущего потомства, но и повлиять на дальнейшую тактику ведения беременности.

**Цель** данного исследования заключалась в анализе структуры хромосомной патологии во внутриутробном периоде развития по результатам пренатальной цитогенетической диагностики в РС (Я) с 1999 по 2008 г.

### Материалы и методы

Исследование является частью работы по изучению структуры хромосомной патологии на территории РС (Я) за 1999-2008 гг. В работе проведен анализ 72 случаев выявленной хромосомной патологии у плодов. В диагностике хромосомной патологии был использован стандартный цитогенетический метод.

### Результаты и обсуждение

С момента организации инвазивной пренатальной цитогенетической диагнос-

тики в РС (Я) в 1999 г. хромосомные болезни и аномалии были выявлены у 72 (6%) плодов (таблица).

Наибольшее число хромосомной патологии (78%) было установлено по клеткам зародышевых оболочек, получаемых наиболее щадящими инвазивными методами – хорион- и плацентобиопсией. Кариотипирование по истинным клеткам плода, получае-

Спектр хромосомных нарушений у плодов (1999 – 2008 гг.).

Кариотип	Кол-во случаев
47,XY,+21	11
47,XX,+21	10
46,XY,der(13;14)(q10;q10),+21	1
46,XY,der(14;21)(q10;q10)mat,+21	2
46,XY,der(14;21)(q10;q10)de novo,+21	1
mos 47,XY,+21[44] / 46,XY [5] (90%)	1
47,XX,+18	9
47,XY,+18	5
47,XY,+13	1
47,XX,+13	1
45,X	3
mos 45,X [21] / 46,XX [1] (5%)	1
47,XXX	3
47,XXY	2
47,XY	1
69,XXX	1
mos 92,XXXX [6] / 46,XX [35] (17%)	1
46,XX,t(6;7)(q12;p21)mat	1
46,XY,der(6)t(2;6)(q33;p25)mat	1
45,XX,der(18)(q10;q10)	1
46,XY,t(1;6)(q22;q27)mat	2
46,XY,t(11;17;19)t(11;17)(p10;q10)t(17;19)(p10;p10)pat	1
45,XY,der(13;21)(q10;q10)mat	2
45,XY,der(13;14)(q10;q10)	1
45,XY,der(13;14)(q10;q10)mat, UPD(14) pat?	1
46,XX,del(4)(p16)	1
46,X,mar	2
mos 47,XY,+mar / 46,XY	3
chi 46,XX [20] / 46,XY [11] (64%/36%)	1
46,XY,fem	1

мым методом кордоцентеза, позволило диагностировать сложные случаи структурных aberrаций и мозаичные формы хромосомных аномалий.

Цитогенетические методы исследования кариотипа позволяют определять тип мутации, вовлеченную в процесс хромосомы, форму и вид болезни, составляющие основу классификации хромосомной патологии [3].

По этиологическому принципу различают геномные (числовые) и хромосомные (структурные) мутации. Аномалии числа хромосом связаны с нарушением целостности генома и подразделяются на следующие формы: анеуплоидии, связанные с изменением числа отдельных хромосом, и полиплоидии, связанные с изменением числа копий целого хромосомного набора.

Большая часть аномалий кариотипа у исследуемых плодов была связана с нарушением пloidности – 50 (70%), из них на долю анеуплоидии приходится 96%. Числовые нарушения отдельных хромосом связаны с нарушением расхождения хромосом в мейозе или в митозе. Изменение числа аутомсомных хромосом (13-й, 18-й, 21-й) составило 79%, гоносомных (половых хромосом) – 21%.

Несмотря на доминирование в спектре хромосомных нарушений трисомии 21-й хромосомы (36%) в виде различных цитогенетических вариантов, эффективность дородовой диагностики с. Дауна в РС (Я) невысокая – 20%. Полиморфизм мутаций 21-й хромосомы в пренатальном периоде не отличается от таковых в постнатальном периоде и представлен регулярной (81%) и мозаичной (4%) формами трисомии, транслокационными формами различного происхождения (15%).

Другие аутомсомные синдромы были представлены трисомиями 18-й (с. Эдвардса) и 13-й (с. Патау) хромосом – 29%. Высокая частота диагностики этих синдромов во внутриутробном периоде развития обусловлена наличием множественных пороков развития, выявляемых ультразвуковым исследованием. Цитогенетическими методами исследования кариотипа у плодов и новорожденных установлена эффективность пренатальной диагностики самых частых аутомсомных синдромов: с. Эдвардса – 82%, с. Патау – 100%.

Геномные мутации по половым хромосомам были представлены трисомиями X- или Y- хромосом, и моносомией X- хромосомы. Гоносомные синдромы в большинстве случаев не

сопровождаются грубыми пороками развития. Диагностика этих синдромов у больных осуществляется в основном в периоде полового созревания из-за нарушения развития вторичных половых признаков [7]. Тем не менее в практике медико-генетической консультации эти заболевания были диагностированы и у плодов, которые при ультразвуковом исследовании в 70% случаев имели пороки и отклонения во внутриутробном развитии. Остальные оказались случайной находкой при анализе кариотипа в культуре клеток провизорных органов плода у возрастных женщин.

Из зарегистрированных 15 цитогенетических вариантов синдрома Шерешевского-Тернера в наших исследованиях у плодов диагностированы два варианта: регулярная форма моносомии X-хромосомы (75%) и мозаичная форма, установленная по клеткам экстраэмбриональных структур на раннем сроке беременности.

Отклонения в развитии половой системы могут быть обусловлены мутациями не только на хромосомном, но и на геномном уровне. В наших исследованиях у плода с синдромальным диагнозом кампомиелическая дисплазия ультразвуковым исследованием наряду с характерными пороками развития установлено формирование наружных половых органов по женскому типу при мужском кариотипе: 46,XY,fem[5].

Некоторые формы полиплоидии совместимы с внутриутробным развитием. В наших исследованиях триплоидия, чаще связанная с диандрией (оплодотворение яйцеклетки диплоидным сперматозоидом либо двумя сперматозоидами), была представлена в виде 69,XXX. Другой формой полиплоидии у зародышей человека является тетраплоидия, возникающая в результате удвоения диплоидного набора хромосом из-за нарушения кариотомии (деления ядра) или цитотомии (деления клетки). Тетраплоидия встречается в единичных случаях вплоть до стадии бластоцисты и элиминируется уже во время имплантации [2]. Тем не менее мозаичная форма тетраплоидии (mos 92,XXXX/46,XX) была установлена в наших исследованиях при анализе кариотипа истинных плодных клеток. При ультразвуковом исследовании у плода с данной формой полиплоидии был выявлен порок развития центральной нервной системы – экзэнцефалия (отсутствие костей свода черепа и мягких покровов головы, вследствие чего большие полушария располагаются открыто на основании

черепа в виде узлов, покрытых мягкой оболочкой).

Структурные изменения хромосом, возникающие в результате внутри- и межхромосомных перестроек, выявлены у 20 плодов (28%). Преобладают Робертсоновские транслокации (40%), сопровождающиеся слиянием длинных плеч акроцентрических хромосом из различных групп (D,G), из них между группами D/G – 63%, D/D – 37%. Удельный вес реципрокных транслокаций, при которых происходит взаимный обмен фрагментами между негомоллогичными хромосомами без нарушения генного баланса, составил 20%. Среди них зарегистрирована редкая, к тому же и наследуемая перестройка, при которой произошел обмен между целыми плечами 3 хромосом (11, 17, 19-й). Нереципрокные транслокации, при которых отмечается несбалансированный кариотип в виде избытка (частичной трисомии) или недостатка (частичной моносомии) генетического материала, диагностированы в 15% случаев. Наибольший удельный вес составили частичные моносомии (67%). Маркерные хромосомы, не поддающиеся идентификации цитогенетическим методом, выявлены в 25%.

Мутации хромосом, приводящие к регулярным и мозаичным формам хромосомных заболеваний, могут происходить соответственно в половых клетках (гаметах) у родителей или зиготе. В подавляющем большинстве (90%) мутации хромосом возникли в гаметах у родителей. При регулярной форме во всех клетках наблюдается хромосомная аномалия. Небольшая часть (8%) хромосомных болезней явилась результатом нарушения деления зиготы и была представлена мозаичной формой, при которой отмечалось наличие нескольких клонов клеток с разной хромосомной конституцией. Межклеточное различие набора хромосом также может вызывать и химеризм, при котором зародыш развивается после слияния зигот с разным набором гоносом (46,XX/46,XY). В наших исследованиях лишь в единичном случае выявленный химеризм (1%) в лимфоцитах плодной крови явился причиной истинного гермафродитизма у плода.

Также цитогенетический анализ позволяет определить поколение, в котором возникла мутация. Большая часть (86%) мутаций возникла de novo в гаметах здоровых родителей, поэтому вызванные ими хромосомные болезни были представлены спорадическими формами. К их числу относятся

не только геномные мутации и часть структурных aberrаций, но и мозаичные формы анеуплоидий.

Наследуемые формы хромосомной патологии были установлены в 14% случаев и в основном они были связаны с наличием в кариотипе у родителей структурных перестроек хромосом – робертсоновских и реципрокных транслокаций. Носительство хромосомных aberrаций у родителей в 40% случаев было выявлено впервые в ходе проведения инвазивной цитогенетической диагностики.

Пренатальная диагностика позволяет предоставить семье информацию о хромосомном статусе плода после цитогенетического обследования и существующих на сегодняшний день методов профилактики некорректируемой наследственной патологии. Результат пренатального цитогенетического исследования влияет на решение семей о вынашивании беременности. При наличии в кариотипе у плодов наследуемых сбалансированных перестроек (10%) и малой доли маркерных хромосом (3%) женщины сохранили беременность по рекомендациям врачей-генетиков. Учитывая неблагоприятный витальный прогноз для жизни будущего ребенка с хромосомным заболеванием, сопряженным с инвалидизацией и высокой смертностью, прервано с согласия семьи по медицинским показаниям 87% беременностей.

В зависимости от типа и формы мутаций хромосом, устанавливаемых цитогенетическим методом, определяется генетический груз - вероятность повторного риска рождения больного ребенка с хромосомной аномалией. Предоставление семьям с различными генетическими рисками помощи в принятии решения по планированию дальнейших беременностей является одной из главных задач медико-генетического консультирования. С внедрением пренатальной цитогенетической диагностики в РС (Я) стало возможным проведение инвазивного обследования женщинам, особенно со средним и высоким риском, при каждой беременности на раннем сроке (10 недель) для определения сбалансированности кариотипа будущего ребенка.

В течение 10 лет на пренатальную диагностику обратилось 60 семей с наличием в анамнезе ребенка / плода с хромосомной болезнью или носительства структурных перестроек в кариотипе. Проведена инвазивная цитогенетическая диагностика 48 семей

(67%) из различных групп риска. 11 семей (18%) относились к группам со средним и высоким риском повторного хромосомного заболевания у детей, из них 82% прошли инвазивное обследование. 10% женщин с несколькими повторными беременностями воспользовались пренатальной диагностикой, в основном (67%) из группы риска по наследуемым формам хромосомных болезней.

### Заключение

При стандартном кариотипировании исключается носительство всех геномных мутаций и многих структурных aberrаций, что позволяет исключить хромосомные болезни с вероятностью более 99%. Но в то же время в практике отдела пренатальной цитогенетической диагностики лаборатории МГК существовали некоторые сложности для пренатального цитогенетического анализа.

Для уточнения происхождения хромосомных aberrаций у плода необходимо обследование кариотипа родителей, имеющее важное значение не только для диагностики при настоящей беременности, но и для прогноза здоровья будущих детей. За 10-летний период проведения инвазивной диагностики в республике не выяснено происхождение сверхчисленных маркерных хромосом и хромосомных перестроек в 7% случаев в результате отказа от цитогенетического обследования одного из родителей.

Определение природы маркерных хромосом представляет значительные трудности в диагностике не только в пренатальном, но и в постнатальном периоде, так как требуется большой арсенал методических приемов: метод Ag – окраски, молекулярно-цитогенетический метод Fish с рДНК-зондами и различными центромероспецифическими ДНК-зондами, различные методы FISH, молекулярно-генетическое тестирование сегментной однородительской дисомии. В пренатальной диагностике идентификация даже семейных форм носительства маркерных хромосом имеет принципиальное значение для тактики дальнейшего ведения беременностей [1,4,7]. В наших исследованиях в 4% случаев требовалась идентификация маркерных хромосом для установления фенотипических корреляций с последующим уточнением или описания новых хромосомных синдромов, в 3% - опре-

деление относительной нейтральности сателлитных маркерных хромосом.

Для диагностики однородительской дисомии (ОРД), возникающей при наследовании двух гомологичных хромосом только от одного родителя, требуется использование дополнительно молекулярно-генетических методов исследования [6]. В практике отдела пренатальной диагностики в установлении ОРД по некоторым хромосомам (7,14,15), содержащим кластеры импринтированных генов, понадобилось 16 беременных женщин (1% от общего числа обследованных). К группам риска по выявлению ОРД у плодов относились женщины, у которых в ходе пренатальной диагностики был установлен ограниченный плацентарный мозаицизм (69%), плоды с носительством наследуемых робертсоновских транслокаций (12%) и сверхчисленных маркерных хромосом (19%).

Таким образом, помимо применения классического цитогенетического метода в пренатальной диагностике хромосомных аномалий возникает необходимость в использовании высокотехнологичных методов генетических исследований для тактики ведения беременностей. В диагностике редких и сложных хромосомных aberrаций большое значение имеет организация этих исследований на уровне Федеральных центров медико-генетической службы РФ, согласно приказу МЗ РФ № 316 от 1993 г.

### Литература

1. Айламазян Э.К. Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней / Айламазян Э.К., Баранов В.С. // -М.: МЕДпресс-информ, 2006. - С.271-276.
2. Баранов В.С. Цитогенетика эмбрионального развития человека / Научно-практические аспекты / Баранов В.С., Кузнецова Т.В. // - СПб: Издательство Н-Л, 2007. - 640 с.
3. Бочков Н.В. Клиническая генетика / Бочков Н.В. // -М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. -С.160-163.
4. Ворсанова С.Г. Медицинская цитогенетика / Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышев В.Н. // Мед-практика -М., 2006. - С.211.
5. Козлова С.И. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование / Козлова С.И., Демикова Н.С. // Товарищество научных изданий КМК, -М, 2007. - С. 106-107.
6. Назаренко С.А. Однородительские дисомии и болезни геномного импринтинга / Назаренко С.А., Саженова Е.А. // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Выпуск 7. - Новосибирск: Альфа Виста, 2005.-С. 119-123.
7. Назаренко С.А. Цитогенетика человека и хромосомные болезни / Назаренко С.А., Яковлева Ю.С. // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Выпуск 7. - Новосибирск: Альфа Виста, 2005.-С. 42-48.
8. Прозорова М.В. Хромосомные болезни / Прозорова М.В. // СПбМАПО, 1997.-С. 18.

О.Г. Сидорова, С.К. Кононова, С.К. Степанова, В.А. Захарова,  
С.А. Федорова, В.Л. Ижевская, Э.К. Хуснутдинова

## ОСОБЕННОСТИ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ СПИНОЦЕРЕБЕЛЛЯРНОЙ АТАКСИИ 1-го ТИПА И МИОТОНИЧЕСКОЙ ДИСТРОФИИ В ПРАКТИКЕ МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСУЛЬТАЦИИ ЯКУТИИ

УДК 616-056.7 : 174

В статье представлены данные по пренатальной диагностике наследственных заболеваний экспансии: спиноцеребеллярной атаксии 1-го типа и миотонической дистрофии. Обсуждаются особенности медико-генетического консультирования семей, обратившихся за медико-генетической помощью.

**Ключевые слова:** Наследственные заболевания, медико-генетическое консультирование, пренатальная диагностика

In the article data on prenatal diagnostics of hereditary diseases of expansion: spinocerebellar ataxia I type and myotonic dystrophy are presented. Features of medical-genetic consultation of the families which have addressed for the medical-genetic help are discussed.

**Keywords:** hereditary diseases, medical-genetic consultation, prenatal diagnostics.

### Введение

Заболевания с динамическими мутациями относятся к особой группе наследственных болезней с экспансией тринуклеотидных повторов в патологических аллелях, характеризуются поздней манифестацией и прогрессирующим нейродегенеративным процессом. Исследование динамических мутаций отличается различными пенетрантностью, фенотипическими проявлениями, импринтингом, явлением антиципации – нарастанием тяжести проявления заболевания в последующих поколениях. Из данной группы наследственных заболеваний в Якутии с высокой частотой встречаются спиноцеребеллярная атаксия 1-го типа (СЦА1) – 38,6:100000 [7], миотоническая дистрофия (МД) – 21,3:100000 [5], окулофаренгиальная дистрофия (ОФМД) – 8,8 : 100000 [4].

Высокая заболеваемость СЦА1 и МД и необходимость профилактики данных заболеваний составляют одну из сложнейших проблем медико-генетической службы Якутии [2,3]. В статье анализируется первый опыт практического применения пренатальной диагностики заболеваний с динамическими мутациями, распространенными в Якутии, на примере СЦА1

и МД. Как оказалось, в процессе пренатального медико-генетического консультирования необходимо учитывать множество факторов, влияющих на принятие решения родителями о прохождении пренатальной диагностики. Пренатальному тестированию на наиболее ранних сроках беременности препятствуют, в основном, организационные факторы, такие как дороговизна расходов на проезд до г. Якутска, отсутствие диспансеризации семей с наследственными болезнями в улусах, слабая подготовка врачей в области медицинской генетики и низкая информированность пациентов. Принятие сложных решений женщиной происходит в соответствии с её уровнем образования, возрастом, опытом общения с врачом-генетиком, личными жизненными установками и т.д.

Повышение эффективности медико-генетического консультирования требует наряду с разработкой новых методов диагностики, изучения подходов к способам сообщения семьям полученной информации, методическим и этическим аспектам консультирования (директивности - недирективности, уважению решения пациента, добровольности - обязательности тестирования, кому должна быть доступна генетическая информация и др.) [2, 6].

### Материалы и методы

По данным Регистра наследственных и врожденных заболеваний медико-генетической консультации Перинатального центра РБ№1-НЦМ, на диспансерном учете состояло 147 больных СЦА1 и 86 доклинических носителей мутации СЦА1 из 33 семей и 111 больных с МД из 49 семей [1]. Пренатальная диагностика заболеваний с динамическими мутациями впервые была осуществлена в 2002 г. в отделе пренатальной диагностики МГК. За шесть лет наблюдений на пренаталь-

ное медико-генетическое консультирование обратилось 46 беременных из семей,отягощенных наследственными болезнями с динамическими мутациями (СЦА1 и МД). Из них группа беременных из семей, отягощенных СЦА1, составила 30 женщин, группа по МД – 16 женщин. Возраст обратившихся на пренатальное медико-генетическое консультирование составлял от 20 до 40 лет, все женщины саха по национальности. Количество обращений семей на пренатальную диагностику с СЦА1 составляло в среднем 7-8 случаев в год, а МД – 2-3 семьи в год. Пациентки с СЦА1 и МД были в основном из районов накопления динамических мутаций в Якутии: Усть-Алданского, Таттинского, Мегино-Кангаласского, Амгинского, Сунтарского и Нюрбинского улусов. Количество женщин с СЦА1 - 18 (39,1%), проживающих в г. Якутске, было больше по сравнению с беременными с МД - 6 (13,0%). Из северных улусов (Абыйский, Среднеколымский), где наблюдается очень высокий уровень заболеваемости на пренатальное консультирование обратились – 1 беременная из семьи с СЦА1 и 1 – из семьи с МД.

Пациенткам на различных сроках беременности (от минимального срока 9 нед. до максимального 22 нед.) проводилась абдоминальная инвазивная процедура хорионбиопсии. Из ворсин хориона выделялась ДНК по стандартной методике с дальнейшей детекцией мутации у плода с помощью ПЦР [8].

Генетическое консультирование беременных с СЦА1 и МД, направленных на ПД, проходило в несколько этапов: 1) сбор анамнеза, сверка родословной по регистру наследственных болезней, контрольное УЗИ – обследование, информирование по заболеванию, возможность (выгода/риск) пренатальной диагностики, получение информированного согласия (ИС) на проведение

**СИДОРОВА Оксана Гаврильевна** – врач – генетик МГК ПЦ РБ №1-НЦМ, тел. 39-54- 46; **КОНОНОВА Сардана Кононовна** – к.б.н., с.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, komsard @ Rambler.ru; **СТЕПАНОВА Светлана Кимовна** – врач-лаборант – биолог МГК РБ№1 – НЦМ; **ЗАХАРОВА Валентина Аркадьевна** – врач-лаборант МГК РБ№1 – НЦМ; **ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна** – д.б.н., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; **ИЖЕВСКАЯ Вера Леонидовна** – д.м.н., проф., зам. директора по научной работе МГНЦ РАМН (г. Москва); **ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна** – д.б.н., проф., член-корр. АН Республики Башкортостан, зав. отделом геномики Института биохимии и генетики УНЦ РАН.

процедуры ПД; 2) процедура хорион-биопсии и наблюдение за состоянием беременной в дневном стационаре МГК; 3) консультирование по результатам ПД, решение беременной о дальнейшем вынашивании плода в случае положительного результата ДНК-тестирования, получение ИС на прерывание или сохранение беременности.

### **Результаты и обсуждение** **Пренатальная диагностика** **СЦА1**

На консультацию по поводу проведения пренатальной диагностики за 2002 по 2007 гг. обратилось 30 (65,2%) семей, отягощенных СЦА1. Из 30 женщин 29 (63,0%) (за исключением одной) не имели клинически выраженных симптомов заболевания, при этом 15 (32,6%) женщин были носительницами мутации СЦА1 по линии матери, 7(15,2%) – по линии отца и у 8 (17,4%) женщин партнеры были из отягощенных семей. После предварительного консультирования с врачом – генетиком 12 (26,1%) семей отказались от дородового тестирования плода по различным причинам, мы рассмотрели и обсудили некоторые из них. Например, две беременные из разных семей проходили пресимптоматическую диагностику СЦА1 непосредственно перед процедурой пренатальной диагностики, результаты ДНК-тестирования показали у них носительство мутации СЦА1. В обоих случаях женщины были не в состоянии вынести двойной психологический стресс – знание о носительстве мутации и необходимость тестировать плод. В других случаях свой отказ женщины мотивировали желанием не знать заранее генетический статус желанного ребенка. В некоторых случаях после получения предварительного согласия на ПД отмечалась неявка женщин на процедуру без объяснения причин, но, как оказалось впоследствии, у двух женщин произошел самопроизвольный выкидыш, что, возможно, явилось следствием сильной морально-психологической нагрузки. Следует отметить, что на решение женщин, являющихся доклиническими носителями мутации СЦА1, заметное влияние оказывали партнеры, так, в одном случае беременная, по ее словам, согласилась на ПД под давлением мужа, в другом – женщина отказалась от ПД именно по настоянию супруга, в то время как она сама была бы не против тестирования плода. В 8(17,4%) семьях причинами обращения беременных были принадлежность партнеров к отягощенным

семьям, но в 3 случаях ДНК-тестирование показало отсутствие мутации у мужчин и, соответственно, необходимость в дальнейшем пренатальном тестировании плода отпала.

18 (39,1%) женщин дали свое согласие на пренатальное ДНК-тестирование плода. Здесь следует отметить случай технической ошибки персонала лаборатории, когда для одной согласившейся на ПД пациентки результат ДНК-тестирования не был получен по причине обработки материала хориона гепарином, ингибировавшим полимеразную цепную реакцию, и в дальнейшем, от повторной ПД пациентка отказалась. Таким образом процедуру ПД прошли 17 беременных.

По результатам ДНК-диагностики в 8 (17,4%) случаях было показано отсутствие мутации у плодов, все беременности были пролонгированы и закончились родами. В 9 (19,5%) случаях анализы обнаружили наличие патологически удлиненной аллели у плодов, из них 8 (17,4%) женщин высказали желание прервать беременность и 1 (2,2%) женщина отказалась от прерывания после получения положительного ДНК-теста.

Наиболее значимыми проблемами при пренатальной диагностике наследственных заболеваний является срок беременности при обращении в генетическую консультацию и срок прерывания беременности в случае обнаружения патологии у плода. Особенно остро этот вопрос возникает при поздне манифестирующих болезнях. В нашей практике 22 (47,8%) обратившихся пациентки находились в первом триместре беременности, но всё же 8 (17,4%) женщин обратились за помощью в поздних сроках. Из числа согласившихся на процедуру инвазивная ПД в ранних сроках (до 12-14 нед.) была проведена у 13 (28,3%) беременных, в 5 (10,8%) случаях процедуру осуществили на поздних сроках (25-26 нед.) беременности. Прерывание беременности в 12-14 недель осуществили у 7 (15,2%) женщин, а в 1 (2,2%) случае прерывание плода-носителя мутации СЦА1 по настоятельному желанию пациентки было проведено в 22 недели беременности. По нашему мнению, необходимо обсудить вопрос об этической допустимости прерывания плода с поздне манифестирующим наследственным заболеванием во втором и третьем триместре беременности, так как это имеет не только тяжелые морально психологические последствия для женщины, но и угрожает акушерскими осложнениями

с неблагоприятными последствиями для её будущей репродукции. Важным аспектом пренатального медико-генетического консультирования является сохранение доверительных отношений между врачом и пациентом, поэтому положительным моментом в нашей практике явилось то, что 4 (8,7%) пациентки прошли пренатальное тестирование дважды.

### **Пренатальная диагностика МД**

На консультацию по поводу проведения пренатальной диагностики за период 2002 - 2007 гг. обратилось 16 (34,8%) семей, отягощенных МД. Беременные с МД, в отличие от пациенток с СЦА1, к моменту обращения на ПД в большинстве своем уже имели клинические признаки миотонической дистрофии, при этом 3 (6,5%) женщины были отягощены МД с материнской стороны родословной, 11 (23,9%) – по отцу, а 2 (4,3%) клинически здоровые женщины имели партнёров из семей, отягощенных МД. По сравнению с СЦА1 процент отказов от ПД при МД был небольшим, данный факт мы связываем с тем, что на согласие женщины пройти дородовую диагностику в большой степени влияли родственники. Известно, что одним из множества клинических признаков миотонической дистрофии является общая астеничность больного и снижение интеллекта в некоторой степени, поэтому беременной с МД бывает трудно принять самостоятельное важное решение о ПД. Здесь возникают наиболее сложные этические и правовые вопросы, касающиеся пренатальной диагностики МД, а также предпосылки к нарушению прав пациента. При оформленной инвалидности многие больные МД являются дееспособными, то есть не имеют официальных опекунов, следовательно они имеют право на самостоятельное решение по поводу проведения ПД и право подписи информированного согласия. Однако в подавляющем большинстве случаев больные миотонической дистрофией находятся в сильно зависимом положении от родственников, заботы о них и их детях ложатся на здоровых членов семьи или рода. Вполне резонно, что в такой ситуации родственники активно влияют на решения, принимаемые больными МД. Принцип конфиденциальности также теряет всякий смысл. Интересным представляется то, что 12 женщин из 16 случаев обращений на ПД были из двух больших родословных. Здесь большую роль сыграли наиболее активные члены семьи, информировавшие весь род о

возможностях пренатальной диагностики. Следует отметить, что в 2 (4,3%) случаях пациентки после проведения ПД с ДНК положительным результатом отказались от прерывания пораженными плодами, в результате родились дети с врожденной формой МД.

### Выводы

1. При проведении пренатальной диагностики наследственных поздно манифестирующих заболеваний необходимо придерживаться международных этических правил.

2. При пренатальной диагностике СЦА1 как поздне манифестирующего наследственного заболевания возникает этический принцип соблюдения срока проведения процедуры ПД в 1-триместре беременности и необходимость ввести этическое правило отказа прерывания плода во 2-м и 3-м

триместрах беременности для избежания осложнений и сохранения репродуктивной функции женщины.

3. Особенностью медико-генетического консультирования МД является неизбежное вовлечение родственников беременной в процесс информирования и принятия сложных решений для семьи. Данный факт следует принять как допустимую этическую норму для больных с МД, обратившихся за медико-генетической помощью.

### Литература

1. Генетико-эпидемиологические и социально-экономические аспекты наследственной этноспецифической патологии в Якутии / Н.Р. Максимова [и др.] // Медицинская генетика. -2008. -Т.7. -№10(76). -С.35-43.

2. Иванов В.И. Основные биоэтические проблемы генетического тестирования / В.И. Иванов, В.Л. Ижевская // Биомедицинская этика. Вып.3. Под ред. В.И. Покровского, Ю.М. Лопухина. М.: Медицина, 2002. -С.77-94.

3. К вопросам профилактики спиноцереbellарной атаксии 1 типа в Якутии / С.К. Кононова [и др.] // Якутский медицинский журнал. 2003. -№1. -С.13-16

4. Клинико-генеалогическая и молекулярно-генетическая характеристика окулофарингеальной миодистрофии в Республике Саха (Якутия) / Н.Р. Максимова [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. -2008. -№6. -С.32-35.

5. Миотоническая дистрофия в РС(Я): популяционные особенности и подходы в ДНК-диагностике / А.Л. Сухомясова [и др.] // Якутский медицинский журнал. -2003. -№2. -С.12-17.

6. Проблемы пренатального медико-генетического консультирования моногенных болезней с динамическими мутациями в Якутии / О.Г. Сидорова [и др.] // Якутский медицинский журнал. -2007. -№1(17). -С.33-36.

7. Спиноцереbellарная атаксия первого типа в Якутии: распространенность и клинико-генетические сопоставления / Ф.А. Платонов [и др.] // Медицинская генетика. -2004. -№5. -С.242-248.

8. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA / C.C. Mathew // Methods in molecular biology. Human Press. -1984. -Vol.2. -P.31-34.

Т.Я. Николаева, Т.Е. Попова

## ДИСПАНСЕРИЗАЦИЯ БОЛЬНЫХ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК 575.17:599.9

Проведено изучение распространенности и эффективности диспансеризации нейродегенеративных заболеваний в Республике Саха (Якутия). Результаты, полученные из анализа работы врачей-неврологов и данных неврологического отделения РБ№2-ЦЭМП в сравнении с данными РГРН и ВП, свидетельствуют о неполном охвате диспансерным наблюдением больных с нейродегенеративными заболеваниями. Самая высокая заболеваемость наблюдается в Абыйском и Аллаиховском улусах, в связи с высоким распространением СЦА среди коренного населения. По частоте встречаемости на первом месте находится СЦА 1 (42,9%), затем следуют миотоническая дистрофия (20,9%), болезнь Паркинсона (16,3%).

**Ключевые слова:** нейродегенеративные заболевания, распространенность, диспансеризация.

We studied the prevalence and efficiency of medical supervision of neurodegenerative diseases in Yakutia. The results of neurologists work and data of neurological department of Republic Emergency Centre testify to incomplete scope of medical supervision of patients with neurodegenerative diseases. Highest frequency of neurodegenerative diseases is observed in Abiyskiy and Allaikhovskiy districts among the native population.

**Keywords:** neurodegenerative diseases, prevalence, medical supervision.

Нейродегенеративные заболевания приобрели особую актуальность, как в социальном, так и в медицинском плане в связи с достаточно широкой распространенностью, трудностями в клинической диагностике, неуклонно прогрессирующим течением, высоким процентом инвалидизации и фатальностью исходов. Значительная часть этих болезней относится к наследственным болезням нервной системы (НБНС) и передается по аутосомно-доминантному или рецессивному типу.

С внедрением «Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии» (РГРН-ВП) на базе медико-генетической консультации РБ №1 - Национального центра медицины проведена огромная работа, которая позволила оценить

общий груз наследственной патологии, изучить частоту различных форм заболеваний, выявить распространенность некоторых из них в различных этнических группах [5,7,8]. Проведены популяционно-генетические исследования некоторых форм наследственных заболеваний [2,3], 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: спиноцереbellарная атаксия I типа (СЦА I типа), миотоническая дистрофия, окулофарингеальная мышечная дистрофия [2,7].

Большинство НБНС носит тяжелый прогрессирующий характер, приводит к ранней инвалидизации. Поэтому своевременное выявление и направление в МГК РБ№1-НЦМ, разработка наиболее эффективных методов медико-генетического консультирования,

включающих ДНК-диагностику, в том числе пренатальную и пресимптоматическую, направленную на профилактику, имеет большое социально-экономическое значение.

Многие НБНС являются клинически и генетически гетерогенными, что значительно затрудняет их дифференциальную диагностику. На проявление патологического гена оказывают влияние внешняя среда и другие гены данного организма, называемые модифицирующими. Поэтому не у всех носителей патологического гена он может проявиться фенотипически, да и проявление его в фенотипе бывает разным. Генами-модификаторами и влиянием внешней среды определяются пенетрантность и экспрессивность данного гена. Под пенетрантностью понимается процент индивидуумов с проявившимся в фенотипе геном, а под экспрессивностью - степень выраженности признака.

Как правило, ген обладает плейотропным действием, т. е. оказывает

влияние не только на какое-либо одно свойство, но, в известной степени, и на другие, что порождает большую изменчивость клинических проявлений заболевания. Отмечается и временная плейотропия, т. е. различное проявление генотипического фактора в зависимости от времени начала развития болезни. Так, при гепатоцеребральной дистрофии, развившейся в возрасте до 10 лет, на первый план выступает цирроз печени, в возрасте до 20 лет – мышечная ригидность, а развившейся после 30 лет – гиперкинезы. При хорее Гентингтона, развившейся в возрасте 35 – 40 лет, на первый план выступает хорейформный синдром, а если она развивается в детстве, синдром общей ригидности или миоклоническая эпилепсия.

Один и тот же клинический синдром может быть обусловлен разными генами. Это явление носит название генокопии. Факторы внешней среды в свою очередь могут вызывать изменение фенотипа, как и патологический ген (явление фенокопии). Так, невральная амиотрофия Шарко-Мари-Туса и спастическая параплегия Штрюмпеля могут наследоваться аутосомно-доминантно, аутосомно-рецессивно, а также сцепленно с половой хромосомой [1]. Эти заболевания связаны с различными генами. Из-за модифицирующего влияния генов и факторов внешней среды отмечается большое разнообразие патологических состояний, из-за чего бывает трудно дифференцировать два разных наследственных заболевания. Так, abortивную форму невральной амиотрофии Шарко-Мари-Туса бывает трудно дифференцировать с болезнью Фридрейха. В обоих случаях наблюдается арефлексия и деформация стоп. Различать их можно только на основании изучения родословной больных.

Явление фенокопии могут проиллюстрировать следующие примеры ненаследственных заболеваний, которые клинически напоминают наследственные. Невральную амиотрофию напоминают хронический полиневрит, множественные мононевропатии, миопатические синдромы наблюдаются при гипертиреозе, гипотиреозе, первичном гиперальдостеронизме и злокачественных заболеваниях легких, синдром бокового амиотрофического склероза наблюдается при цервикальной миелопатии на почве остеохондроза позвоночника, болезнь Штрюмпеля имеет общие симптомы со спинальной формой рассеянного склероза и т.д.

Перечисленные факты показывают трудности диагностики наследственных заболеваний нервной системы,

хотя законы генетики кажутся простыми. Для большинства МЗ 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 в отдельных регионах и этнических группах [4].

Актуальность изучения НБНС в Якутии определялась значительным своеобразием генофонда ее населения, формирование которого имеет длительную и сложную историю, а также высоким грузом наследственной патологии среди якутов. В Якутии, по данным Государственного комитета статистики РС(Я) 2008г., проживает 949 972 чел. Коренное население республики – якуты, численность которых составляет 432 290 чел. (45,5%).

Частыми наследственными заболеваниями условно принято считать такие, распространенность которых составляет > 1: 50000 населения [1,4]. К ним относятся такие НБНС, как СЦА I типа, миотоническая дистрофия, окулофарингеальная мышечная дистрофия [3,6]. С развитием методов молекулярной генетики появилась возможность изучения молекулярных основ этих заболеваний, выявления популяционного разнообразия их генетических форм и генетических механизмов распространения в популяции якутов.

В целом выявление этно-территориальных особенностей распространенности нейродегенеративных заболеваний является основой для создания эффективной системы их мониторинга и разработки методов диагностики и профилактики, оптимальных для конкретного района.

Целью работы является изучение распространенности и эффективности диспансеризации дегенеративных заболеваний нервной системы в Республике Саха (Якутия).

## Материал и методы исследования

Материалом для исследований послужили годовые отчеты неврологов всех улусов РС(Я), г.Якутска, в которых дается список всех больных с НБНС, а также членов их семей. Ретроспективно изучены истории болезни всех больных с 2006 по 2008 г., находившихся на лечении в неврологическом отделении РБ №2 – Центра экстренной медицинской помощи с диагнозом, соответствующим нейродегенеративной патологии (НДП). В исследовании включены больные с достоверными диагнозами: СЦА I типа, миотоническая дистрофия, окулофарингеальная мышечная дистрофия, невральная амиотрофия Шарко-Мари-Туса, болезнь Фридрейха, бульбо-спинальная амиотрофия Кеннеди, спастическая семейная параплегия Штрюмпеля, хорей Гентингтона, болезнь Паркинсона.

## Результаты исследования

Изучены годовые отчеты по неврологической службе за 2008 г. из 33 улусов республики и г.Якутска, а также проводилась сверка с историями болезни неврологического отделения РБ№2-ЦЭМП за 2006-2008 г. По приказу по РБ№2-ЦЭМП от 2001 г. койки для больных с наследственными заболеваниями нервной системы находятся в неврологическом отделении. Всего на учете у неврологов улусов состоит 343 чел. с НБНС, за три года в неврологическом отделении пролечено 125 больных. Для оценки полноты охвата диспансеризацией по месту проживания пациентов сравнили с данными РГРНиВП [3]. Как видно из табл.1, данные, полученные из отчетов улусных неврологов и неврологического отделения РБ№2-ЦЭМП не совпадают с количеством больных в РГРНиВП. Наибольшие расхождения получены по миотонической дистрофии, которые можно объяснить отсутствием жалоб, неврологических проявлений, влияющих на жизнедеятельность и трудоспособность у пациентов, при наличии генетического дефекта.

Таблица 1

Сравнительное количество больных, состоящих на учете у невролога за 2006-2008 гг. и по данным РГРНиВП (Максимова Н.Р. с соавт., 2008 г.)

№	Диагноз	Состоит на учете у невролога	Состоит по данным РГРНиВП
1.	Спиноцеребеллярная атаксия I типа	170	210
2.	Миотоническая дистрофия	72	114
3.	Окулофарингеальная мышечная дистрофия	10	50
4.	Невральная амиотрофия Шарко-Мари-Туса	36	86
5.	Спастическая семейная параплегия Штрюмпеля	9	7
6.	Болезнь Паркинсона	56	0
7.	Бульбо-спинальная амиотрофия Кеннеди	2	4
8.	Хорей Гентингтона	5	1
9.	Атаксия Фридрейха	6	9

Таблица 2

Количество диспансерных больных с нейродегенеративной патологией и заболеваемость по улусам РС(Я) за 2008 г.

Улус	Численность нас.	Кол-во диспансерных больных с НДП	Заболеваемость на 1000 нас.
Абыйский	4483	22	4,9
Алданский	47135	1	0,02
Аллаиховский	3115	13	4,2
Амгинский	16459	16	0,97
Анабарский	4037	1	0,25
Булунский	9177	1	0,1
Верхневиллоийский	21275	3	0,14
Верхнеколымский	5006	7	1,4
Верхоянский	12390	8	0,65
Виллоийский	25581	18	0,7
Горный	11390	10	0,88
Жиганский	4072	-	-
Кобяйский	13501	5	0,4
Ленский	38548	19	0,5
Мегино-Кангаласский	31713	14	0,44
Мирнинский	83420	5	0,06
Момский	4615	3	0,65
Намский	22407	15	0,67
Нерюнгри	88250	2	0,02
Нижнеколымский	5254	1	0,2
Нюрбинский	24797	37	1,5
Оймяконский	13081	-	-
Олекминский	25960	9	0,35
Оленекский	4101	-	-
Среднеколымский	8057	7	0,87
Сунтарский	25651	5	0,2
Таттинский	16103	25	1,6
Томпонский	14865	7	0,5
Усть-Алданский	21765	10	0,46
Усть-Майский	10311	-	-
Усть-Янский	9035	-	-
Хангаласский	34897	25	0,7
Чурапчинский	20231	6	0,3
Эвено-Бытантайский	2787	3	1,1
Якутск	266503	68	0,26
Всего	949972	343	0,36

Одной из основных и частых форм НДП в практике клинической неврологии является болезнь Паркинсона (БП). В регистре не учтены больные с БП, тогда как особый интерес для современной медицинской генетики представляют популяционные и молекулярно-генетические исследования БП, имеющего многофакторную природу со значительным вкладом генетического компонента. Актуальность этих исследований определяется нерешенностью проблемы генетической основы патогенеза БП, существованием многочисленных моногенных форм заболевания, отсутствием информации о распространенности семейных и спорадических форм заболеваний в различных регионах и этнических группах. Распространенность данной патологии в разных странах мира составляет 100-200 чел. на 1000 населения [15], а в России – 80-100. Вопрос о генетической предрасположенности обсуждается неврологами давно.

Гипотеза о значении генетического фактора возникла на основании фактов обнаружения высокого процента больных паркинсонизмом среди родственников пробанда. Установлено, что для паркинсонизма характерна низкая пенетрантность патологических генов, характер наследования чаще аутосомно-доминантный с клинической манифестацией лишь у 25% носителей гена. Семейные случаи составляют не более 10% от общего числа случаев БП. В связи с этим назрела необходимость создания регистра болезни Паркинсона и синдрома паркинсонизма в целях улучшения диагностики и лечения пациентов.

Самая высокая заболеваемость НДП наблюдается в северных улусах, таких как Абыйский и Аллаиховский, в связи с высоким распространением СЦА среди коренного населения. Как известно, СЦА 1 типа является аутосомно-доминантным заболеванием, имеющим высокую распространенность среди якутов (38,6 на 100 тыс. якутов по сравнению 1-2 на 100 тыс. в мировом населении). В 1994 г. установлено молекулярная основа этого заболевания, связанная с мутацией гена атаксии (SCA 1), расположенного на шестой хромосоме [16]. Недостоверные данные получены по Усть-Алданскому улусу, что связано с отсутствием информации по наследственной патологии в отчете врача-невролога. В Оймяконском, Оленекском, Усть-Майском, Усть-Янском и Жиганском улусах на учете нет больных с нейродегенеративной патологией (табл.2). Это можно объяснить низкой выявляемостью, малочисленностью этих улусов, а также отсутствием в этих улусах неврологов.

В табл.3 представлена частота встречаемости НБНС среди диспансерных больных. Как видно, на первом месте по частоте находится СЦА I типа (42,9%), затем следуют миотоническая дистрофия (20,9%), болезнь Паркинсона (16,3%). Данные по БП не соответствуют истинной картине распространенности и заболеваемости, поскольку не всегда на уровне врачей первичного звена удается провести дифференциальную диагностику между синдромом паркинсонизма и БП. Это требует достаточно высокой квалификации врача. Данное обстоятельство также свидетельствует о необходимости создания единого регистра данной патологии.

Таким образом, предварительные результаты, полученные из отчетов врачей-неврологов и данных неврологического отделения РБ№2-ЦЭМП в сравнении с данными РГРН и ВП,

Таблица 3

Распределение диспансерных больных по нозологическим формам (абс./%)

№	Нозологическая форма	Кол-во диспансерных больных	% от общего кол-ва больных с НДП
1.	Спино-церебеллярная атаксия I типа	147	42,9%
2.	Миотоническая дистрофия	72	20,9%
3.	Болезнь Паркинсона	56	16,3%
4.	Невральный Шарко-Мари-Туса	36	10,5%
5.	Окулофарингеальная миодистрофия	10	2,9%
6.	Семейная параплегия Штрюмпеля	9	2,6%
7.	Атаксия Фридрейха	6	1,7%
8.	Хорея Гентингтона	5	1,5%
9.	Бульбо-спинальная амиотрофия Кеннеди	2	0,6%
	Итого	343	100%

свидетельствуют о неполном охвате диспансерным наблюдением больных с НДП. Для улучшения работы по выявлению и своевременному лечению больных с нейродегенеративными заболеваниями необходимо установить преемственность между неврологами и генетиками.

### Литература

- Иллариошкин С.Н., Руденская Г.Е., Иванова-Смоленская И.А. и др. Наследственные атаксии и параплегии. М.: МЕДпресс-информ. 2006. 416 с.
- Максимова Н.Р., Коротов М.Н., Николаева И.А. и др. Клинические и молекулярно-генетические аспекты окулофарингеальной миодистрофии в Республике Саха (Якутия) // Генетика и патология Вып. 8. / Под ред. В.П. Пузырева. Томск: Печатная мануфактура, 2007. С. 160-161.
- Максимова Н.Р., Сухомясова А.Л., Гуринова Е.Е. и др. Генетико-эпидемиологические и социально-экономические аспекты наследственной этноспецифической патологии в Якутии // Медицинская генетика. 2008. №10. С. 35-43.
- Наследственные болезни в популяциях человека / Под ред. Е.К. Гинтера. М.: Медицина, 2002. 304 с.
- Ноговицына А.Н., Максимова Н.Р., Ханды М.В., Алексеева С.П. Наследственная патология семей, обитавших в МГК Национального Центра Медицины Республики Саха (Якутия) с 1990 по 1998 год // Дальневост. мед. журн. 1999. № 1. С. 26-30.
- Платонов Ф.А., Иллариошкин С.Н., Кононова С.К. и др. Спиноцеребеллярная атаксия первого типа в Якутии: распространенность и клинико-генетические сопоставления // Мед. генетика. 2004. Т. 5. С. 242-248.
- Пузырев В.П., Максимова Н.Р. Наследственные болезни якутов // Генетика, 2008, т.44. №10. С.1317-1324.
- Goldfarb L.G., Vasconcelos O., Platonov F.A. et al., Unstable triplet and phenotypic variability of spinocerebellar ataxia type 1 // Ann. Neurol. 1996. V. 39. P. 500-506.
- Lunkes A., Goldfarb L.G., Platonov F.A. et al. Autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA 1) in Siberian Founder population: Assignment to the SCA 1 locus // Experimental Neurology 1994.- 126, 310-313.

А.Л. Сухомясова, К.К. Павлова, А.Н. Ноговицына, А.А. Петрова, Е.В. Тапьев, Г.Г. Дранаева, Л.И. Вербицкая

## РЕАЛИЗАЦИЯ ПРИОРИТЕТНОГО НАЦИОНАЛЬНОГО ПРОЕКТА «ЗДОРОВЬЕ»: МАССОВОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ НОВОРОЖДЕННЫХ НА НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ОБМЕНА В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК 616-036.22; 616/618; 61:575

В статье представлены мероприятия по организации массового обследования новорожденных на наследственные болезни обмена в Республике Саха (Якутия), первые результаты скрининга по расширенной программе в рамках приоритетного национального проекта «Здоровье».

**Ключевые слова:** скрининг, новорожденные, наследственные болезни

In article actions on the organization of mass inspection of newborns on hereditary illnesses of exchange in Republic Sakha (Yakutia), the first results of screening under the expanded programme within the limits of the priority national project "Health" are presented.

**Keywords:** screening, the newborns, hereditary illnesses.

Проведение массового обследования новорожденных (неонатальный скрининг) на наследственные болезни обмена является одной из задач медико-генетической помощи населению. Скрининг предполагает безотборное обследование, двухэтапность диагностики и имеет профилактическую направленность. Основная цель программ массового скрининга новорожденных на наследственные болезни – это раннее выявление заболевания на доклинической стадии и организация лечения. Программа включает следующие этапы: взятие биологического материала у всех новорожденных и доставка в лабораторию; лабораторная диагностика, уточняющая диагностика всех случаев с положительными результатами; лечение и диспансеризация больных, контроль за лечением; медико-генетическое консультирование семьи.

При выборе заболеваний для неонатального скрининга в соответствии с рекомендациями ВОЗ учитываются такие факторы, как тяжесть заболеваний, частота их распространения, простота и достоверность методов диагностики, наличие доступных и эффективных средств лечения. Скри-

нинг предполагает обследование всех новорожденных детей на наличие врожденных заболеваний, ведущих к младенческой смертности или инвалидизации, чего можно избежать, если с первых недель жизни начать лечение. Своевременное лечение с периода новорожденности позволяет предотвратить тяжелые проявления таких болезней, как умственная отсталость, слепота, отставание в физическом развитии и др.

Скрининг новорожденных на генетические заболевания существует с 1962 г., когда впервые в штате Массачусетс (США) стали проводить тестирование новорожденных на фенилкетонурию (ФКУ). В конце 1960-х гг. подобное тестирование новорожденных на ФКУ было распространено почти на все штаты США и некоторые страны Европы. В рамках многих программ было начато тестирование и на другие наследственные болезни – галактоземия, гомоцистинурия и др. [1]. В дальнейшем неонатальный скрининг широко распространился в мире.

В России массовое обследование новорожденных на ФКУ начато с 1985 г., на врожденный гипотиреоз (ВГ) – с 1993 г. [3]. Обследование на данные заболевания осуществляется по Федеральной целевой программе «Дети России». С 2006 г. в Российской Федерации начата реализация приоритетного национального проекта (ПНП) в сфере здравоохранения, были определены его основные направления и мероприятия, среди которых расширение обследования новорожденных детей дополнительно на адреногенитальный синдром (АГС), муковисцидоз (МВ) и галактоземию.

В Республике Саха (Якутия) неонатальный скрининг проводится с 1996 г. на 2 наследственных заболевания: фенилкетонурию и врожденный гипотиреоз. В рамках ПНП «Здоровье» с сен-

тября 2006 г. дополнительно введен скрининг новорожденных на адреногенитальный синдром, муковисцидоз и галактоземию.

### Материалы и методы

Материалом для исследования являются данные, полученные в результате обследования на ФКУ – 145099 и ВГ – 134469 новорожденных за период 1996-2008 гг., 31117 новорожденных на АГС, 31304 – на МВ, 30605 – на галактоземию в 2006 – 2008 гг.

Исследование проводилось в лаборатории медико-генетической консультации (МГК) Перинатального центра РБ №1-Национального центра медицины из сухих пятен крови на специальном фильтровальном бланке, взятых у доношенных новорожденных на 4-й день, у недоношенных – на 7-й день после рождения. Забор крови осуществляется во всех родовспомогательных учреждениях республики (35 административных территорий).

Обследование на АГС выполняется с помощью наборов «DELFLIA Neonatal 17 $\alpha$ -OH progesterone», на муковисцидоз – «DELFLIA Neonatal IRT», на галактоземию – «Neonatal Total Galactose» («Wallac Oy», Финляндия). На ВГ и АГС диагностика проводится методом иммунофлюоресценции с временным разрешением люминесценции, на МВ – методом флюоресцентного иммунного анализа с разрешением по времени, на галактоземию – методом флюоресцентного излучения оксидазы галактозы, на ФКУ – фосфоресцентным методом с временным разрешением «ФАВР». Процедура измерений строго соответствует инструкции набора. Оборудование для скрининга – лаборатория «DELFLIA» (Финляндия), в основе которой многофункциональный анализатор «Victor-2», было получено в июле 2006 г. по программе национального проекта «Здоровье».

**СУХОМЯСОВА Айталина Лукична** – к.м.н., зав. МГК РБ №1 – НЦМ, гл. внештатный генетик МЗ РС (Я), e-mail: AitalinaS@yandex.ru; **ПАВЛОВА Кюнна Константиновна** – врач-лаборант МГК РБ №1-НЦМ; **НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна** – к.м.н. врач-генетик МГК РБ №1-НЦМ, зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; **ПЕТРОВА Айталина Александровна** – врач-лаборант МГК РБ №1 – НЦМ; **ТАПЬЕВ Евгений Викторович** – м.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН; **ДРАНАЕВА Галина Гаврильевна** – к.м.н., гл. педиатр МЗ РС(Я); **ВЕРБИЦКАЯ Людмила Ильясовна** – к.м.н., зам. министра здравоохранения РС(Я) по охране материнства и детства.

### Мероприятия по организации неонатального скрининга в рамках приоритетного национального проекта «Здоровье» в РС (Я)

Эффективное выполнение всех этапов неонатального скрининга возможно только при директивной поддержке органов здравоохранения [3]. Министерством здравоохранения и социального развития Российской Федерации был издан приказ №185 от 22 марта 2006 г. «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания». С целью организации скрининга, внедрения новых методов, организации диагностической и лечебной помощи изданы: приказ Министерства здравоохранения РС (Я) от 20 марта 2006 г. 01-8/4-134а «О ходе реализации мероприятий раздела национального проекта «Здоровье» по обследованию новорожденных детей на наследственные заболевания», приказ РБ№1-НЦМ от 31 августа 2006 г. №01-01-08/91 «Об оказании медицинской помощи детям с муковисцидозом, адреногенитальным синдромом, галактоземией, врожденным гипотиреозом и фенилкетонурией, выявленным по неонатальному скринингу». Появилась возможность быстрой госпитализации детей для уточнения диагноза и лечения в специализированные стационары Перинатального и Педиатрического центров РБ№1–НЦМ. С целью совершенствования своевременной диагностики и полноценного лечения детей с наследственными заболеваниями были разработаны и разосланы в ЛПУ республики информационные письма.

Согласно приказу МЗ и СР РФ №342 от 5 мая 2006 г. «Об обучении специалистов, обеспечивающих массовое обследование новорожденных детей на наследственные заболевания» в 2006 г. 4 специалиста (2 врача-лаборанта, 1 врач-генетик и 1 эндокринолог) прошли тематическое усовершенствование на кафедре медицинской генетики РМАПО г.Москвы.

Вопросы внедрения новых методов скрининга, качества забора крови и сроков доставки обсуждаются на постоянно действующих семинарах министерства для руководителей неонатальной службы, руководителей по детству и родовспоможению муниципальных органов управления здравоохранением, ЦРБ. Проводятся совещания на уровне МЗ РС (Я) по организационным вопросам с участием главных специалистов по педиатрии, неонатологии, эндокринологии, сотрудников МГК.

Проведены семинары для врачей-неонатологов, педиатров, среднего

медицинского персонала республиканского уровня. На базе родильного отделения и МГК Перинатального центра РБ№1-НЦМ на рабочем месте проведено обучение среднего медицинского персонала из районов и городов республики, осуществляющих забор крови у новорожденных.

С целью обучения специалистов в рамках национального проекта в 2007 г. МЗ РС(Я) на базе РБ№1-НЦМ проведено выездное тематическое усовершенствование «Избранные вопросы медицинской генетики и неонатальный скрининг» Сибирского медицинского университета и НИИ медицинской генетики СО РАМН г. Томска, на котором обучены с получением удостоверений 36 специалистов республики, участвующих в неонатальном скрининге.

В рамках национального проекта врачами МГК проводится активная организационно-методическая работа: информационная, выступления с докладами на конференциях, совещаниях, циклах усовершенствования и сертификации.

### Результаты неонатального скрининга в РС (Я)

При начале скрининга в РС (Я) на фенилкетонурию и врожденный гипотиреоз в 1996 г. участвовали только 15 улусов (районов). В настоящее время участвуют все административные территории республики. Охват скринингом с 42% в первые годы его введения повысился до 99% (табл.1).

Фенилкетонурия - наследственное заболевание, связанное с дефицитом фермента фенилаланин-гидроксилазы, является наиболее распространенной аминокислотопатией. Частота ФКУ среди новорожденных в различных странах составляет в среднем 1:10000 и значительно варьирует в зависимости от популяции: от 1:6000 в Ирландии до 1:100000 в Японии [1]. Наследуется по аутосомно-рецессивному типу. В нелеченных случаях у больных развивается умственная отсталость и другие неврологические нарушения. С целью диагностики ФКУ определяется уровень фенилаланина в крови. Пороговым значением считается уровень ФА более 2,0 мг/дл.

Врожденный гипотиреоз (ВГ) является одним из частых врожденных заболеваний щитовидной железы у детей. Характеризуется снижением или отсутствием функции щитовидной железы, приводящим к задержке развития всех органов и систем. Ведущие клинические признаки нелеченного ВГ – задержка роста и психического развития, ведущая к умственной отсталости. В большинстве случаев (85-90%) имеет место первичный врожденный гипотиреоз. Среди случаев первичного гипотиреоза около 85% является спорадическими, 15% - наследственными [4]. Частота ВГ по России составляет 1:3700 – 1:4600 новорожденных [1]. Ранняя диагностика и заместительная терапия L-тироксином позволяют полностью предупредить отставание ребенка в нервно-психическом развитии. В крови новорожденного, взятой на фильтровальную бумагу, определяется содержание тиреотропного гормона (ТТГ). Пороговым значением для выявления ВГ считают уровень ТТГ>20 мЕд/л, все образцы с таким результатом должны быть повторно проверены. Концентрация ТТГ выше 50 мЕд/л позволяет заподозрить ВГ, а уровни ТТГ выше 100 мЕд/л с высокой степенью вероятности указывают на наличие заболевания [4]. Подтверждающая диагностика проводится путем определения ТТГ и свободного тироксина в сыворотке крови.

В РС (Я) за 1996-2008 гг. обследовано 134469 новорожденных на ВГ, по скринингу выявлен 31 ребенок с ВГ. Частота ВГ по скринингу составила 1:4337. На ФКУ за этот же период обследовано 145099 новорожденных. Выявлено 3 детей с ФКУ, все больные по национальности русские. Частота ФКУ среди обследованных по скринингу новорожденных в РС (Я) составила 1:48366 (без учета этнической принадлежности).

Адреногенитальный синдром (врожденная гиперплазия надпочечников) – спектр заболеваний, обусловленных дефектом ферментных систем, участвующих в биосинтезе стероидных гормонов надпочечников. 95% всех случаев заболеваний связаны с

Таблица 1

Обследование новорожденных по массовому скринингу в РС (Я) за 2006 – 2008 гг.

Год	Число родившихся*	Число обследованных (охват, %)				
		Фенилкетонурия	Врожденный гипотиреоз	Адреногенитальный синдром	Муковисцидоз	Галактоземия
2006	13733	13623 (99,2)	6998 (50,9)	5268 (38,4)	5450 (39,7)	3335 (24,3)
2007	15152	14931 (98,5)	14931 (98,5)	14931 (98,5)	14931 (98,5)	14931 (98,5)
2008	15243	15015 (98,5)	11054 (71,8)	10746 (69,8)	11183 (72,7)	10484 (68,1)

\* - Данные ЯРМИАЦ.

Таблица 2

Результаты обследования новорожденных на дополнительные наследственные болезни в РС(Я) по приоритетному национальному проекту «Здоровье» в 2006-2008 гг.

Заболевание	Обследовано	Вызвано на ретест, абс. (%)	Получено ретестов	Повышенные ретесты	Выявлено больных	Частота
Адреногенитальный синдром	31117	57 (0,18)	51	4	3	1:10372
Муковисцидоз	31304	281 (0,89)	246	14	-	-
Галактоземия	30605	184 (0,60)	163	1	-	-

дефицитом 21-гидроксилазы. Общая частота АГС этнически зависима. В Европе она составляет от 1:10000 до 1:15000 новорожденных [10]. Поздняя диагностика, несвоевременная и некорректная терапия приводят к тяжелым последствиям: гибели ребенка от сольтеряющих кризов, ошибкам в выборе половой принадлежности при выраженной вирилизации наружных гениталий у девочек, нарушениям роста и полового созревания, нарушениям репродуктивной функции. В основе скрининга лежит определение уровня 17-ОН-прогестерона в сухом пятне крови на фильтровальной бумаге, концентрация которого у новорожденных зависит от возраста, массы тела, сроков доношенности. По рекомендациям эндокринологов России, за пороговый уровень доношенных новорожденных (срок гестации больше 36 недель, масса тела больше 2,5 кг) принимают значения 17-ОНП 30,0 нмоль/л, у недоношенных при сроке гестации 33-36 недель (масса тела меньше 2,5кг) – 60,0 нмоль/л, при сроке гестации 23-32 недели – 100,0 нмоль/л [5].

На АГС по РС(Я) всего обследовано 31117 новорожденных (табл. 2). Повышение 17-ОНП по первичным тест-бланкам выявлено у 57 новорожденных (0,2%), из которых повторное обследование проведено 51 ребенку (89,5%). 1 новорожденный с повышенными результатами умер до проведения ретеста. Положительный ретест получен у 4 новорожденных, из них - 1 недоношенный, диагноз АГС уточнен в 3 случаях, выставлены смешанная и сольтеряющая формы АГС. Таким образом, предварительная частота АГС в РС(Я) составила 1: 10372.

Муковисцидоз (МВ) – частое моногенное аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутацией гена муковисцидозного трансмембранного регулятора (МВТР). Характеризуется поражением экзокринных желез жизненно важных органов и систем, развитием прогрессирующей патологии бронхо-легочной системы, синдрома нарушения кишечного всасывания и гипотрофии, имеет обычно тяжелое течение и прогноз. Распространен-

ность МВ варьирует в зависимости от популяции. В большинстве стран Европы и Северной Америки МВ встречается с частотой 1:2000 - 1:4000 новорожденных [2]. После картирования гена МВТР в 1989 г. анализ одной или более мутаций в гене МВТР включен в современные программы скрининга новорожденных [6]. На сегодняшний день выделено более 1000 мутаций гена, ответственных за развитие симптомов МВ [9]. Наиболее тяжелая и ранняя манифестация наблюдается у больных гомозигот по DF508, частота которой по России составляет 53% [2].

В качестве диагностического используется тест на иммунореактивный трипсиноген (ИРТ). При положительном результате скрининга (ИРТ>70 нг/мл) проводится повторное определение ИРТ. При повторно высоком уровне ИРТ (>40 нг/мл) необходимо проводить потовую пробу. У большинства детей, больных МВ, концентрация хлоридов натрия оказывается выше 80 ммоль/л, диагностическими считаются значения, превышающие 60 ммоль/л [7].

На муковисцидоз в РС(Я) обследовано 31304 новорожденных (табл. 2). Неонатальная гипертрипсиногемия (ИРТ>70 нг/мл) выявлена у 281 ребенка (0,9%). Ретест проведен 246 детям (87,5%). С повышенными первичными результатами не обследованы 35, из них 2 детей умерли до ретеста. Положительный ретест (ИРТ>40 нг/мл) имели 14 детей (0,04%). Потовая проба (методом титрования) была проведена 25 детям, больных не выявлено.

Галактоземия – группа заболеваний, обусловленных недостаточностью ферментов, участвующих в метаболизме галактозы. Массовый скрининг новорожденных направлен на выявление классической галактоземии (тип I) как наиболее тяжелой патологии, требующей неотложной коррекции. Тяжелая форма заболевания связана с мутациями в гене галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы (GALT) [8]. Известно более 60 мутаций в этом гене. Частота галактоземии в Европе колеблется от 1:18000 до 1:180000, в среднем 1:47000, в Японии - 1:667000. Если галактоземия не выявлена и не

излечена сразу после рождения, то это может привести к диарее, желтухе, печеночной недостаточности, гипогликемии, катаракте, задержке нейropsychического развития, септическим состояниям, смерти в течение нескольких недель. В ходе диагностического теста измеряется общий уровень галактозы (галактозы и галактоза-1-фосфатов). Пороговым значением для выявления галактоземии считается уровень галактозы более 7,0 мг/дл.

На галактоземию за 2006-2008 гг. по республике обследованы 30605 новорожденных. При этом неонатальная гипергалактоземия (>7 мг/дл) выявлена у 184 детей (0,6%). Повторное обследование проведено 163 детям (88,6%). Выявлен 1 ребенок с подозрением на галактоземию, проходит уточняющую диагностику.

Оценить частоту муковисцидоза и галактоземии в РС(Я) в настоящее время не представляется возможным.

### Заключение

Конечной целью любого скрининга является сохранение здоровья ребенка, т.е. правильное и своевременное лечение. Поэтому должна быть отработана четкая схема по проведению подтверждающей диагностики и лечению больного ребенка специалистами.

Эффективное выполнение неонатального скрининга возможно только при директивной поддержке органов здравоохранения и контроле качества проведения обследования новорожденных.

Необходимы меры по дальнейшему улучшению и повышению эффективности скрининга. Для улучшения регистрации, контроля необходимо введение автоматизированной системы обработки получаемой из ЛПУ информации, результатов анализов, что позволит создать республиканский регистр новорожденных и тем самым улучшить организацию неонатального скрининга.

### Литература

1. Барашнев Ю.И., Бахарев В.А., Новиков П.В. Диагностика и лечение врожденных и наследственных заболеваний у детей. - М.: «Триада-Х», 2004. - 560 с.
2. Капранов Н.И., Шабалова Л.А., Каширская Н.Ю. и др. Муковисцидоз (Современные достижения и проблемы): Методические рекомендации. - М.: Медпрактика-М, 2001. - 76 с.
3. Матулович С.А. Организация неонатального скрининга на наследственные болезни обмена в Краснодарском крае и первые результаты обследования новорожденных на адреногенитальный синдром, муковисцидоз и галактоземию//Медицинская генетика. - 2007. - Т.6. - №11(65). - С. 12-15.
4. Петеркова В.А., Безлепкина О.Б. Врожденный гипотиреоз. Неонатальный скрининг, диагностика и лечение / Под редакцией Дедова И.И. - М., 2006. - С.32.

5. Петеркова В.А., Семичев Т.В., Тюльпаков А.Н., Карева М.А. Аденогенитальный синдром у детей. Неонатальный скрининг, диагностика и лечение // Вопросы практической медицины – 2006. – Т.1. – №2. – С. 9-13.

6. Петрова Н.В., Зинченко Р.А., Гинтер Е.К. Расчет риска у новорожденных, выявленных при неонатальном скрининге на муковисцидоз // Медицинская генетика. – 2007. – Т. 6. – №11 (65). – С. 16-23.

7. Толстова В.Д., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И. Массовый скрининг новорожденных на муковисцидоз в России // Фарматека. – 2008. – №1. – С. 38-43.

8. Fridovich-Keil J.L. Galactosemia: The Good, the Bad, and the Unknown // J. Cell Physiol. – 2006. – 209. – P. 701-705.

9. Kerem B.-S., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald

M., Tsui L.-C. Identification of cystic fibrosis gene: genetic analysis // Science. – 1989. – 245. – P. 1073-1080.

10. Working Group on Neonatal Screening of the European Society for Paediatric Endocrinology: Procedure for neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // Horm. Res. – 2001. – 55. – P. 201-205.

## Е.В. Маркова, О.М. Казанцева, В.Г. Артюхова, А.В. Светлаков ПРЕИМПЛАНТАЦИОННАЯ ДНК-ДИАГНОСТИКА МОНОГЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

УДК 575.224.22, 616

Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) позволяет проводить профилактику генных болезней на самых ранних этапах эмбрионального развития человека. Несмотря на сложности такой диагностики, включающие необходимость проведения для супружеской пары экстракорпорального оплодотворения, ограниченное время выполнения исследования и минимальное количество ДНК, технология ПГД быстро развивается и становится частью клинической практики. Одной из главных проблем, которая решается в ДНК-исследованиях единичных клеток, является эффективная амплификация генетического материала.

**Ключевые слова:** преимплантационная генетическая диагностика, моногенные заболевания, ПЦР.

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) provides an opportunity to prevent single gene disorders at the earliest stages of human embryo development. Despite complications of this diagnosis, including the necessity of IVF (in vitro fertilization) for partners, limited time for analysis performing and minimum DNA quantity, PGD technique is developing very fast and becoming a part of clinical practice. One of the main problems to solve for DNA analysis of single cells is effective amplification of genetic material.

**Keywords:** preimplantation genetic diagnosis, single gene disorders, PCR.

### Введение

Новое направление ранней диагностики наследственных заболеваний связано с развитием преимплантационной генетической диагностики (ПГД). Такая диагностика делает возможным проведение генетического обследования не только до рождения ребенка, но и до наступления беременности – на самых ранних этапах эмбрионального развития. При проведении ПГД исследование выполняется на минимальном количестве генетического материала – геноме единичной клетки.

Преимплантационное исследование возможно исключительно в рамках лечебных циклов ЭКО (экстракорпорального оплодотворения) либо ИКСИ (инъекции сперматозоида в яйцеклетку). Большая часть циклов ПГД проводится с целью выявления анеуплоидий, хромосомных перестроек. Это обусловлено тем, что показания к такому типу ПГД часто характерны для пациентов с репродуктивными нарушениями, прибегающими к ЭКО.

Показанием для ПГД моногенных дефектов служит высокий генетический риск в отношении генной болезни. Такие пары прибегают к ЭКО исклю-

чительно с целью проведения ДНК-диагностики эмбрионов и отбора для переноса в матку эмбрионов с нормальным генотипом [12]. Преимуществом ПГД является сохранение репродуктивного здоровья пары благодаря возможности избежать прерывания беременности большим плодом, снижение психо-эмоциональной нагрузки на женщину во время беременности (беспокойство о необходимости проведения инвазивной пренатальной диагностики и прерывания по результатам исследования). Особенно актуальна разработка новых методов профилактики наследственной патологии для популяций с высокой частотой отдельных заболеваний.

По данным ESHRE PGD Consortium, опубликованным в 2008 г., обобщающим результаты циклов ПГД по 2005 г., на тот период в мире было проведено 2099 циклов ПГД моногенных дефектов [5].

Подходы к ДНК-анализу в ПГД отличаются от стандартных методов генетического тестирования. Сопоставление сложностей и рисков генетического тестирования единичных клеток эмбрионов с многообразием и тяжестью патогенеза, лечения наследственных заболеваний, доказывает, что перспективы развития ПГД представляются достаточно актуальными.

### Спектр наследственных заболеваний, для которых предложена преимплантационная диагностика

К настоящему времени ПГД разработана для 170 наследственных забо-

леваний [4]. Среди этих заболеваний моногенные дефекты с различным типом наследования: аутосомно-доминантным, аутосомно-рецессивным, X-сцепленным, болезни экспансии. Наибольшее число циклов проводится для муковисцидоза, гемоглобинопатий и динамических мутаций [17].

Принципиально новый способ сочетания лечения и профилактики генной патологии предложен для наследственных заболеваний, требующих трансплантации кроветворных клеток. В семьях, имеющих больного ребенка с такими заболеваниями как анемия Фанкони, талассемии, сочетание преимплантационного HLA-типирования с анализом моногенного дефекта позволяет планировать рождение здорового ребенка, стволовые клетки (пуповинная кровь) которого послужат для пересадки больному sibсу [10]. Эффективность такого подхода очевидна в связи с проблемой поиска подходящего донора и доказана примерами успешного проведения таких случаев ПГД. Необходимо учитывать, что ожидаемая вероятность HLA-совместимых эмбрионов составляет 25%. В случае, когда отбор проводится по HLA и по генотипу в отношении аутосомно-рецессивного нарушения, процент эмбрионов с нормальным генотипом и HLA-совместимых составляет порядка 19% [8].

Преимплантационная диагностика проводится для заболеваний с поздним началом [5, 17]. Предложены подходы для преимплантационной диагностики митохондриальных болезней [2].

Сотрудники Красноярского Центра репродуктивной медицины, e-mail: krasivf@kcrn.ru: **МАРКОВА Елена Викторовна** – к.б.н., зам.директора по науке, зав. лаб.; **КАЗАНЦЕВА Ольга Михайловна** – врач-генетик; **АРТЮХОВА Виктория Геннадьевна** – эмбриолог; **СВЕТЛАКОВ Анатолий Васильевич** – к.б.н., директор Центра.

## Этапы проведения ПГД

### Планирование ПГД

Для планирования ПГД необходимым является молекулярно-генетическое обследование супругов и выявление мутации, являющейся причиной заболевания. В ходе консультации с пациентами врач-генетик помимо других важных вопросов выясняет принципиальные с точки зрения преимплантационного ДНК-тестирования вопросы о характере наследственного заболевания, с которым обращается семья, степень генетического риска, наличие результатов молекулярно-генетических исследований.

Медико-генетическое консультирование должно быть обеспечено не только при подготовке, но и при проведении лечебного цикла. Важно учитывать, что генетическое консультирование при ПГД имеет ряд специфических особенностей, важность которых нельзя недооценивать [1, 13].

Подготовка к ПГД проводится по двум направлениям – генетическому и репродуктивному. Проведение ДНК-диагностики эмбрионов возможно только в программе ЭКО, и соответственно, необходим весь объем обследования, подготовки и консультирования для проведения лечебного цикла ЭКО. Существуют критерии, ограничивающие проведение ПГД [14].

Проведение ПГД возможно в условиях транспортной схемы, когда этап ЭКО выполняется в одном медицинском учреждении, а ПГД – в другом. Такая работа возможна исключительно при условии отлаженной схемы всех этапов работы и условий транспортировки материала эмбрионов.

### Подготовительный этап

Для проведения ПГД моногенных дефектов требуется подготовительный этап. Это связано с подбором схемы генетического исследования для конкретной супружеской пары. Подбирается система информативных маркеров, сцепленных с мутацией. Для этого нужен биологический материал родителей, детей, иногда бабушек и дедушек. Для гаплотипирования могут использоваться сперматозоиды мужчины. Несмотря на то, что пациенты предоставляют результаты молекулярно-генетического исследования мутации и генетических маркеров (которые могли быть идентифицированы любым методом), проведение подготовительного этапа в любом случае необходимо, т.к. отработывается подход выявления мутации и маркеров, который будет эффективен на единичных клетках. Этот этап достаточно трудоемок и может

занимать от одного до трех месяцев. Только по завершении этого этапа пациенты могут вступать в лечебный цикл ЭКО-ПГД.

### Вступление в лечебный цикл ИКСИ-ПГД

После того как подготовительный этап пройден, супружеская пара может начинать лечебный цикл. Для ПГД моногенных дефектов используется метод ЭКО – ИКСИ. Метод ИКСИ, первоначально разработанный для преодоления мужского бесплодия, используется в циклах ПГД для предотвращения контаминацией ДНК сперматозоидов, не участвовавших в оплодотворении.

### Аспирация полярных телец и бластомеров и генетическое тестирование

Процедура ПГД включает в себя два этапа: биопсию клеток эмбрионов и их молекулярно-цитогенетическое и/или молекулярно-генетическое исследование. Основной проблемой диагностики является то, что она проводится на единичных клетках и жестко ограничена во времени.

Для ПГД используются клетки эмбриона и/или полярные тельца [3, 6, 16]. В настоящее время некоторые репродуктивные центры в мире анализируют только бластомеры, другие – полярные тельца и бластомеры. Сочетание генетического исследования бластомеров и полярных телец повышает эффективность, надежность и расширяет возможности ПГД. Генетическое тестирование полярных телец при ПГД разработано и успешно используется группой Ю. Верлинского [16]. Биопсия полярных телец для молекулярно-генетического исследования производится последовательно: первое – до проведения оплодотворения, второе – после. Полярные тельца являются побочным продуктом мейотического деления и не требуются для дальнейшего развития эмбриона. Анализ полярных телец используется для изучения генетических нарушений материнского происхождения.

Эмбрион после биопсии полярных телец продолжают культивировать и на этапе дробления на стадии 6-8 клеток проводится биопсия. Забирается один бластомер от каждого эмбриона. Большое число исследований свидетельствует о том, что проведение такой инвазивной для эмбриона микроманипуляции как аспирация одного бластомера не оказывает негативного воздействия на его дальнейшее развитие [3]. Аспирированные полярные тельца и бластомеры помещаются в

микропробирки с лизирующим буфером.

### Перенос эмбрионов

По результатам генетического исследования даются рекомендации для переноса эмбрионов (эмбриотрансфера). Перед переносом эмбрионов результаты генетического исследования обсуждаются с пациентами и принимается решение о том, какие эмбрионы будут переноситься в полость матки. Перенос эмбрионов осуществляется на 5-6 сутки на стадии бластоцисты.

### Особенности преимплантационной ДНК-диагностики

При проведении ПГД существуют отличительные черты, как эмбриологических технологий, так и особенности ДНК-диагностики.

Эмбриологический этап ПГД характеризуется тем, что репродуктивный центр, осуществляющий лечебный цикл ЭКО/ИКСИ-ПГД, должен владеть методами культивирования эмбрионов *in vitro* до стадии бластоцисты, т.к. требуется время для выполнения генетического анализа. Важнейшее значение для проведения ПГД имеет подготовка эмбриолога, который сможет квалифицированно проводить биопсии полярных телец и бластомеров.

ДНК-тестирование на единичных клетках имеет ряд принципиальных деталей, которые определяются особенностями объекта исследования.

### Малое количество ДНК

Для исследования доступно минимальное количество ДНК – геном одной клетки. Минимальное количество материала определяет риск отсутствия амплификации части локусов или отдельных аллелей. Последнее явление, названное ADO (allele dropout), служит основной причиной ошибочной ДНК-диагностики генотипа эмбриона. Для предотвращения этого явления используется диагностика не одной мутации, а в комплексе со сцепленными с нею маркерами [14, 16]. После переноса полярных телец и бластомеров в лизирующий буфер, микропробирки с клетками немедленно замораживаются, хранятся и транспортируются в замороженном состоянии, для предотвращения потери материала при встряхивании. Экстремально низкие концентрации тестируемой ДНК определяют высокий риск контаминации. Необходимо не только принимать все меры для предотвращения контаминации, но и проводить постоянный контроль. Для каждого эмбриона забираются отрицательные контроли в виде среды культивирования в которой на-

ходились полярные тельца или бластомеры после аспирации.

#### *Ограниченное время выполнения исследования*

Следующей особенностью является очень ограниченное время выполнения исследования. Исследование должно быть закончено к моменту переноса эмбриона в полость матки – т.е. к пятому дню эмбрионального развития, когда эмбрион достигает стадии бластоцисты. В случае, если в ПГД проводится аспирация бластомеров, то время, за которое молекулярно-генетическое исследование должно быть выполнено, составляет максимум двое суток. Если цикл реализуется по транспортной схеме, то время на проведение исследования уменьшается на время транспортировки материала в лабораторию. Для проведения ДНК-диагностики в такие сжатые сроки необходимо подготовленная схема молекулярно-генетического тестирования, которая разрабатывается на подготовительном этапе.

#### **Методы преимплантационной ДНК-диагностики**

ПГД активно используется в клинической практике специализированных генетических лабораторий и уже не является экспериментальным методом. Тем не менее, методические подходы для эффективного ДНК-анализа единичных клеток все еще совершенствуются. В связи с малым количеством генетического материала основным методом преимплантационной диагностики является метод ПЦР (полимеразной цепной реакции).

#### *Аmplification ДНК единичных клеток*

Предложено несколько способов амплификации ДНК единичных клеток. Стандартная ПЦР мало эффективна, поскольку высок риск амплификации плохого качества или отсутствия амплификации. Проблема плохой амплификации актуальна в связи с тем, что требуется проведение мультиплексной ПЦР на малом количестве ДНК, поэтому ДНК-анализ единичных клеток обычно двухэтапный. На первом этапе обеспечивается амплификация всех необходимых локусов в пробирке, в которую была помещена единичная клетка. Продукт амплификации первого этапа может в дальнейшем использоваться для исследования отдельных локусов в разных пробирках.

Для амплификации ДНК единичных клеток предлагаются такие способы как полногеномная амплификация (WGA, whole genome amplification) и nested-PCR [7, 17]. В первом случае

добиваются репрезентативной амплификации всего генома. Этот подход может быть удобен для одновременного преимплантационного анализа генных дефектов и анеуплоидий. Для анализа анеуплоидий продукт полногеномной амплификации может использоваться для сравнительной геномной гибридизации (CGH, comparative genomic hybridization). Теоретически этот подход с использованием WGA наиболее перспективен с учетом возможности автоматизации процесса, однако пока способы WGA единичных клеток разработаны не достаточно и на сегодняшний день большую эффективность доказывает nested-PCR. В данном случае целью ставится не амплификация абсолютно всех локусов генома, а мультиплексная амплификация интересных локусов. Реакция проводится в два раунда. В первом раунде мультиплексной ПЦР амплифицируются более длинные фрагменты. Продукт первого раунда разделяется на аликваты и во втором раунде проводится уже стандартная ПЦР с амплификацией более коротких фрагментов для каждого локуса в индивидуальной пробирке. В случаях ПГД HLA+моногенный дефект в первом раунде может амплифицироваться более 20 локусов.

#### *Детекция продуктов амплификации*

Амплифицированные фрагменты анализируются различными способами. Для детекции микросателлитов используется флуоресцентное мечение ПЦР-продуктов и анализ с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе. При выявлении однонуклеотидных замен обычно применяется стандартный рестрикционный анализ с детекцией продуктов рестрикции в полиакриламидном геле. Для детекции делеций и инсерций может быть достаточно анализа длины фрагментов (ПЦР-продуктов второго раунда) или гетеродуплексного анализа с помощью гель-электрофореза. Особенностью детекции является необходимость быстрого анализа большого числа локусов за короткое время. Так, например, если в лечебном цикле получено 10 эмбрионов, то анализируются 10 первых, 10 вторых полярных телец и 10 бластомеров; всего анализ включает 30 клеток. В случае, если анализируется 10 локусов, включая мутацию, то во втором раунде необходимо проанализировать 300 образцов. С учетом того, что также анализируются отрицательный контроль для каждой клетки (по выборочным локусам) и положительные контроли число проб для детекции велико. В связи с этим

предпочтительны автоматизированные способы детекции.

Разрабатываются микрочиповые технологии для анализа моногенных дефектов. Развитие в преимплантационной диагностике получают методы MDA (multiple displacement amplification) и real-time PCR [15]. Имеются сведения об успешных циклах ПГД с применением MDA для ряда заболеваний, в частности, миодистрофии Дюшенна, синдрома Моркио [9, 11].

#### **Литература**

1. Светлаков А.В. Вопросы медико-генетического консультирования при преимплантационной генетической диагностике / А.В. Светлаков [и др.] // Медицинская генетика - 2008. - Т.7, №12.-С.12-24.
2. Bredenoord A.L. PGD to reduce reproductive risk: the case of mitochondrial DNA disorders / A.L. Bredenoord [et al.] // Human Reproduction.- 2008.- Vol.23, № 11.- P.2392-2401.
3. Gianaroli L. Preimplantation genetic diagnosis: polar body and embryo biopsy / L. Gianaroli // Human Reproduction.- 2000.- Vol.15, Suppl.4.- P.69-75.
4. Guidelines for good practice in PGD: programme requirements and laboratory quality assurance // Reprod Biomed Online.- 2008.- Vol.16, №1.- P.134-147.
5. Harper J.C. ESHRE PGD Consortium data collection VII: cycles from January to December 2004 with pregnancy follow-up to October 2005 / J.C. Harper [et al.] // Human Reproduction.- 2008.- Vol.23, №4.- P.741-755.
6. Montag M. Polar body biopsy: a viable alternative to preimplantation genetic diagnosis and screening / M. Montag, K. van der Ven, B. Rosing B, H. van der Ven // Reprod Biomed Online.- 2009.- Vol. 18, Suppl 1.-P. 6-11.
7. Peng W. Whole genome amplification from single cells in preimplantation genetic diagnosis and prenatal diagnosis / W. Peng, H. Takabayashi, K. Ikawa // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.- 2007.- Vol.131, №1.-P.13-20.
8. Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion // Fertility and Sterility.- 2007.- Vol.88, №6.- P.1497-1504.
9. Qubbaj W. Preimplantation genetic diagnosis of Morquio disease / W. Qubbaj [et al.] // Prenat Diagn.- 2008.- Vol.28, №10.-P.900-3.
10. Rechitsky S. Preimplantation genetic diagnosis with HLA matching / S. Rechitsky // Reprod Biomed Online.- 2004.- Vol.9, №2.- P.210-221.
11. Ren Z. Preimplantation genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy by multiple displacement amplification / Z. Ren [et al.] // Fertil Steril. 2009.-Vol.91, №2.-P.359-64.
12. Simpson J.L. Genetics in obstetrics and gynecology / J.L. Simpson, S. Elias.- Saunders (An Imprint of Elsevier, USA).- 2003.- 484p.
13. Soini S. The interface between assisted reproductive technologies and genetics: technical, social, ethical and legal issues / S. Soini [et al.] // European Journal of Human Genetics.- 2006.- №14.- P. 588-645.
14. Thornhill A.R. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)' / A.R. Thornhill [et al.] // Human Reproduction.- 2005.- Vol.20, №1.- P.35-48.
15. Traeger-Synodinos J. Real-time PCR for prenatal and preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases / J. Traeger-Synodinos // Mol Aspects Med. - 2006.-Vol.27, №2-3.-P.176-91.
16. Verlinsky Y. Atlas of preimplantation genetic diagnosis / Y. Verlinsky, A. Kuliev.- Taylor and Francis, 2005.- 288 p.
17. Verlinsky Y. Practical preimplantation genetic diagnosis / Y. Verlinsky, A. Kuliev.- Springer, 2005.- 198 p.

Н.В. Зотова, Е.В. Маркова, И.Ю. Тимофеева, О.М. Казанцева,  
Н.В. Казьмина, А.В. Светлаков

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТОЧЕК РАЗРЫВОВ ПРИ СТРУКТУРНЫХ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЙКАХ У МУЖЧИН С НАРУШЕНИЕМ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ

УДК 575.224.23; 612.663.5

В работе представлены результаты молекулярно-цитогенетических исследований хромосомных перестроек у пяти мужчин с нарушением репродуктивной функции, обратившихся в Центр репродуктивной медицины г. Красноярск. С использованием метода SKY в четырех случаях и метода FISH в трех случаях удалось локализовать точки разрывов на хромосомах и установить у трех пациентов несбалансированные, а у двух – сбалансированные транслокации.

**Ключевые слова:** спектральное кариотипирование, FISH, транслокации, нарушение репродуктивной функции.

In this study we introduce the results of molecular-cytogenetic study of five men with chromosome rearrangements and reproductive failure. They are patients of the Center for Reproductive Medicine in Krasnoyarsk. Using SKY technique in four cases and FISH method in three cases we localized chromosome breakpoints and found unbalanced translocations in three patients and balanced translocations in two patients.

**Keywords:** spectral karyotyping, FISH, translocations, reproductive failure.

Сбалансированные транслокации возникают при обмене терминальными сегментами между негомологичными хромосомами. Частота их возникновения составляет 1 на 625 новорожденных [1]. В основном реципрокные транслокации фенотипически нейтральны, поскольку существует сбалансированный комплект генов. Аномалии возникают в том случае, когда точки разрыва повреждают важные гены. Во время сегрегации герминальные линии со сбалансированными реципрокными транслокациями могут продуцировать различные типы гамет, из которых только два варианта позволяют родиться ребенку без хромосомных аномалий [3, 9].

Структурные хромосомные перестройки обнаруживаются в 10 раз чаще по сравнению с общепопуляционными показателями среди мужчин с различной степенью тяжести нарушения сперматогенеза и пар со спонтанными абортными и аномалиями у потомства [8, 12, 5]. Частота репродуктивных потерь коррелирует с высокой продукцией несбалансированных гамет и может отражать различные типы несбалансированных кариотипов эмбрионов и плодов. Однако до сих пор не ясно, почему некоторые носители сбалансированных хромосомных перестроек бесплодны. Различное влияние хромосомных перестроек на фертильность могут объ-

ясняться воздействием на инактивацию X-хромосомы; контактированием с аутосомами; относительной важностью генов, вовлеченных в перестройку; и общим генетическим фоном [12].

Для многих транслокаций идентификация хромосомной перестройки не вызывает затруднений с использованием стандартного кариотипирования. Однако в ряде случаев детекция сбалансированного либо несбалансированного хромосомного набора, а также маркерных хромосом может быть затруднительной в связи с малыми размерами перестроенных фрагментов, неясным происхождением дополнительного хромосомного фрагмента. Особенно актуальна задача выявления несбалансированных вариантов кариотипа при проведении пренатальной или преимплантационной генетической диагностики (ПГД).

Молекулярно-цитогенетический подход с использованием FISH-метода позволяет охарактеризовать сложную перестройку, точно идентифицировать точки разрывов на транслоцированных хромосомах и планировать проведение инвазивной дородовой диагностики. Такая диагностика позволяет выявить несбалансированный кариотип даже при получении единичных клеток.

### Материалы и методы исследования

В работе представлено молекулярно-цитогенетическое исследование кариотипов пяти пациентов мужского пола Центра репродуктивной медицины г. Красноярск, обратившихся по вопросу нарушения репродуктивной функции.

Хромосомный анализ проводили на препаратах метафазных хромосом, полученных после культивирования ФГА-стимулированных лимфоцитов в течение 72 часов. Для дифференциального окрашивания использовался GTG-метод. Анализировали 11-13 метафазных пластинок [2]. Для получения изображения метафаз и анализа кариотипов использовали программный продукт «Band View» (Applied Spectral Imaging, USA).

Характеристика обследованных пациентов с выявленными сложными случаями структурных хромосомных перестроек в кариотипе по результатам стандартного цитогенетического обследования представлены в таблице.

SKY-анализ проводили с использованием набора «SkyPaint Kit» (Applied Spectral Imaging, USA). Гибридизацию осуществляли в течение 24 часов. Гибридизация и постгибридизационная отмывка проводились по протоколу,

Характеристика обследованных пациентов

Случай	Возраст, лет	Показания к обследованию	Спермограмма	Кариотип
Пациент 1	39	Первичное бесплодие	Тяжелая олигозооспермия	46,Xdel(Yq),add(5)(qter)
Пациент 2	28	Планирование беременности	–	46,XY,add(15)(pter)
Пациент 3	40	Первичное бесплодие	Олигоастенозооспермия	47,XY+mar
Пациент 4	36	Спонтанное прерывание беременности в семье пробанда	Астенотератозооспермия	46,XY,der(6)t(6;7)(q25;q32)
Пациент 5	39	Первичное бесплодие	Олигоастенозооспермия	46,XY,der(14)t(9;14)

Сотрудники Красноярского Центра репродуктивной медицины, e-mail: krasivf@kcrf.ru; г. ЗОТОВА Надежда Викторовна – биолог-генетик, e-mail: nadyazotova@mail.ru; МАРКОВА Елена Викторовна – к.б.н., зам. директора по науке; ТИМОФЕЕВА Ирина Юрьевна – биолог-генетик; КАЗАНЦЕВА Ольга Михайловна – врач-генетик; КАЗЬМИНА Неля Васильевна – биолог-генетик; СВЕТЛАКОВ Анатолий Васильевич – к.б.н., директор Центра.

предложенному фирмой-производителем ДНК-зондов. Анализировали 11 метафазных пластинок. Для получения изображения метафаз и анализа кариограмм использовали флуоресцентный микроскоп «Olympus BX-51» (Olympus, Japan) с набором светофильтров (Applied Spectral Imaging, USA), интерферометр «LBLS-609» (Sutter Instrument Company, USA) и программный продукт «Sky View» (Applied Spectral Imaging, USA).

Для мультицветного FISH-анализа использовали специфичные ДНК-зонды на хромосомы: Y (DYZ1, DYZ3) – Spectrum Orange, CEP 15 – Spectrum Aqua, tel 15q – Spectrum Orange, tel 14q – Spectrum Orange и набор зондов «MultiVysion PGT» на хромосомы 13, 18, 21, X и Y (Abbott Molecular Inc.) Гибридизацию осуществляли в течение 6 часов. Гибридизация и постгибридизационная отмывка выполнялись согласно инструкциям к наборам «Abbott Molecular Inc.». Для получения изображения клеток и анализа использовали программный продукт «FISH View» (Applied Spectral Imaging, USA).

### Результаты и обсуждение

Для всех обследованных лиц использованы дополнительные методы молекулярно-цитогенетического обследования FISH и SKY для идентификации точек разрывов на хромосомах.

#### Случаи 1 и 2

При стандартном кариотипировании пациента 1 был установлен кариотип: 46,Xdel(Yq),add(5)(qter) (рис.1,а). Метод SKY помог установить несбалансированную транслокацию 46,XY,der(5)t(Y;5)(q12;q35) (рис.1,б).

При цитогенетическом исследовании пациента 2 обнаружен несбалансированный кариотип с дополнительным материалом на коротком плече хромосомы 15: 46,XY,add(15)(pter) (рис.2,а). С использованием SKY-анализа выявлен кариотип пациента: 46,X Y,der(15)t(Y;15)(q12;p12) (рис.2,б).

Для локализации точек разрыва на Y-хромосоме при транслокации для случаев 1 и 2 проведен FISH-анализ с ДНК-зондами на Y-хромосому. Использовали ДНК-зонды CEP Y (DYZ3) и CEP Y (DYZ1). При FISH-исследовании с  $\alpha$ -сателлитным зондом DYZ3 (Yp11.1-q11.1) в обоих случаях выявлено наличие только одного сигнала на клетку, что свидетельствовало о локализации данного региона полностью на Y-хромосоме. В случае проведения FISH с ДНК-зондом на DYZ1-регион Y хромосомы выявлено расщепление

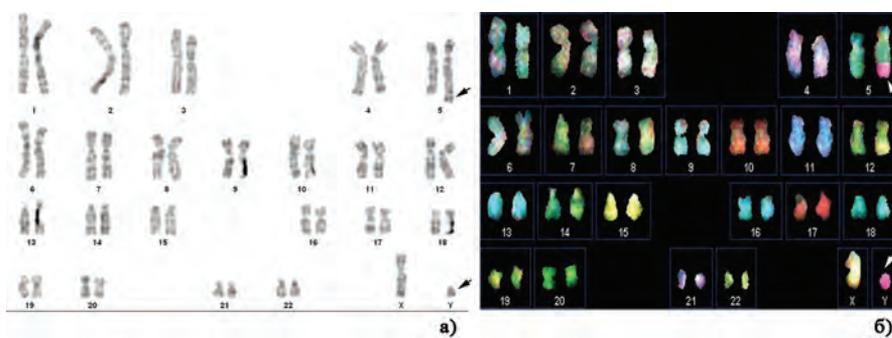


Рис.1. Раскладка хромосом пациента 1: а) GTG-окрашивание, б) спектральное кариотипирование

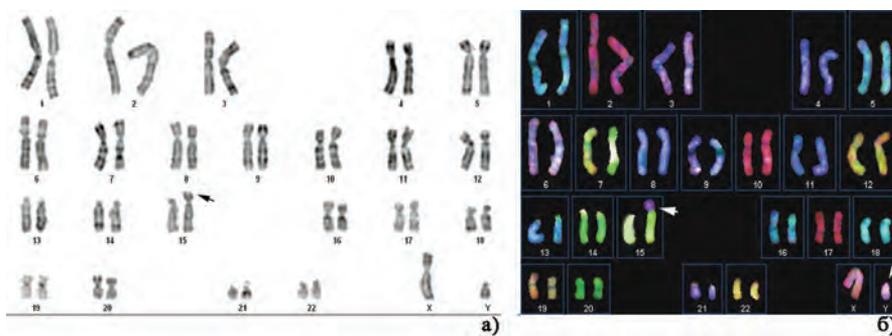


Рис.2. Раскладка хромосом пациента 2: а) GTG-окрашивание, б) спектральное кариотипирование

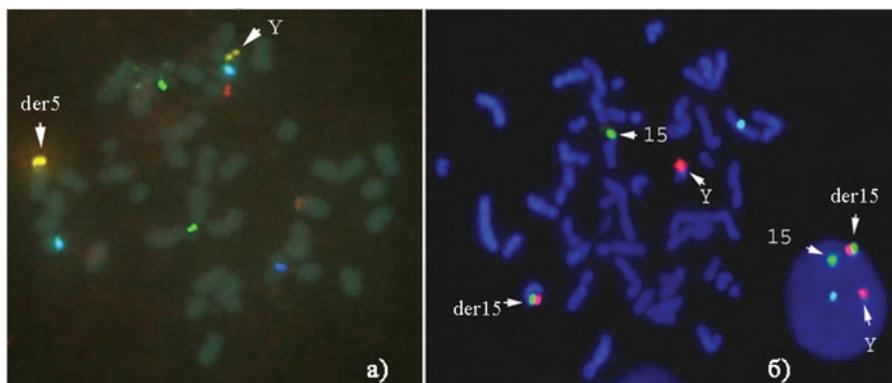


Рис.3. FISH на метафазной пластинке, выявляющая точки разрыва в DYZ1-регионе Y-хромосомы: а) пациента 1 (голубой сигнал - хромосома 18, синий - хромосома X, желтый - хромосома Y, красный - хромосома 13, зеленый - хромосома 21), б) пациента 2 (зеленый сигнал - хромосома 15, голубой - хромосома X, красный - хромосома Y)

сигнала на два: один на Y-хромосоме, дугой на хромосоме 5 – у пациента 1 (рис. 3,а) и на хромосоме 15 – у пациента 2 (рис.3,б). Так у обоих пациентов определена принадлежность добавочного хромосомного материала к Y-хромосоме и установлена точка разрыва в DYZ1-регионе Y-хромосомы (сателлит III (Yq12)).

Хромосомное нарушение пациента 2 не имеет клинического проявления, в то время как у пациента 1 наблюдается тяжелая олигозооспермия в анамнезе. Из данных литературы известно, что несбалансированные транслокации ведут к нарушению сегрегации хромосом при образовании гамет, что, в свою очередь, может служить причиной патологии плода [4].

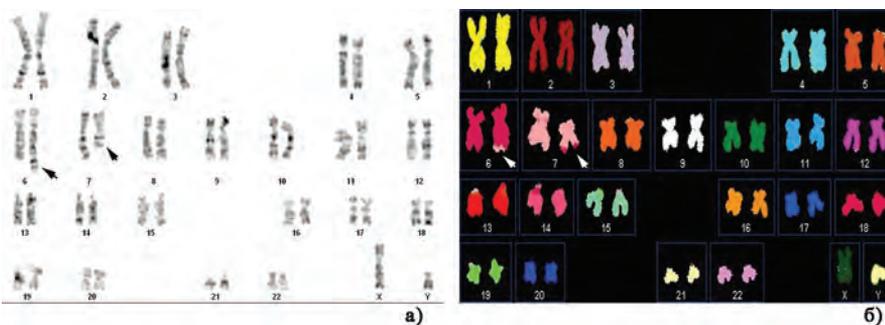
#### Случай 3

Маркерная хромосома в кариотипе пациента 3 (рис.4,а) была идентифицирована методом SKY при этом программа для анализа изображений «Sky View» позволила выявить на маркерной хромосоме сигналы ДНК-зондов специфичных сразу двум хромосомам: 15 и 22: 47,XY,+der(15;22) (рис.4,б). Полученный результат обусловлен наличием в прицентромерных районах этих хромосом кластеров гомологичных последовательностей.

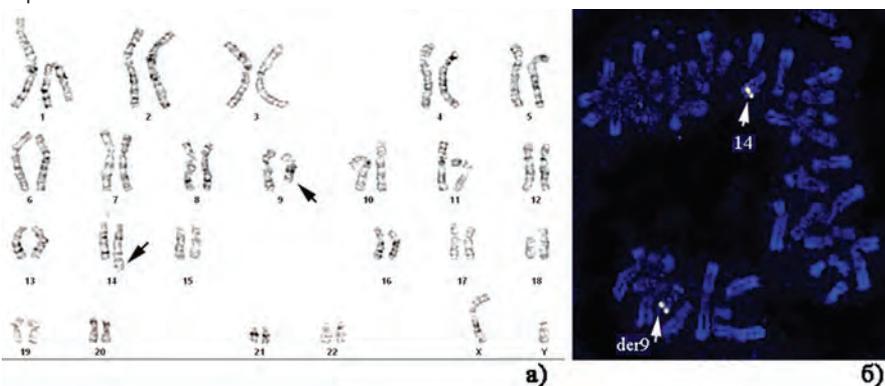
Для уточнения происхождения маркерной хромосомы далее были использованы FISH-зонды на центромеру и теломеру длинного плеча хромосомы 15. При этом нами установлено происхождение маркерной



**Рис.4.** Молекулярно-цитогенетическое исследование состава маркерной хромосомы пациента 3: а) GTG-окрашивание, б) спектральное кариотипирование, в) FISH, выявляющая инвертированную дупликацию длинного плеча хромосомы 15 (голубой сигнал – центромера хромосомы 15, оранжевый – теломера длинного плеча хромосомы 15)



**Рис.5.** Раскладка хромосом пациента 4: а) GTG-окрашивание, б) спектральное кариотипирование



**Рис.6.** Результаты анализа точек разрывов при транслокации пациента 5: а) GTG-окрашивание, б) FISH с зондом на теломеру длинного плеча хромосомы 14 (желтый сигнал)

хромосомы, как инвертированной дупликации фрагмента хромосомы 15: 47,XY,+inv dup(15)(q11) (рис.4,в). На основании анализа 300 клеток крови установлено мозаичное носительство маркерной хромосомы, которая выявлялась в 89,5% клеток: mos47,XY,+inv dup(15)(q11)[284]/46,XY[23].

Причины нарушения репродуктивной функции у носителей маркерных хромосом в кариотипе остаются неясными [7]. Предполагается, что к нарушениям мейотического процесса у носителей бисателлитных маркерных хромосом может приводить превышающий оптимальный уровень NOR-активности или присутствие дополнительного гетерохроматина [11].

#### Случай 4

При кариотипировании клеток крови пациента 4 выявлена несбалансированная транслокация: 46,XY,der(6),t(

6;7)(q25;q32) (рис.5,а). Нами использован метод спектрального кариотипирования который показал наличие небольшого фрагмента хромосомы 6 на хромосоме 7. Было сделано заключение о реципрокной транслокации с двумя точками разрывов: 46,XY,t(6;7)(q25;q32) (рис.5,б).

#### Случай 5

Пациенту 5 изначально был поставлен диагноз несбалансированная транслокация в кариотипе 46,XY,der(14),t(9;14)(q22;q32) (рис.6,а). В дальнейшем нами был проведен FISH-анализ с зондом на теломеру 14q. В результате установлена сбалансированная перестройка: 46,XY,t(9;14)(q22;q32) (рис.6,б). Для ПГД-анализа данного случая предложена комбинация FISH-зондов на центромерный регион хромосомы 9 и теломерный – хромосомы 14.

В литературе показана ассоциация транслокации (9;14) с аменореей у женщин [10], нарушениями развития плода [6].

#### Заключение

В трех из пяти случаев нами было использовано сочетание FISH и SKY. Метод SKY позволил установить происхождение транслоцированного материала, а FISH – точки разрывов на хромосомах. Нам удалось установить в двух случаях сбалансированные транслокации, в двух – несбалансированные и в одном – состав маркерной хромосомы.

Таким образом, методы FISH и SKY являются необходимыми при уточнении цитогенетического заключения в сложных случаях, подборе оптимальной схемы ПГД-диагностики и отборе сбалансированных эмбрионов.

#### Литература

1. Баранов В.С. Цитогенетика эмбрионального развития человека: научно-практические аспекты / В.С. Баранов, Т.В. Кузнецова.-СПб.: Издательства Н-Л, 2007.-640с.
2. Захаров А.Ф. Хромосомы человека (Атлас) / А.Ф. Захаров, В.А. Бенюш, Н.П. Кулешов, Л.А. Барановская.- М.: Медицина, 1982.- 264с.
3. Benet J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers / J. Benet, M. Oliver-Bonet, P. Cifuentes, C. Templado, J. Navarro // Cytogenetic and Genome Research.- 2005.-№111.- P. 281-290.
4. Fukada Y. Prenatal confirmation of the translocation between chromosome 15 and Y-chromosome by Fluorescence in situ hybridization / Y. Fukada, T. Yasumizu, A. Anemya // Tohoku J Exp Med.- 1998.- №187.- P. 285-289.
5. Gutierrez-Mateo C. Aneuploidy 12 in a robertsonian (13;14) carrier: case report / C.Gutierrez-Mateo, L. Gadea, J. Benet, D. Wells, S. Munne, J. Navarro // Human Reproduction.- 2005.-Vol.20, №5.- P.1256-1260.
6. Leube B. Unbalanced cryptic translocation der(14)t(9;14)(q34.3;q32.33) identified by subtelomeric FISH / B. Leube, F. Majewski, M. Drechsler, B. Royer-Pokora // Clin Dysmorphol.- 2003.- Vol.12, №4.- P.:261-266.
7. Manvelyan M. Thirty-two new cases with small supernumerary marker chromosomes detected in connection with fertility problems: detailed molecular cytogenetic characterization and review of the literature / M. Manvelyan, M. Riegel, M. Santos // Int. J. Mol. Med.- 2008.- Vol. 21, №6.- P.705-714.
8. Morel F. Meiotic segregation of translocations

during male gametogenesis / F. Morel, N. Douet-Guilbert, M.-J. Le Bris, A. Hery, V. Amice, J. Amice, M. De Braekeleer // *Int J Androl.* -2004.-№27.-P.200-212.

9. Pujol A. The importance of aneuploidy screening in reciprocal translocation carriers / A. Pujol, J. Benet, C. Staessen, E. Van Assche, M. Campillo, J. Egozcue, J. Navarro // *Reproduction.* -2006.-№131.-P.1025-1035.

10. Rajangam S. Cytogenetic studies in

amenorrhea / S. Rajangam, L. Nanjappa // *Saudi Med J.* - 2007.-Vol.28, №2.-P.187-92. Sermon, K. ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001 / K. Sermon, C. Moutou, J. Harper, J. Geraedts, P. Scriven, L. Wilton, M.C. Magli, A. Michiels, S. Viville, C. De Die // *Hum Reprod.* -2005.-Vol.20, №1.-P.19-34.

11. Vulcani-Freitas T.M. Infertility and marker chromosomes: Application of molecular cytogenetic techniques in a case of inv dup(15) / T.M. Vulcani-

Freitas, V.L. Gil-da-Silva-Lopes, M. Varella-Garcia, A.T. Maciel-Guerra // *J Appl Genet.* -2006.-Vol. 1, № 47.-P. 89-91.

12. Wiland E. The analysis of meiotic segregation patterns and aneuploidy in the spermatozoa of father and son with translocation t(4;5)(p15.1;p12) and the prediction of the individual probability rate for unbalanced progeny at birth / E. Wiland, A.T. Midro, B. Panasiuk, M. Kurpisz // *Journal of Andrology.* -2007.-Vol. 28, №2.-P.262-272.

И. Б. Фаткуллина, Л.Ц. Содномова, Е.Р. Еремина, Л.Л. Алексеева, А.В. Тыхеренова

## РОЛЬ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ В РАЗВИТИИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

УДК 61.8.3-008.6-092:612.6.05

Роль наследственности в развитии заболеваний женской репродуктивной системы и патологии, развивающейся во время беременности, издавна является одним из наиболее важных вопросов, которые интересуют практикующих врачей и исследователей. Еще в 1873 г. G. Elliot впервые опубликовал описание случая эклампсии у матери и ее четырех дочерей со смертельным исходом (за исключением одной из дочерей) [7]. Все чаще в современной литературе можно встретить упоминание о роли наследственных факторов, предрасполагающих к развитию определенного патологического состояния или заболевания (гестоз, первичное и вторичное бесплодие, привычное невынашивание беременности, эндометриоз, плацентарная недостаточность, климактерический синдром) [6, 9, 10, 11, 12].

Преэклампсия, или гестоз, занимает лидирующие позиции в патологии беременности и является одной из наиболее значительных проблем современного акушерства. В настоящее время частота этого состояния колеблется от 7 до 22% [8]. В структуре причин материнской смертности в Российской Федерации преэклампсия, стабильно занимая 3-е место, составляет от 11,8 до 14,8% и остается основной причиной заболеваемости и смертности новорожденных [8]. По данным ВОЗ, у

каждого пятого ребенка, родившегося от матери с преэклампсией, в той или иной степени нарушено физическое и психозмоциональное развитие, значительно выше уровень заболеваемости в младенческом и раннем детском возрасте. Причины развития преэклампсии зависят от многих факторов и до конца не изучены. Несмотря на многочисленные исследования, во всем мире до сих пор нет единого мнения о причинах возникновения преэклампсии. Несомненно, что заболевание непосредственно связано с беременностью, так как прекращение последней всегда способствует выздоровлению. Существует несколько взаимодополняющих гипотез развития преэклампсии, к ним относятся неврогенная, почечная, плацентарная, иммунологическая и генетическая теории [1, 8]. Согласно данным исследований последних лет, генетический компонент заболевания может составлять до 50% всех факторов, влияющих на развитие преэклампсии [8].

Одним из основных направлений исследований преэклампсии, цель которых – подтверждение генетической теории, является изучение так называемых генов-кандидатов [2]. Если продукт экспрессии гена может прямо или косвенно участвовать в развитии изучаемой болезни, то этот ген принято называть геном-кандидатом. Особенностью многих вариантных генов является то, что они могут долгое время никак себя не проявлять. Патологические симптомы могут возникать при дополнительных условиях (особенности питания, беременность, образ жизни и т.д.). В связи со сложной патофизиологией преэклампсии список генов-кандидатов, предрасполагающих к преэклампсии, огромен. Из генетических маркеров артериальной гипертензии и преэклампсии исследуются инсерционно-делеционный полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента (ACE); полиморфизм гена эндотелиальной синтазы (eNOS); A1166C

полиморфизм гена рецептора I типа ангиотензина II; полиморфизм гена аполипопротеина E (APOE); полиморфизм генов *PLAT*, *PAI-1*; полиморфизм генов плацентарной глутатионтрансферазы (*GSTP1*), цитокина, фактора некроза опухолей (*TNF-α*) и другие [2].

В настоящее время интенсивно изучается фермент гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), снижение которого является одной из важных причин накопления гомоцистеина в организме, что в свою очередь ведет к риску развития сосудистых осложнений и преэклампсии у беременных [3, 14]. Известно около двух десятков мутаций в гене *MTHFR*. Наиболее изученным является вариант, в котором нуклеотид цитозин (C) в позиции 677, относящейся к 4-му экзону, заменен на тимидин (T), что приводит к замене аминокислотного остатка аланина на остаток валина в сайте связывания фолата, приводит к дефициту цитоплазматической *MTHFR* и повышению уровня гомоцистеина в плазме крови из-за подавления его метаболизма. У лиц, гомозиготных по данной мутации, отмечается термоллабильность *MTHFR* и снижение активности фермента примерно до 35% от среднего значения [9]. По частоте аллеля *MTHFR* \*677T существуют значительные межрасовые и межэтнические различия. Чаще всего ген встречается у европейцев 32-40% [14], реже всего – у чернокожих африканцев от 5% и аборигенов Австралии и Шри-Ланки, до 20% у азиатов [17].

По некоторым данным литературы, имеется выраженная тенденция прямой зависимости частоты встречаемости мутации *MTHFR* C677T от тяжести преэклампсии [2]. Мутация C677T в гене *MTHFR* наиболее часто встречается при тяжелых формах преэклампсии (77,8%) и повторной преэклампсии (86,7%). У женщин с мутацией C677T *MTGFR* достоверно повышен риск развития тяжелой преэклампсии при последующих беременностях

**ФАТКУЛЛИНА Ирина Борисовна** - зав. кафедрой акушерства и гинекологии ГОУ ВПО БГУ, зам. гл. врача Республикан. перинатального центра, г. Улан-Удэ, e-mail: fib1971@mail.ru; **СОДНОМОВА Лилия Цыдендамбаевна** – врач генетик Детской республикан. клинич. больницы, г. Улан-Удэ; **ЕРЕМИНА Елена Робертовна** – директор Бурятского филиала Томского НИИ генетики, ст. препод. Бурятского гос. ун-та; **АЛЕКСЕЕВА Лилия Лазаревна** – врач акушер-гинеколог Республикан. перинатального центра, г. Улан-Удэ, ст. препод. Бурятского гос. ун-та; **ТЫХЕРЕНОВА Аурика Вячеславовна** – студентка VI курса мед. факультета Бурятского гос. ун-та, e-mail: aurika-t@mail.ru.

(53,8%). По данным А.Д. Макадаря, у пациенток с преэклампсией, имеющих генотип *MTGFR* \*T\*/T, достаточно часто развиваются и другие осложнения беременности. Так, ранние выкидыши в анамнезе отмечались у 12,4% беременных, поздние у 33,6%, синдром задержки внутриутробного развития плода у 25,8%, антенатальная гибель плода у 17,5%, преждевременная отслойка плаценты у 13,3% [5].

Другим вариантом полиморфизма гена *MTHFR* является замена нуклеотида аденина (А) на цитозин (С) в позиции 1298. У лиц, гомозиготных по мутации А1298С, отмечается снижение активности *MTHFR* примерно до 60% от нормы. В отличие от полиморфизма *C677T*, гетерозиготность и гомозиготность по мутации А1298С не сопровождается повышением концентрации общего гомоцистеина в плазме. Однако комбинация гетерозигот по аллелям *C677T* и А1298С сопровождается не только снижением активности фермента, но и повышением концентрации гомоцистеина в плазме, как это бывает при гомозиготности по аллелю *C677T*.

По данным В. Веннега, до 65% сосудистых нарушений, составляющих патогенез гестационных осложнений, представлены тромбофилическими факторами. Есть сведения, что у беременных с гестозом чаще выявляются тромбофилические мутации, одним из которых является мутация *G20210A* в гене протромбина. Она была обнаружена при изучении пациентов с семейной историей тромбофилии неясного генеза. У гетерозиготных носителей этого полиморфизма отмечено повышение уровня протромбина на 50% [5]. Гомозиготный вариант мутации *G20210A* является очень редкой находкой. Гетерозиготными носителями этого полиморфизма являются 2-3% представительниц европейской расы. Среди африканцев и представителей монголоидной расы данная мутация встречается очень редко [15]. По данным ряда авторов, мутация *G20210A* гена протромбина встречается в 4-11% случаев у женщин с преэклампсией, тогда как у здоровых беременных – в 1-4% [13, 15].

Исследования Демина Г. С. (2008) о роли полиморфизма генов «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции» в развитии преэклампсии в двух этнически различающихся популяциях (Россия и Греция) показывают, что развитие преэклампсии ассоциировано с дисбалансом в этих системах генов, но при этом молекулярные маркеры заболевания в разных странах отличаются.

Контрольные группы и группы больных с преэклампсией из России и Греции различаются по частотам аллелей и генотипов по генам синтаз оксида азота (*NOS1*, *NOS2*, *NOS3*) и *TNF-α* (гены «эндотелиальной дисфункции»). Наличие генотипов *NOS1 10/15* и *NOS3 4a/4b* и сочетанного генотипа *NOS1 15/- + NOS3 4a/-* по генам «эндотелиальной дисфункции» увеличивает риск развития преэклампсии в популяции Северо-Западного региона России, а носительство сочетанного генотипа *NOS3 4b/4b + PAI1 4G/-* – в популяции Северо-Западного региона Греции [2].

О.В. Малышева, Е.В.Мозговая и соавт. [6] исследовали полиморфные области интрона 4 гена *eNOS* и интрона 16 гена *ACE* у 120 женщин, проходивших лечение по поводу гестоза в стационаре Института акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН. Контрольную группу составили 73 повторнорождавшие женщины, не имевшие в анамнезе признаков гестоза. Анализ полиморфизма в интроне 16 гена *ACE* выявил ассоциацию развития гестозов с наличием аллеля I. Генотип II в два раза чаще встречался при гестозе, чем в контрольной группе (20 и 10% соответственно). Величина относительного риска (OR) развития гестоза при генотипе II составила 2,05 (С1—95% 1,03-2,08). Выявлена неслучайная ассоциация *4b/4b* генотипа гена *eNOS* с тяжелым гестозом. Относительный риск развития тяжелой формы заболевания у беременных женщин с этим генотипом составил 1,74 (С1—95%: 1,06-2,87). Различия в распределении генотипов гена *eNOS* между подгруппами больных обусловлены увеличением частоты генотипа *4b/4b* у пациенток с чистым тяжелым гестозом. У пациенток с сочетанными формами гестоза разной степени тяжести эта величина практически не отличается от контроля [6].

В. Е. Радзинский и соавт. выяснили, что при преэклампсии наличие аллеля *PL-AII* гена *GP1IIa* коррелирует с предрасположенностью к развитию фетоплацентарной недостаточности, причем вероятность этой патологии существенно повышается при сочетании гестозе, т. е. на фоне имеющейся экстрагенитальной патологии. Помимо этого, наличие аллеля *PL-AII* коррелирует с предрасположенностью к перинатальной патологии плодов и новорожденных, в первую очередь – к гипоксии [9].

При изучении полиморфизма митохондриального и ядерного геномов коренного населения Республики Бурятия в норме и при патологии бе-

ременности, установлено, что у бурятских женщин с отягощенным акушерским анамнезом установлены более низкие частоты сайтов *HaeIII 16517* и *AspS9I 16516* в области D-петли митохондриальной ДНК, а также повышенная частота делеции локуса *ACE* по сравнению с контролем. Найденные различия указывают на вероятную взаимосвязь конкретных полиморфизмов митохондриального и ядерного геномов с осложнениями течения беременности у буряток, в том числе и при преэклампсии [4]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что не исключается вклад этнической компоненты в реализацию у женщины эклампсии, потому необходимо дальнейшее изучение полиморфизма генов преэклампсии, у беременных в разных этнических группах, проживающих в Республике Бурятия.

Изложенные выше литературные данные свидетельствуют о наличии генетической предрасположенности к развитию гестоза. Своевременное выявление неблагоприятных сочетаний аллелей генов, ответственных за развитие гестоза в генотипе женщин на ранних сроках беременности, а также до ее возникновения, представляется актуальным для формирования групп риска по развитию преэклампсии и задержке развития, что позволит своевременно проводить профилактику заболевания и является одной из задач современной предиктивной медицины.

## Литература

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э. и др. Генотип человека и гены «предрасположенности». СПб.: «Интермедика», 2000. – С. 30 – 35.
2. Демин Г.С. Анализ ассоциации полиморфизма генов «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции» с развитием преэклампсии: автореф. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. СПб., 2008. – 25 с.
3. Еремина Е.Р. Полиморфизм ДНК у коренного населения республики Бурятия и женщин-буряток с аномальным течением беременности: Автореф. на соиск. уч. степ. канд. мед. наук. Томск. 1999. – 24 с.
4. Зайнуллин И.А., Кулавский В.А., Зайнуллина А.Г., Хуснутдинова Э.К. Молекулярная генетика тромбофилий при поздних гестозах // Медицинская генетика. – 2007. – Т.6, № 7. С. – 12 – 17.
5. Малышева О.В., Мозговая Е.В., Демин Г.С. и др. Ассоциация полиморфных аллелей генов *ACE* и *eNOS* с развитием гестозов // Там же. – 2003. – Т. 2. № 7. – С – 324-330.
6. Павлов О.Г., Иванов В.П. Генетические аспекты гестозов (история и состояние проблемы) // Акушерство и гинекология. – 2005. – № 3. – С. 8 – 10.
7. Пикаускайте Д.О. Преэклампсия: этиология, патогенез, клиника, генетика // Медицинская генетика. – 2006. – Т.5. – № 7. – С – 9 – 20.
8. Радзинский В. Е., Иткес А. В., Галина Т. В. и др. Корреляция различных форм гестоза с генотипом по гену *GP1IIa* - цепи интегрин // Акушерство и гинекология. – 2001. – № 6. – С. 20 – 25.
9. Радзинский В.Е., Запертова Е.Ю., Мисник

В.В. Генетические и иммунологические аспекты привычного невынашивания беременности. // Там же. - 2005. - №6. С - 24-29.

10. Спиридонова М.Г., Степанов В.А., Пузырев В.П. О роли полиморфных вариантов гена 5,10 – *MTGFR* в патогенезе сердечно – сосудистых заболеваний // Клиническая медицина. – 2001. - № 2. С. 10 – 16.

11. Сушнева А.А., Стрижакова Н.В., Носиков В. В., Коробейников А. П. Поиск ассоциации полиморфных маркеров генов, кодирующих ферменты антиокислительной защиты, у женщин с климактерическим синдромом // Акушерство и гинекология. – 2008. - № 2. С. 34 – 39.

12. Хамадянов У.Р., Викторова Т. В., Исакова

Г. М. Роль генов биотрансформации ксенобиотиков в патогенезе нарушенной репродуктивной функции у женщин // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии — 2005. – Т.5, № 4. – С. 29 – 33.

13. Gerhard A., Goecke T., Beckmann M. et al. The G20210 prothrombin-gene mutation and the plasminogen activator inhibitor (PAI – I) 5G/5G genotype are associated with early onset of severe preeclampsia // J. Thromb. Haemost. – 2005. – Vol. 3, № 4. – P. 686–691.

14. Gudnason V., Stansbie D., Scott J. et al. C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*): its frequency and impact on plasma homocysteine

concentration in different European population // Atherosclerosis. – 1998. – Vol. 136. – P. 347–354.

15. Kujovich Jody L. Thrombophilia and pregnancy complications // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2002. – Vol. 191. – P. 412–424/

16. Poort.S., Rosendaal F., Reitsma P. et al. A common genetic variation in the 3' - untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis // Blood. – 1996. – Vol. 88. – P.3698–3703.

17. Schneider J., Rees D., Liu Y. et al. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation // Am. J. Hum. Genet. – 1998. – Vol. 62. – P. 702–707.

Е.Е. Гуринова, А.Л. Сухомясова, А.Н. Ноговицына, И.А. Николаева, С.П. Алексеева, Н.Р. Максимова

## СРАВНЕНИЕ УРОВНЯ ТРЕВОЖНОСТИ У БОЛЬНЫХ С МОНОГЕННЫМИ НАСЛЕДСТВЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

УДК 61:575

**Цель исследования.** Сравнить уровень тревожности у больных со спиноцереbellарной атаксией 1 типа, миотонической дистрофией, их родственников и у здорового населения.

**Материалы и методы.** Для решения поставленной цели анкетировано 63 пациента и 130 здоровых лиц в качестве контрольной группы, обратившихся в медико-генетическую консультацию и во время выездных командировок. Использован психодиагностический метод – тест «Шкала самооценки», разработанный Ч.Д. Спилбергером и адаптированный Ю.Л.Ханиным.

**Результаты.** У больных отмечена высокая личностная (46,7 балла) и умеренная реактивная (42,5 балла) тревожность. У здоровых родственников выявлена высокая личностная тревожность, по количественным баллам несколько выше, чем у больных – 48,5 балла.

**Ключевые слова:** реактивная тревожность, личностная тревожность, больные, родственники.

**The purpose of research.** To compare a level of uneasiness in patients with spinocerebellar ataxia I type, myotonic dystrophy, their relatives and in the healthy population.

**Materials and methods.** For the decision of the purpose of research 63 patients and 130 healthy persons as the control group, addressed to medical-genetic consultation and during exit business trips have been questioned. Psychodiagnostic method - the test «a self-estimation scale», developed by Ch.D. Spilberger and adapted by J.L. Hanin, is used.

**Results.** High personal (46,7 points) and moderate reactive (42,5 points) uneasiness is noted in patients. In healthy relatives high personal uneasiness, on quantitative points a little bit higher, than in sick people - 48,5 points is revealed.

**The conclusion.** High personal uneasiness, mainly in women, and moderately increased reactive uneasiness in patients with spinocerebellar ataxia I type, myotonic dystrophy and their not affected relatives living jointly, in comparison with control group, is revealed.

**Keywords:** reactive uneasiness, personal uneasiness, patients, relatives.

### Актуальность исследования

С развитием молекулярных методов диагностики стало возможным применение методов ДНК-диагностики наследственных заболеваний в практической медицине как для установления и уточнения диагноза наследственного заболевания, так и в доклинической стадии заболевания и в дородовой диагностике плода. Генетическое тестирование наследственного заболевания поднимает ряд вопросов, опасений и сомнений как у больного, так у здоровых членов семьи и важнейшей из существующих проблем является возможность психологического дистресса при получении информации

о носительстве гена тяжелого, неизлечимого наследственного заболевания тестируемым клинически здоровым лицом из группы риска. Наиболее изученным заболеванием в мире и в России в отношении психологических особенностей больных является хорей Гентингтона [2].

В связи с накоплением некоторых форм моногенных наследственных болезней, в особенности спиноцереbellарной атаксии 1 типа (СЦА 1), миотонической дистрофии (МД) среди коренного населения Республики Саха (Якутия), исследования их психологических особенностей, в частности показателя тревожности, являются востребованными и необходимыми для дальнейшего улучшения медико-генетического консультирования и организации психологической помощи больным и их семьям с наследственными заболеваниями [4; 5; 6; 7].

СЦА 1 типа – аутосомно-доминантное заболевание, обычно начинающееся в 30-40 лет (в промежутке от 4 до 74 лет) с неловкости при ходьбе, беге, гиперрефлексии, нистагма, дизартрии. По мере неуклонного прогрессирующего

наблюдается грубая атаксия, развиваются дисметрия, адиадохокinez, интенционный тремор, офтальмоплегия, слабость мимической мускулатуры, нарушения глотания, фонации и дыхания. Пациенты погибают вследствие утери способности откашливаться, аспирации пищи, респираторных проблем, продолжительность болезни не более 10-20 лет.

МД – мультисистемное заболевание с вариабельностью клинических проявлений, среди которых миотония, прогрессирующая мышечная слабость, поражения сердца, эндокринно-вегетативные расстройства, катаракта, снижение интеллекта. МД передается по аутосомно-доминантному типу и наиболее часто встречается в 20-30 лет.

Цель исследования: изучение уровня тревожности у больных со спиноцереbellарной атаксией 1 и миотонической дистрофией, а также у их здоровых родственников и в популяционной выборке якутов.

### Материал для исследования

Сбор материала для медико-генетического и психологического исследова-

**ГУРИНОВА Елизавета Егоровна** – врач-генетик МГК Перинатального центра РБ№1-НЦМ, н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, e-mail: elgur2005@yandex.ru; **СУХОМЯСОВА Айталина Лукична** – к.м.н., зав.МГК, зав.лаб. ЯНЦ, e-mail:AyatalinaS@yandex.ru; **НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна** – к.м.н., врач-генетик МГК, зав. лаб. ЯНЦ, e-mail: Nogovan@yandex.ru; **НИКОЛАЕВА Ирина Аверьевна** – н.с. ЯНЦ, e-mail: pia0505@yandex.ru; **АЛЕКСЕЕВА Светлана Петровна** – врач-генетик МГК ПЦ РБ№1-НЦМ; **МАКСИМОВА Надежда Романовна** – к.м.н., гл.н.с. ЯНЦ, e-mail: Nogan@yandex.ru.

дования проведен врачом-генетиком с дипломом клинического психолога во время медико-генетического консультирования больных и их родственников в медико-генетической консультации РБ №1 – Национального центра медицины Республики Саха (Якутия) и во время выездных командировок в районы республики. Обследованы 24 больных с СЦА1 и МД, имеющие положительный результат при ДНК-тестировании на СЦА1 типа и МД (СЦА1 – 10 больных, МД – 14 больных), 40 членов их семей с отрицательным результатом при ДНК-тестировании на СЦА1 МД (соответственно по 31 и 9 здоровых родственников). Также обследованы здоровые люди, в анамнезе которых нет упоминания об этих двух наследственных заболеваниях – 130 чел., не проходившие ДНК-тестирования.

#### Метод исследования

Консультируемые заполняли специально разработанные анкеты, на 2 языках (русском и якутском), которые включали тест «Шкалы самооценки Спилбергера-Ханина» [3]. Надежный и информативный способ самооценки уровня тревожности, разработанный Ч. Спилбергером и адаптированный Ю.Л. Ханниным (1976), позволяет оценить уровни реактивной (ситуационной) и личностной тревожности. Шкала реактивной и личностной тревожности (ШРЛТ) имеет две самостоятельные подшкалы для отдельного измерения той и другой формы тревожности: подшкала оценки РТ с главным вопросом о самочувствии в данный момент и подшкала оценки ЛТ с формулировкой о самочувствии обычном.

Процедура заключалась в письменном выборе тестируемым наиболее точных для него в настоящий момент ответов из предложенных в опроснике. На каждое из утверждений (по 20 в шкалах реактивной и личностной тревожности) необходимо дать один из четырех вариантов ответа: 1 – никогда или изредка, 2 – иногда, 3 – часто, 4 – почти всегда или постоянно. Результаты оценивались количественно (в баллах) по ключам: до 30 баллов – низкая; 31 – 45 баллов – умеренная или средняя; 46 баллов и более – высокая тревожность. Для подсчета данных, параметров и для анализа данных использовались статистические методы в компьютерных программах «Excel», «Биостат», вычислен критерий Стьюдента.

#### Результаты и обсуждение

*Социодемографическая характеристика обследованных*

В процессе выполнения работы

были обследованы несколько групп: 1 группа – больные с СЦА1 и МД или, говоря иначе, – лица с положительным результатом ДНК-диагностики, 2 группа – их родственники с отрицательным результатом ДНК-диагностики, 3 группа была представлена здоровыми лицами, которую составили здоровые индивидуумы без упоминаний в анамнезе о наследственной неврологической патологии, не прошедшие ДНК-тестирование.

При социодемографическом исследовании (табл.1) выборка первой группы представлена 8 мужчинами и 16 женщинами – 33,3 и 66,7 % соответственно, вторую группу составили 11 мужчин (27,5%) и 28 женщин (72,5%), третья группа включает 130 чел., из них 104 женщины (80%) и 26 мужчин (20%). Имеющееся преобладание лиц женского пола может быть объяснено более частой обращаемостью женщин как во время выездных командировок, так и при консультировании в медико-генетической консультации. С другой стороны, у якутов численность женщин превышает численность мужчин во всех возрастных группах старше 20 лет.

Возраст обследованных колебался от 13 до 76 лет (в среднем  $38,2 \pm 12,8$  года для всех трех групп).

Сравнение групп по возрастам показало некоторые отличия. Так, в 1-й группе средний возраст составил 39,2 года, во 2-й группе – 37,4 года, в 3-й группе – 34,6 лет. Таким образом, самыми «старшими» оказались больные мужчины и женщины, «молодыми» – группа контроля (средний возраст мужчин составил 32,9 лет, женщин – 35,1 год). Доля несемейных была выше в группе больных (41,7%), в двух других группах преобладали семейные. В первой группе около половины обследованных бездетны (45,9%), тогда как во второй и третьей группах преобладающее большинство (70% и 62,3%) имели детей.

Сравниваемые группы отличались по уровню образования и показателю занятости. Из 3 сравниваемых групп наиболее образованной оказалась 2-я, среди них с высшим образованием

**Таблица 1**  
**Сравнительная социо-демографическая характеристика участников**

	1 группа (n=24)	2 группа (n=40)	3 группа (n=130)
Средний возраст, лет	39,2±2,6	37,4±2,2	34,6±1,3
Общий	от 16 до 64	от 15 до 76	от 13 до 74
Мужчины	34,8±2,7	32,5±4,4	32,9±2,9
Женщины	41,6±3,8	39,2±2,6	35,1±1,5
Признаки	Абс. кол-во (%)	Абс. кол-во (%)	Абс. кол-во (%)
<i>Пол</i>			
Мужчины	8 (33,3)	11 (27,5)	26 (20)
Женщины	16 (66,6)	29 (72,5)	104 (80)
<i>Семейное положение</i>			
Холостые	10 (41,7)	14 (35,0)	42 (32,3)
Состоящие в браке	11 (45,8)	19 (47,5)	75 (57,7)
Разведенные	2 (8,3)	2 (5,0)	6 (4,6)
Вдовы	1 (4,1)	5 (12,5)	7 (5,4)
<i>Наличие ребенка</i>			
Бездетные	11 (45,9)	12 (30,0)	49 (37,7)
1 и более ребенка	13 (54,1)	28 (70,0)	81 (62,3)
Общее число детей		13	26
<i>Образование</i>			
Высшее	5 (20,9)	10 (25,0)	16 (12,3)
Среднее специальное	6 (25,0)	12 (30,0)	26 (20)
Среднее	12 (50,0)	14 (35,0)	81 (62,3)
Неполное среднее	1 (4,1)	3 (7,5)	7 (5,3)
<i>Студент/учащийся</i>	3 (12,5)	1 (2,5)	55 (42,3)
<i>Занятость</i>			
Работающий	7 (29,0)	25 (62,5)	55 (42,3)
Неработающий	17 (71,0)	15 (37,5)	75 (57,7)
<i>Наличие инвалидности</i>			
Да	12 (50,0)	4 (10,0)	15 (11,6)
Нет	12 (50,0)	36 (90,0)	115 (88,4)

Примечание. Мужчины  $p=0,2$ , женщины  $p<0,05$

25% чел., со средним специальным образованием – 30%. В группе контроля преобладала доля лиц со средним образованием и здесь же 42,3% составили студенты, преимущественно обучающиеся в вузе. В группе больных одна половина была со средним образованием, вторая – с профессиональным образованием, из них 1/4 со средним специальным образованием, 20,9% больных с высшим образованием. Данное обстоятельство возможно объясняется более поздним началом этих наследственных заболеваний, в частности спиноцеребеллярной атаксии 1 типа, при которой срок манифестации клинических проявлений охватывает возраст от 20 до 45 лет. Среди больных неработающие составили значительный процент – 71%, из них на инвалидности находилась половина. В группе контроля, вероятно за счет студентов, неработающие составили 57,7%. Больше половины родственников работали – 62,5 и 90% из них не были инвалидами.

*Реактивная и личностная тревожность в обследованных группах*

В процессе изучения данных, полученных с помощью методики, вы-

Таблица 2

Сравнительная оценка показателей реактивной тревожности в различных группах обследованных

Группа	Мужчины	Женщины
1-я	42,5±2,8	43,6±2,0
2-я	44,8±2,8	45,1±1,5
3-я	43±1,4	41,2±0,8

Примечание. Сравнение мужчин 1-й и 3-й групп  $p>0,1$ ; сравнение мужчин 2 и 3 групп  $p=0,01$ ; при сравнении женщин 1-й и 2-й групп с 3-й  $p<0,001$ .

являющей уровень реактивной и личностной тревожности, были получены следующие результаты.

Во всех обследованных группах выявлена умеренная реактивная тревожность (табл. 2), личностная тревожность была повышена как в группе больных (46,7±2,29 баллов), так и среди их непораженных родственников (48,5±1,49 баллов). Большая личностная тревожность отмечена у здоровых родственников, чем у самих больных.

Реактивная тревожность порождается некоторой конкретной ситуацией, которая объективно характеризуется напряжением, беспокойством, нервозностью. Но тревожность не является изначально негативной чертой. Ненормальным является скорее снижение ситуативной тревожности, когда человек перед лицом серьезных обстоятельств демонстрирует безалаберность и безответственность, что чаще всего свидетельствует об инфантильной жизненной позиции, недостаточной сформированности самосознания.

Определенный уровень тревожности - естественная и обязательная особенность активной деятельной личности. У каждого человека существует свой оптимальный или желательный уровень тревожности - это так называемая «полезная тревожность». Оценка человеком своего состояния в этом отношении является для него существенным компонентом самоконтроля и самовоспитания.

При планировании данного исследования ожидалось, что показатели тревожности у больных будут выше, чем в контрольной группе. Анализ общей выборки показал, что высокая реактивная тревожность отмечена у

41,7% больных, а высокая личностная тревожность – у 62,5%. По сравнению с больными наиболее высокие показатели тревожности отмечены у родственников (табл.2). Так, личностная тревожность в среднем составила 48,5 баллов, реактивная – 45 баллов, тогда как у больных личностная тревожность равна 46,7, реактивная – 43,2 балла. Подобные данные были получены в работе Ахмадеевой Л.Р. [1], изучавшей тревожность у больных с наследственными нервно-мышечными заболеваниями и их родственников.

Выявленная высокая личностная тревожность у родственников по сравнению с больными характеризует их тревожные расстройства, чувство вины, гнева, негодования, обиды и враждебность к семье и его членам возможно за социальную изоляцию, и неспособность создать свою семейную жизнь в будущем, психосоматические жалобы. [8, 9]. Обычно в семьях, отягощенных наследственными заболеваниями (спиноцеребеллярной атаксией 1 типа и миотонической дистрофией), члены семьи не афишируют о заболевании, а информацию о наследственном характере заболевания порой тщательно скрывают не только от других родственников, а иногда и от супругов и детей. Но в связи с локальным накоплением больных с наследственной патологией в малочисленных сельских поселках, избегают контакта с этими семьями. В итоге семейству, обремененному генетическим заболеванием, вероятно, придется иметь дело с утратой физического здоровья больного человека, психическим дистрессом, изменением семейных отношений и в итоге, потерей больного, т.е. его смертью. И все это сопровождается позором, скрытностью и социальной изоляцией данной семьи [8]. Другой причиной высокой тревожности у непораженных родственников может быть постоянное, длительное общение с больными родственниками и под их влиянием.

В нашей работе при разделении выборки по полу выявленные различия в показателях тревожности оказались следующими: как реактивная, так и личностная тревожность была

Таблица 3

Сравнительная оценка показателей личностной тревожности в различных группах обследованных

Группа	Мужчины	Женщины
1-я	44±5,5 $t=-0,166$ ; $p>0,1$	48±2,2 $t=-9,480$ ; $p<0,001$
2-я	44,9±1,2 $t=-1,944$ ; $p>0,05$	49,9±1,2 $t=-25,494$ ; $p<0,001$
3-я	43,8±1,7	45,4±0,7

Примечание. При сравнении мужчин 1-й и 2-й групп с 3-й  $p>0,1$ , при сравнении женщин  $p<0,001$ .

несколько выше у женщин из второй группы (табл.3-4).

Высокая личностная тревожность также выявлена у больных женщин. Таким образом, повышенный уровень тревожности является субъективным проявлением неблагополучия личности.

Отмечена умеренная реактивная тревожность во всех группах вне зависимости от пола. У мужчин показано отсутствие высокой личностной тревожности (табл.3-4). У них во всех обследованных группах выявляется умеренная личностная тревожность, хотя у психологов существует мнение, что пациенты женского пола более легко реагируют на хроническое заболевание [1], объясняемое психофизиологическими особенностями пола и психологическими традициями роли женщины и мужчины в определенных обществах и культурах.

Следовательно, в отличие от больных женщин, у больных мужчин выявлена лишь умеренная личностная тревожность.

В контрольной группе как у мужчин, так и у женщин отмечены умеренные показатели реактивной и личностной тревожности.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии высокой личностной тревожности, преимущественно за счет женщин, и умеренно повышенной реактивной тревожности у больных со спиноцеребеллярной атаксией 1 типа и миотонической дистрофией и их непораженных родственников, проживающих вместе с ними, по сравнению с контрольной группой.

### Заключение

Существенную часть в структуре заболеваемости и смертности человека в настоящее время составляют наследственные болезни. По данным V.A.McKuisick, известно более 5000, и этот список постоянно увеличивается. Подавляющее большинство наследственных болезней имеют хроническое течение и являются инкурабельными.

Таблица 4

Сравнительная оценка показателей тревожности в различных группах обследованных

Показатель	Больные n=24 (группа 1)	Родственники n=40 (группа 2)	Контроль n=130 (группа 3)
Реактивная тревожность	43,2±1,63	45,0±1,37	41,6±1,54
Личностная тревожность	46,7±2,29	48,5±1,49	45,1±0,69

Примечание. При сравнении больных и родственников с группой контроля  $p<0,001$ , между больными и родственниками  $p>0,01$ .

Важно и тот факт, что эти заболевания поражают чаще лиц трудоспособного возраста и быстро приводят к инвалидизации больных, нередко и к смерти в молодом возрасте [2]. Наследственные болезни нервной системы, такие как спиноцеребеллярная атаксия 1 типа и миотоническая дистрофия, характеризуются особой тяжестью клинических проявлений и неуклонно прогрессирующим течением и на сегодняшний день отсутствуют радикальные методы их лечения. В связи с этим значимым является медико-генетическое консультирование отягощенных семей, включающее психологическую поддержку и социальную адаптацию как эффективные методы помощи. Для улучшения качества работы с манифестными больными, доклиническими носителями и членами их семей врач – генетик должен иметь представление о психологических особенностях пациентов. В данной работе представлен результат анализа тревожности наследственных моногенных заболеваний – спиноцеребеллярной атаксии 1 типа и миотонической дистрофии в РС(Я).

- У больных отмечена высокая личностная (46,7 баллов) и умеренная реактивная (42,5 баллов) тревожность. И вопреки нашим прогнозам у здоровых родственников выявлена высокая личностная тревожность, по количественным баллам даже чуть выше, чем у больных – 48,5 балла ( $p < 0,001$ ), что указывает на достоверную разницу.

- Выявлены различия между мужчинами и женщинами по показателю личностной тревожности. У мужчин отмечена умеренная личностная тревожность как в группе больных ( $p > 0,1$ ), так и в контрольной группе. Тогда как у женщин личностная тревожность высокая в 1-й и 2-й группах ( $p < 0,001$ ).

- Таким образом, полученные данные найдут свое применение при проведении медико-генетического консультирования пациентов и семей с наследственными заболеваниями, в том числе при проведении пресимптоматической и пренатальной ДНК-диагностики.

#### Литература

1. Ахмадеева Л.П. Наследственные нервно-

мышечные заболевания в Республике Башкортостан (вопросы патогенеза, клиники и прогноза): Дисс...д-ра мед.наук. – Уфа, 2001 г.

2. Ключников С.А., Иванова-Смоленская И.А., Никольская Н.Н., Иллариошкин С.Н., Маркова Е.Д., Бодарева Э.А. Этические проблемы медико-генетического консультирования на примере хореи Гентингтона // Российский медицинский журнал. - 2000. - №2.

3. Малкина-Пых И.Г. Психосоматика. Справочник практического психолога. – Питер, 2004 г.

4. Назаренко Л.П. Эпидемиология наследственных болезней и особенности медико-генетического консультирования // Медицинская генетика. – 2004. – Т.3. - №3.

5. Ноговицына А.Н. Отягощенность населения Республики Саха (Якутия) наследственной патологией и анализ работы региональной медико-генетической консультации: автореф. дис...канд. мед. наук. – Томск, 2001 г.

6. Платонов Ф.А. Наследственная мозжечковая атаксия в Якутии: автореф. дис...д-ра мед. наук. – Москва, 2003.

7. Сухомясова А.Л. Миотоническая дистрофия в Республике Саха (Якутия): популяционные особенности и подходы к ДНК-тестированию // Якутский медицинский журнал. – 2003. - №2

8. J. K.Williams et al. Psychosocial impact of predictive testing for Huntington disease on support persons // Am. J. of Med.Genet. 2000:96.

9. B.Meiser, S.Dunn Psychological impact of genetic testing for Huntington's disease: an update of the literature // J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry. 2000:69.

В.Л. Ижевская

## МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ: ЗНАЧЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ ЭТИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ

УДК 616-056.7:174

Обсуждается значение медико-генетического консультирования при проведении генетического тестирования в практике здравоохранения. Представлен обзор новых международных документов, посвященных этическим аспектам медико-генетического консультирования и генетического тестирования.

**Ключевые слова:** медико-генетическое консультирование, генетическое тестирование, биоэтика

The value of genetic counseling at carrying out of genetic testing in public health services is discussed. The review of new international documents devoted ethical aspects of genetic testing for health purposes is presented.

**Keywords:** genetic counseling, genetic testing, bioethics.

#### Введение

Медицинская генетика – одна из областей медицины, которая лежит в фокусе рассмотрения этической проблематики в последние годы. Это во многом связано с реализацией международного проекта «Геном человека» и практическим применением его достижений. Среди этих достижений в первую очередь следует упомянуть новые технологические возможности по диагностике и профилактике моногенной наследственной патологии. Результаты исследования генов, участвующих в формировании генетической предрасположенности к частым болезням, таким как диабет, онкологические заболевания, болезни сердечно-сосудистой системы, шизофрения, аутизм,

остеопороз и т.д. сегодня неоднозначны и не столь впечатляющи, как для моногенной патологии, хотя и здесь имеются определенные достижения. Все чаще в практике здравоохранения начинают применяться фармакогенетические подходы для индивидуализации применения лекарственных препаратов с учетом генотипа пациента.

Таким образом, медицина становится все более «геномной» и все больше людей сталкиваются в своей жизни с результатами генетического тестирования и генетическими проблемами [6].

#### Значение медико-генетического консультирования при проведении генетического тестирования

Выявление наследственного заболевания при неонатальном скрининге, идентификация мутаций, повышающих риск развития онкологических заболеваний, позитивные результаты пренатального теста на синдром Дауна – все

эти (и многие другие) сценарии сталкивают пациента со сложной информацией, которую необходимо понять и которая вызывает стресс, психологический дискомфорт, противоречивые чувства [1]. При этом от пациента часто требуется принятие трудных решений о необходимости пройти генетическое тестирование или отказаться от него, учесть генетическую информацию при планировании деторождения и т.д. Для этого человеку приходится учесть много практических, этических и глубоко личных аспектов проблемы, к восприятию которых он не всегда в достаточной мере подготовлен.

Медико-генетическое консультирование призвано облегчить процесс восприятия генетической информации: врачи-генетики должны помочь пациенту, его семье понять медицинские и социальные аспекты наследственного заболевания, осознать возможные последствия возникающих ситуаций и

принять информированное решение, основанное на их собственных ценностях и обстоятельствах жизни [5].

При генетическом консультировании врач исходит из того, что наследственное заболевание поражает семью, а не только индивида. Семейное накопление определенных заболеваний может привести пациента к убеждению, что его семья является «злополучной». Такие убеждения уходят корнями в семейную историю, часто имеют в основе неправильно понятую генетическую информацию и приводят к формированию таких чувств как вина, позор. Поэтому, с одной стороны, результаты генетического тестирования пациента могут иметь очень большое значение для его родственников. С другой стороны, врач-генетик должен пытаться улучшить психологическое состояние семьи и уменьшить у консультирующихся чувство вины за наследственную патологию.

Генетическое консультирование включает:

- интерпретацию семейного и медицинского анамнеза для оценки риска возникновения или повторения заболевания;
- просвещение пациента и/или его родственников относительно наследственной природы заболевания, возможностей генетического тестирования, медицинской помощи, профилактики, социальной поддержки и научных исследований в этой области;
- консультирование с целью облегчить сознательный выбор способа поведения с учетом полученной информации, помочь пациенту и его семье адаптироваться к заболеванию или риску его возникновения;
- психологическую поддержку пациента и его семьи [5].

Решение пациента о генетическом обследовании часто приводит к серьезным психологическим проблемам, причем любой из возможных результатов тестирования (выявление или невыявление носительства аллеля, приводящего к заболеванию, заключение о неоднозначности теста или о невозможности его проведения по тем или иным причинам) может привести как к положительным, так и к отрицательным последствиям.

Например, если при генетическом тестировании женщины установлено, что она имеет высокий риск развития рака молочной железы из-за носительства мутации в гене BRCA-1 или -2, у нее могут возникнуть разные противоречивые чувства. Это может быть страх за свое здоровье и удовлетворе-

ние от известности своего генетического статуса, позволяющего своевременно предпринять профилактические меры, необходимость принять трудное решение о профилактических вмешательствах (мастэктомии или терапии тамоксифеном) и их медицинских и социальных последствиях, беспокойство о детях, которые могли унаследовать мутантный аллель и т.д. Поэтому для сохранения психологического благополучия пациентов очень важно проведение адекватного медико-генетического консультирования до, во время и после генетического тестирования.

Решение, которое принимает пациент (или семья) при медико-генетическом консультировании, сильно зависит от настроения и личного жизненного опыта консультирующегося. Личная оценка возможного вреда или пользы от принятого решения и личностные характеристики консультирующегося, такие как оптимизм или пессимизм, влияют на интерпретацию генетического риска.

Очень часто в процессе принятия решения участвуют несколько членов семьи (например, в решении о прерывании или сохранении беременности при выявлении тяжелого заболевания у плода и др.), и врач-генетик должен учитывать возможность недопонимания, конфликтов или трудностей в общении между членами семьи.

Существенно влияние этнических, культурных, социальных, этических, религиозных установок пациента. Они могут влиять на степень готовности обсуждать семейную историю, медицинские проблемы, особенно касающиеся проблем инвалидности или психических заболеваний у родственников [6].

#### **Этические проблемы медико-генетического консультирования в связи с генетическим тестированием**

Во многом этические проблемы медико-генетического консультирования определяются особенностями информации, которую врач получает о пациенте в результате различных видов генетического тестирования.

Во-первых, генетическая информация воздействует на всю семью, а не только на больного человека; во-вторых, в результате генетического обследования можно предсказать неблагоприятные события в будущем у здорового на данный момент индивида или у членов его семьи; в-третьих, генетическая информация и сделанный на ее основе выбор могут воздействовать на будущие поколения.

Ситуация осложняется тем, что часто пациенты врача-генетика не могут

принять самостоятельные решения из-за детского возраста или ограниченной дееспособности, поэтому при проведении генетического тестирования необходимо предпринимать особые меры по защите прав детей и недееспособных [1].

Наиболее часто обсуждаются следующие этические проблемы медицинской генетики:

- Различные виды дискриминации и принуждения по генетическим признакам
- Конфликт прав пациента, его родственников
- Проблемы раскрытия генетической информации о пациенте его родственникам, супругам, третьим сторонам
- Генетический детерминизм [1, 5, 6]

Семейная природа генетической информации влечет за собой особый долг, который встает перед пациентом, информировать своих родственников, имеющих генетический риск, о необходимости обратиться в медико-генетическую консультацию. Международными организациями и российским законодательством признаются право на конфиденциальность генетической информации, право пациента знать медицинскую (в том числе и генетическую) информацию о себе, и право ее не знать (ст. 31 и ст. 61 Основ законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан) [2,3].

Хотя человек может пожелать остаться непроинформированным, или отказаться предоставить родственникам важную для них информацию, такая степень свободы может создать сложности в супружеских и семейных отношениях при принятии репродуктивного решения. Принцип взаимности в семьях предполагает ряд моральных обязательств супругов и членов семей друг перед другом. В современном законодательном процессе в ряде зарубежных стран обсуждаются и осознаются противоречия при осуществлении права на отказ знать свой генетический статус или на отказ предупреждать родственников о генетическом риске [3].

Особые проблемы возникают в связи с тем, что для большинства наследственных заболеваний диагностические возможности опережают терапевтические. Поэтому в качестве меры профилактики предлагается пренатальная диагностика заболевания с последующим селективным абортom пораженного плода, если семья примет такое решение.

Значительные различия в суждениях медиков, пациентов, общества в

разных культурах наблюдаются в вопросе о прерывании беременности, в том числе беременности неизлечимо больным плодом. В медико-генетической практике это отчасти связано с тем, что проявление наследственных, в том числе патологических признаков подвержено широкой вариации, которую обнаруживают как само проявление или не проявление генотипа, так и время и степень манифестации. Поэтому, даже обнаружив определенное изменение в геноме часто нельзя дать однозначный прогноз о его влиянии на здоровье человека, а, следовательно, нельзя и предложить однозначную этически приемлемую рекомендацию, скажем о сохранении и лечении пораженного плода [7].

В этих случаях значительно возрастает роль медико-генетической консультации для предоставления полной информации об особенностях клинического проявления заболевания. Принцип свободы выбора семьей репродуктивного решения должен быть сохранен, но выбор должен быть информированным. На индивидуальный выбор может влиять личное отношение к святости человеческой жизни, желание предотвратить страдания человека, социальные и экономические условия жизни при отсутствии адекватного лечения или социальной поддержки инвалидов и хронически больных. Традиционно аборт считался этически приемлемым при риске тяжелого наследственного заболевания у плода, но эта точка зрения сформировалась, когда можно было диагностировать пренатально небольшое число тяжелых наследственных заболеваний. Появление возможности пренатально диагностировать менее тяжелые заболевания, выявлять гены предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям, исследовать гены нормальных признаков вновь обострило эти дискуссии [7].

Этические принципы медико-генетического консультирования были сформулированы ранее [6]. В кратком виде они формулируются следующим образом:

- Уважение пациента и его семьи
- Защита целостности семьи
- Полное открытие всей информации о здоровье
- Защита приватности пациента от третьих сторон
- Информирование консультирующегося о его долге перед кровными родственниками, имеющими генетический риск, сообщить им нужную информацию

- Информирование пациента о необходимости сообщить информацию о результатах генетического тестирования супругу и о возможном вреде от такого сообщения

- Информирование пациента о его моральном долге раскрыть свой генетический статус при угрозе общественной безопасности

- Непредвзятое представление информации

- Непосредственный подход

#### **Новые документы, регулирующие медико-генетическое консультирование и генетическое тестирование**

В последние годы появился ряд новых документов международных организаций, которые посвящены генетическому тестированию и медико-генетическому консультированию. Среди них в первую очередь следует упомянуть Дополнительный протокол к Конвенции о правах человека и биомедицине о генетическом тестировании для целей здравоохранения, принятый Комитетом Министров стран-членов Совета Европы 14 мая 2008 г. [3].

В этом документе закрепляются права пациентов на уважение частной жизни, на информацию о себе, право не знать информацию, как и в ранее принятых документах. Однако указывается на возможность в исключительных случаях снять ограничения, связанные с реализацией этих прав, для пользы другого человека.

В документе указывается, что общими условиями всех видов генетического тестирования являются:

- Обеспечение защиты прав человека, преобладание прав человека над интересами общества и науки, запрет дискриминации и стигматизации по генетическим признакам.

- Обеспечение качества генетических услуг в здравоохранении. Генетическое тестирование должно осуществляться специально обученным персоналом. Требуется организация системы внешнего и внутреннего контроля качества всех видов генетического тестирования.

- Существенным критерием применения генетического теста в медицинской практике должна быть его клиническая полезность.

- Должна соблюдаться гарантия предоставления пациенту и его семье полной и непредвзятой информации о генетическом тестировании и его последствиях (как медицинских, так и социальных).

- Обязательность медико-генетического консультирования при прове-

дении генетического тестирования и скрининга.

Особое внимание в документе уделяется условиям генетического тестирования людей, не способных выразить свое согласие на обследование, а также условиям обследования этих категорий для пользы других членов семьи. Целью такого обследования должно быть получение членами семьи недееспособного человека важной для их здоровья профилактической, диагностической или терапевтической помощи, польза от которой была независимо оценена, или осуществление ими информированного выбора относительно своих репродуктивных планов. При этом должны быть соблюдены следующие условия:

- предполагаемая польза не может быть получена, если не выполнен этот тест,

- риск и бремя вмешательства минимальны для обследуемого человека,

- ожидаемая польза существенно превышает риск для частной жизни, который может явиться результатом сбора, обработки или сообщения результатов теста.

Обязательным условием тестирования является разрешение на обследование законного представителя человека, не способного выразить согласие, предусмотренное действующим законодательством. Человек, не способный выразить согласие, должен принять участие в процедуре принятия решения о тестировании в той мере, в какой он способен понять информацию и с учетом степени его зрелости. Тест не должен выполняться, если этот человек возразит против него.

Генетический тест в пользу других членов семьи может быть выполнен на биологических образцах умершего человека, полученных после его смерти, или когда он был еще жив, только если были получены его согласие или разрешение на тестирование, согласно действующему законодательству.

Большую работу по регламентации медико-генетического консультирования при генетическом тестировании провели Европейское общество генетики человека и EuroGentest. Экспертная группа EuroGentest подготовила руководство по медико-генетическому консультированию в связи с тестированием [4]. В определенном смысле генетическое консультирование при молекулярно-генетическом тестировании можно рассматривать как самостоятельное направление со своей методологией.

В соответствии с этим документом

медико-генетическая консультация должна быть неотъемлемой частью процесса генетического тестирования. Она должна проводиться подготовленным в области консультирования специалистом на понятном консультирующемуся языке. До проведения тестирования должно быть получено свободное информированное согласие пациента.

В руководстве подробно анализируется, в каких ситуациях необходимо медико-генетическое консультирование до и после проведения теста, а в каких можно ограничиться информацией о тесте, приводятся общие рекомендации о генетическом консультировании и описывается содержание консультации (вопросы, которые должны быть обсуждения, объем необходимой информации и возможная форма ее предоставления консультирующемуся) до проведения теста, после него, а также объем необходимой информации (или консультации) при генетическом скрининге. Особо подчеркивается необходимость предоставить возможность консультации с психологом после сообщения результатов теста (если

есть такая возможность) и необходимость долгосрочной психологической поддержки при доклиническом тестировании на заболевания с поздним возрастом начала и отсутствием эффективного лечения.

### Заключение

Внедрение генетических тестов во многие области медицины требует от пациентов и общества в целом большего понимания генетической информации, необходимой при принятии сложных решений, касающихся широкого спектра репродуктивных проблем, медицинских вмешательств и изменений стиля жизни. При этом когнитивное и эмоциональное воздействие генетики будет все больше возрастать по мере усиления ее роли в медицине и здравоохранении. Медико-генетическое консультирование при различных видах генетического тестирования в здравоохранении, использование международного опыта решения этических проблем в медицинской генетике, учет национальных особенностей и традиций необходимы для работы современной медико-генетической службы.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 07-06-00344-а.*

### Литература

1. Европейская Комиссия. Независимая экспертная группа. 25 рекомендаций по этике, юридическим и социальным последствиям генетического тестирования / Люксембург: Отдел официальных публикаций Европейского сообщества, 2004. – 26 с.
2. Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан от 22 июля 1993 г. № 5487-1
3. Council of Europe. Additional Protocol to the Convention on Human Rights and Biomedicine, concerning Genetic Testing for Health Purposes. Strasbourg, 2008. <http://conventions.coe.int/Treaty/EN/Treaties/Html/TestGen.htm>
4. EuroGentest Recommendations for genetic counselling related to genetic testing <http://eurogentest.org>
5. Proposed International Guidelines on Ethical issues in Medical Genetics and Genetic Services. Report of WHO Meeting on Ethical Issues in Medical Genetics. Geneva, 15-16 December 1997. World Health Organization. Human Genetics Programme. – 15 p.
6. WHO. Genomics and World Health. Report of a WHO scientific Group. HLB:QZ 50 – 2002 – 125 p.
7. WHO, Report of consultants to WHO. Wertz D.C., Fletcher J.C., Berg K. Review of ethical issues in medical genetics. 2001. – 103 p.

С.К. Кононова, О.Г. Сидорова, С.А. Федорова, Ф.А. Платонов, Л.Г. Гольдфарб, В.Л. Ижевская, Э.К. Хуснутдинова

## ОПЫТ ИЗУЧЕНИЯ ЭТИЧЕСКИХ, ПРАВОВЫХ И СОЦИАЛЬНЫХ ВОПРОСОВ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ В ЯКУТИИ

УДК 616 – 082.5: 614.253 : 571.56

### Введение

Наряду с успехами генетики в изучении генома человека особенностью нового столетия стало более тесное взаимодействие гуманитарных и естественных наук, в частности развитие нового междисциплинарного направления в науке – биоэтики. Биоэтика, являясь неотъемлемой частью философии, выступает в качестве прикладной этики, наряду с решением множества других задач, определяющей моральное регулирование использования

**КОНОНОВА Сардана Кононовна** – к.б.н., с.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, [konsard@gambler.ru](mailto:konsard@gambler.ru); **СИДОРОВА Оксана Гаврильевна** – врач генетик МГК ПЦ РБ№1-НЦМ; **ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна** – д.б.н., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; **ПЛАТОНОВ Фёдор Алексеевич** – д.м.н., зам директора по клинической работе ФГНУ Институт здоровья; **ГОЛЬДФАРБ Лев Герцевич** – MD (д-р медицины), проф., зав. лаб. Национальных Институтов Здоровья, США; **ИЖЕВСКАЯ Вера Леонидовна** – д.м.н., проф., зам. директора по научной работе МГНЦ РАМН; **ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна** – д.б.н., проф., чл.-корр. АН РБ, зав. отделом геномики Института биохимии и генетики УНЦ РАН.

новых технологий в медицине: молекулярно-генетических, репродуктивных, трансплантологии и т.д. Законы, принципы и правила биоэтики, безусловно, формальны и в сравнении с глубокими философскими истолкованиями смысла жизни – поверхностны. Однако биоэтика содержит в себе ресурсы мирного разрешения моральных коллизий, возникающих между членами общества, придерживающихся различных взглядов на жизнь. Она строится на использовании демократических процедур открытого общества [12].

Одним из четырех генеральных направлений программы «Геном человека» является исследование этических, правовых и социальных вопросов геномных технологий – ELSI. Каждому из аспектов (этическому, правовому и социальному) этой обширной программы посвящено большое количество зарубежных публикаций. По сравнению с мировой наукой в Российской Федерации исследования в данной области только накапливают первоначальный опыт, существуют всего лишь единичные публикации [4, 11]. Подобные исследования представляются

нам чрезвычайно важными ввиду того, что в России расширяются возможности молекулярно-генетических методов диагностики, ДНК-тестирования, пренатальной диагностики, генетической паспортизации и т.д. Территориально-экономические и национальные особенности субъектов Российской Федерации усиливают актуальность поиска собственных путей решения этических, правовых и социальных проблем с учётом опыта тех стран, где биоэтика получила своё развитие.

### Краткий обзор генетических исследований в Республике Саха (Якутия)

В 1975 г. Г.Л. Зубри, Л.Г. Гольдфарб и др. впервые описали аутосомно-доминантную мозжечковую атаксию в якутской популяции, включая сведения о распространении, типе наследования, клинических проявлениях и патоморфологии. В 1989 г. в статье Л.Г. Гольдфарба, М.П. Чумакова, П.А. Петрова и др. «Оливопонтоцеребеллярная атаксия в большой якутской семье Восточной Сибири» подведены итоги исследований по клинической дифференциации и распространённости

наследственной мозжечковой атаксии в Якутии за 1970-85 гг. [15].

В 90-е г. в Якутии были проведены генетико-эпидемиологические исследования общего груза наследственной патологии четырех сельскохозяйственных районов, включившие эпидемиологию некоторых отдельных форм наследственных заболеваний [7]. В это же время начала свою работу Международная программа «Биология вилюйского энцефаломиелимита» под руководством К. Гайдуса (США). В рамках данной программы в 1992-1995 гг. проведены совместные международные экспедиции по изучению эпидемиологии вилюйского энцефаломиелимита, мозжечковой атаксии и сбору биологического материала. В исследованиях Lunkes et al. было продемонстрировано преимущественное сцепление наследственной мозжечковой атаксии 1-го типа с микросателлитным локусом D6S274 на 6-й хромосоме [13]. В дальнейшем на большом количестве образцов ДНК больных и их родственников на базе лаборатории нейрогенетики Национальных Институтов Здоровья (США) были установлены основные молекулярно-генетические характеристики спиноцеребеллярной атаксии 1-го типа (СЦА1) в якутской популяции [16]. В 1995 г. впервые внедрен метод прямой ДНК-диагностики СЦА1 в лаборатории генома человека Института здоровья АН РС (Я). В 2000 г. метод ДНК-тестирования пациентов из семей с СЦА1 как продукт описанных выше научных изысканий стал рутинным анализом, проводимым в лаборатории молекулярной генетики медико-генетической консультации РБ№1-НЦМ МЗ РС (Я).

Благодаря принятой Республиканской целевой программе «Развитие генодиагностики человека в Республике Саха (Якутия) на 2001-2005 гг.» (постановление Правительства Республики Саха (Якутия) от 11 мая 2001 г. №277) и образованию Якутского научного центра РАМН и Правительства РС (Я) генетические исследования продолжились быстрыми темпами. В якутской популяции были изучены другие частые наследственные заболевания: миотоническая дистрофия (МД) [5], наследственная несиндромальная сенсоневральная глухота [6]. Н.М. Галеева с соавт. обнаружили молекулярно-генетическую причину наследственной метгемоглобинемии 1-го типа в якутской популяции [2]. Н.Р. Максимовой с соавт. были установлены частые в Якутии мутации при ряде моногенных заболеваний (окулофа-

рингеальная миодистрофия, болезнь Кеннеди, атаксия Фридрейха), впервые идентифицированы ранее неизвестные мутации для характерных якутам наследственных синдромов с низким ростом и аутосомно-рецессивным типом наследования (3-М синдром и нанизм с субатрофией зрительного нерва, дистрофией сетчатки и пельгеровской аномалией лейкоцитов) [3].

#### **Биоэтические исследования**

Универсальными биоэтическими принципами, на базе которых вырабатываются конкретные моральные нормы поведения врача, являются принципы автономии личности, информированного согласия и конфиденциальности [12].

Объективная необходимость этического регулирования медицинской деятельности возникла непосредственно в процессе внедрения ДНК-тестирования спиноцеребеллярной атаксии 1-го типа в практику медико-генетической консультации. Первый этический вопрос заключался в форме взаимоотношений врач-пациент при сообщении тестируемому результатов ДНК-диагностики, при этом особенно остро возникла проблема пресимптоматического тестирования доклинических носителей мутации СЦА1. В своих разработках мы ориентировались на опыт решения сходных проблем ДНК-тестирования хорей Гентингтона (ХГ) в странах, где уже действовали этические правила ДНК-диагностики и медико-генетического консультирования индивидов/семей с ХГ, и на международные руководства [14]. Прежде всего нами были очерчены этические проблемы, характерные для медико-генетической консультации в новых условиях применения ДНК-технологий в повседневной медицинской практике в республике: генетическое тестирование поздно манифестирующих наследственных заболеваний, тестирование детей, пренатальная диагностика.

Международным сообществом специалистов по генетике и этике установлено, что одним из наиболее этических подходов во взаимодействии врача и пациента является предоставление полной и непредвзятой информации о всех аспектах заболевания, на основе которой пациент может сделать информированный выбор способа поведения. Для реализации этого положения нами была разработана форма информированного согласия пациента на пресимптоматическое ДНК-тестирование СЦА1, которая стала применяться в практике генетического кон-

сультированияотягощенных семей [1].

В настоящее время в практике Медико-генетической консультации РБ №1-НЦМ ДНК-диагностика стала возможной для 12 различных моногенных заболеваний. Однако внедрение в практическую медицину ДНК-диагностики других распространенных в республике наследственных моногенных нозологий, требует разработки дифференцированных биоэтических подходов в зависимости от типа наследования, возраста манифестации, тяжести фенотипических проявлений, от клинического полиморфизма каждого наследственного заболевания [8]. К примеру, этические проблемы при заболеваниях с поздним началом манифестирования (спиноцеребеллярная атаксия 1 типа, окулофарингеальная дистрофия) качественно отличаются от проблем, возникающих в связи с консультированием семей с наследственными заболеваниями, проявляющимися в раннем детском возрасте. Возможность применения скрининговых программ для выявления гетерозиготных носителей мутаций генов, приводящих к развитию частых в Якутии наследственных болезней, также требует предварительной этической оценки пользы и рисков для популяции.

Исходя из современных рекомендаций ВОЗ и сложившихся условий дальнейшие перспективы медико-генетической службы в Якутии в этическом контексте должны быть связаны с усилением информационного и психологического аспектов деятельности. Медико-генетическая консультация должна не только участвовать в установлении диагноза наследственного заболевания и определения генетического риска, но и помогать адаптации пациентов к их ситуации, возможному появлению больного ребенка в семье, к необходимости пересмотреть репродуктивное поведение, планы на жизнь или профессиональную деятельность. Эффективность МГК могла бы выражаться в доле тех отягощенных наследственной патологией семей, которые адекватно воспринимая генетическую информацию, корректировали бы свое репродуктивное поведение.

Не меньшее значение должна иметь деятельность медико-генетической службы по просвещению медицинских работников и населения Республики в вопросах медицинской генетики и профилактики наследственной патологии.

#### **Правовые и социальные аспекты**

В 2000 г. впервые был принят Закон Республики Саха (Якутия) «О профи-

лактике некоторых наследственных заболеваний и врожденных пороков развития у человека». Во многом благодаря внедрению молекулярно-генетических методов диагностики наследственных болезней в практику МГК и начатым биоэтическим исследованиям в 2003 г. некоторые статьи данного Закона были пересмотрены. Сравнивая оба документа, в старой и новой редакции, можно, в частности, проследить, как менялось отражение принципа директивности МГК в пунктах, касающихся прав пациентов. В старой редакции Закона РС (Я) от 18.04.2000г (ст.5) были специально оговорены обязанности граждан в отношении профилактики наследственной патологии. Дословно: «Граждане обязаны: а) заботиться и нести ответственность за свое здоровье, а также за здоровье своего потомства; б) при наличии в роду или семье наследственных заболеваний, приводящих к инвалидности и смертности, своевременно обращаться в медико-генетическую службу; в) выполнять медицинские предписания и рекомендации по предупреждению рождения детей с наследственными заболеваниями [9]. В новой редакции Закона РС(Я) от 16.09.2003 г. нет статьи об обязанностях, однако появились положения, гарантирующие защиту прав граждан. В ст.4 «Права граждан» говорится: «Граждане в рамках Основ законодательства об охране здоровья граждан и государственных гарантий оказания бесплатной медицинской помощи населению имеют право на: а) самостоятельное решение об обращении за медико-генетической консультацией и проведении профилактических мероприятий; б) получение от медицинских работников своевременной, полной и объективной информации о необходимости профилактической и лечебно-диагностической помощи, последствиях отказа от нее; в) получение профилактической помощи с целью предупреждения наследственных заболеваний у потомства и рождения детей с врожденными пороками развития; г) сохранения в тайне информации о состоянии здоровья, диагнозе и иных сведений, полученных при обследовании и лечении; д) бесплатное обследование [10].

Социальные аспекты биоэтических проблем генетических технологий обсуждались на международном семинаре «Развитие биоэтики в Республике Саха (Якутия)» (2005 г.) с участием экспертов ЮНЕСКО, философов, представителей заинтересованных министерств и ведомств. В 2006 г. в

Республике Саха (Якутия) был создан первый локальный этический комитет при ЯНЦ КМП СО РАМН, целью которого является этическая экспертиза протоколов научных исследований с участием человека в качестве объекта исследования. Была проведена этическая экспертиза 38 протоколов научных исследований, большая часть которых (44%) выполнялась в ЯНЦ КМП СО РАМН, 16% - в РБ№1 – НЦМ, 11% - в РБ№2 – ЦЭМП. В меньшем количестве научные работы представлялись из ФГНУ «Институт здоровья», больницы №1 МЗ РС (Я), МУ ЯГКБ, Мединститута ЯГУ. В настоящее время большее число научных работ представлено эпидемиологическими и медико - социальными исследованиями (56%), основанными на анализе медицинской документации, 15% - работы хирургического характера, 22% составили генетические исследования. Члены этического комитета заостряли внимание исследователей на соблюдение основных принципов биоэтики: информированного согласия и конфиденциальности генетической информации. Две обширные научные программы, представленные на экспертизу, являлись скрининговыми: исследование здоровья долгожителей и подростков в условиях Якутии.

В 2007 г. в рамках XV съезда медицинских работников и общественности было проведено заседание «круглого стола» «Биоэтические проблемы в современном практическом здравоохранении» с участием ведущих специалистов по медицинской генетике Медико-генетического научного центра РАМН (г. Москва).

В настоящее время перспективы развития биоэтики в Республике Саха (Якутия) таковы:

- в ходе реализации рекомендаций ЮНЕСКО и резолюции «круглого стола» ведётся работа по созданию сети локальных больничных этических комитетов, целью которых является регулирование этических проблем, возникающих в процессе медицинской деятельности;

- для координации работы локальных этических комитетов требуется создание Национального Комитета Республики Саха (Якутия) по биоэтике;

- разрабатывается новая концепция в здравоохранении Якутии «community genetics» - социальная генетика, регулирующая процессы воздействия генетических технологий на практическое здравоохранение с акцентированием вопросов образования населения и

медицинских работников в области генетики человека.

Таким образом, можно констатировать, что биоэтика как новое научное направление получила развитие в Республике Саха (Якутия) в ходе практических механизмов реализации её основных принципов.

## Литература

1. Биоэтические проблемы пресимптоматической ДНК-диагностики спиноцеребеллярной атаксии 1-го типа в практике медико-генетической консультации Якутии / С.К. Кононова [и др.] // Медицинская генетика.-2005.-№12.-С.583-588.
2. Галева Н.М. Молекулярно-генетическая причина наследственной меттемоглобинемии первого типа в Якутии/ Н.М. Галева, Л.М. Назаренко, С.А. Назаренко // Мед.генетика.- 2006.-Т.5.-С.15-20.
3. Генетико-эпидемиологические и социально-экономические аспекты наследственной этноспецифической патологии и подходы в ДНК-диагностике/ А.Л. Сухомясова [и др.] // Медицинская генетика.-2008.-Т.7.-№10(76).-С.35-43.
4. Иванов В.И. Основные биоэтические проблемы генетического тестирования/ В.И. Иванов, В.Л. Ижевская //Биомедицинская этика. Вып3. Под ред. В.И. Покровского, Ю.М. Лопухина, М.: Медицина, 2002.-С.77-94.
5. Миотоническая дистрофия в РС(Я): популяционные особенности и подходы в ДНК-диагностике/ А.Л. Сухомясова [и др.] // Якутский медицинский журнал.-2003.-№2.- С.12-17.
6. Мутации гена коннексина 26 (GJB2) у больных наследственной несиндромальной сенсорной тугоухостью в Республике Саха (Якутия)/ Н.А. Барашков [и др.] // Вестник оторинолар. - 2008.-№5. С.23-28.
7. Ноговицына А.Н. Отягощенность населения Республики Саха(Якутия) наследственной патологией и анализ работы региональной медико-генетической консультации: Автореф. дис. канд. мед. наук / А.Н. Ноговицына. - Томск, 2001. - 24с.
8. Организационные, методические и этические проблемы ДНК-диагностики моногенных заболеваний в практике медико-генетической консультации Якутии/ С.К. Кононова [и др.] // Медицинская генетика.-2006.-С.14-17.
9. «О профилактике некоторых наследственных заболеваний и врождённых пороков развития у человека» / Закон Республики Саха (Якутия). Принят Постановлением Палаты Представителей Государственного Собрания (Ил Тумен) Республики Саха (Якутия) от 18.04.2000 3№174 –11.
10. «О профилактике некоторых наследственных заболеваний и врождённых пороков развития у человека» (новая редакция) / Закон Республики Саха (Якутия). Принят Постановлением Палаты Представителей Государственного Собрания (Ил Тумен) Республики Саха (Якутия) от 16.09.2003 3№144 - 111.
11. Тетушкин Е.Я. Генетическая дискриминация при страховании и трудоустройстве/ Е.Я. Тетушкин // Генетика.- 2000.- Т.36.-№7.- С.887-899.
12. Тищенко П.Д., Юдин Б.Г. Проблемы биоэтики в СМИ / П.Д. Тищенко, Б.Г. Юдин - М.: Эслан, 2006.- 93с.
13. Autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA) in a Siberian Founder Population: assignment to the SCA1 locus/ A. Lunke [et al.] // Experimental neurology.-1994.-Vol.126.-P.310-312.
14. Guidelines for the molecular genetics predictive test in Huntington's Disease//Neurology.-1994.-№44.-P.1533-1536.
15. Olivo-pontocerebellar ataxia in a large lacut kindship in Eastern Siberia/ L.G. Goldfarb [et al.]// Neurology.-1989.-Vol.39.-P.1527-1524
16. Unstable Triplet Repeat and Phenotypic Variability of Spinocerebellar Ataxia Type 1/ L.G. Goldfarb [et al.] // Ann. Neurol.- 1996.- Vol.39.-№ 4.-P.500-506.

Н.А. Скрябин, И.Н. Лебедев, Е.Н. Толмачева, Н.В. Чердынцева

**РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ ИНГИБИТОРОВ ЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫХ КИНАЗ В ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ РЕТИНОБЛАСТОМНОГО ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

УДК 575.23:616-006.6

Проведено исследование характера метилирования генов контроля клеточного цикла RB1, p14ARF и p15INK4B в образцах опухолевой ДНК, полученных от 40 женщин с диагнозом рак молочной железы. Аберрантное метилирование генов p14ARF и p15INK4B зарегистрировано с частотой 72% и 12% соответственно, тогда как метилирования гена RB1 отмечено не было. Высказана гипотеза, что эпигенетическая инактивация RB-зависимого пути регуляции клеточного цикла при раке молочной железы происходит на уровне ингибиторов циклин-зависимых киназ.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, метилспецифическая ПЦР, ингибиторы циклин-зависимых киназ.

Methylation *STATus* of RB1, p14ARF, and p15INK4B cell-cycle control genes was investigated in 40 cases of breast cancer by methylation-specific polymerase chain reaction. The frequency of cancer-related gene methylation was: p14ARF (72%), p15INK4B (12%) and RB1 (0%). It is suggested that epigenetic inactivation of Rb growth-control pathway in breast cancer can be mediated on the cycline-dependent kinase inhibitors level.

**Keywords:** breast cancer, methylation-specific PCR, cycline-dependolent kinase inhibitors.

**Введение**

Злокачественные новообразования являются одной из важнейших проблем современного общества. В Сибири и на Дальнем Востоке ежегодно регистрируется около 80 000 больных с впервые в жизни установленным диагнозом злокачественного новообразования. В конце 90-х гг. (1990-2001) показатель заболеваемости вырос на 25,1%. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения региона Сибири и Дальнего Востока рак молочной железы (РМЖ) стоит на первом месте и занимает 18,8% [2]. Различные генетические нарушения являются типичной характеристикой практически всех злокачественных новообразований. Аберрантное метилирование ДНК, приводящее к инактивации транскрипции опухолесупрессорных генов, является одним из таких нарушений. Метилирование промоторных регионов генов RB1, p14ARF и p15INK4B, вовлеченных в ретинобластомный и p53-зависимый пути регуляции клеточного цикла, встречается с различной частотой при многих типах злокачественных новообразований, в том числе и при РМЖ. Однако исследования, в которых одновременно проводился анализ эпигенетического статуса нескольких

генов, участвующих в общих метаболических или регуляторных путях, являются единичными, что ограничивает представления об особенностях эпигенетической дисрегуляции генной активности при развитии опухолевого процесса.

Целью настоящего исследования явилась сравнительная характеристика статуса метилирования промоторных регионов онкосупрессорных генов RB1, p14ARF и p15INK4B в образцах опухолей молочной железы, а также изучение особенностей их взаимодействия в эпигенетической инактивации RB-зависимого пути регуляции клеточного цикла.

**Материалы и методы**

Объектом исследования являлась группа женщин, больных раком молочной железы (n=40). Проведение исследования было одобрено Комитетами по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики СО РАМН и НИИ онкологии СО РАМН. Клинические данные больных были получены при анализе первичных документов – историй болезни и амбулаторных карт. Больные инфильтрирующим операбельным РМЖ стадии T1-4N0-3M0-1 получали лечение в НИИ онкологии СО РАМН в 1996-2006 гг. Средний возраст больных на момент заболевания составил 50,8 лет (31-71 лет). У 18 женщин (45%) менструальный цикл был сохранен, а 22 пациентки (55%) находились в менопаузе. При гистологическом исследовании операционного материала у 39 чел. был диагностирован инфильтрирующий протоковый, у 1 женщины (2,5%) – инфильтрирующий дольковый рак. Уницентрическая форма роста опухоли отмечена у 36 женщин, тогда как у 4 пациенток (10%) наблюдался мультицентрический рост опухоли.

Образцы ДНК были выделены из операционного материала опухолей с использованием стандартной фенол-хлороформной методики. Для определения статуса метилирования онкосупрессорных генов был использован метод бисульфитной модификации ДНК с последующей метилспецифической полимеразной цепной реакцией [12]. Для проведения амплификации использовали последовательности олигонуклеотидных праймеров, специфичных метилированному и неметилированному аллелю генов [5, 9, 11]. Фрагменты ДНК фракционировали с помощью гель-электрофореза в 2,5% агарозном геле и визуализировали в проходящем свете на установке «GelDoc» («Bio-Rad», США).

**Результаты и обсуждение**

Аберрантное метилирование онкосупрессорных генов p14ARF и p15INK4B было зарегистрировано с частотой 72 и 12% соответственно, тогда как метилирования RB1 отмечено не было. В большинстве случаев в исследованных образцах выявлялись и метилированные и неметилированные последовательности локусов. Наличие только метилированных аллелей было зарегистрировано в гене p14ARF в 12% случаев. В 10 из 40 образцов опухолевой ткани (22,5%) промоторы всех 3 генов находились в неметилированном состоянии. По клинической характеристике данная группа не отличалась от группы больных с эпимутациями. Возраст больных с эпимутациями был от 32 до 71 года (средний возраст – 52,65 ± 1,49 лет), у больных без эпимутаций – в пределах 31-65 лет (средний возраст – 46,56 ± 3,77 лет) (p = 0,119). Среди больных с эпимутациями мультицентрические опухоли

НИИ медицинской генетики СО РАМН: **СКРЯБИН Николай Алексеевич** – аспирант, skryabinn@mail.ru; **ЛЕБЕДЕВ Игорь Николаевич** – д.б.н., зав. лаб., igor.lebedev@medgenetics.ru; **ТОЛМАЧЕВА Екатерина Николаевна** – к.б.н., н.с., kate.tolmacheva@medgenetics.ru; **ЧЕРДЫНЦЕВА Надежда Викторовна** – д.б.н., зам. директора по научной работе НИИ онкологии СО РАМН, nvch@oncology.tomsk.ru.

Таблица 1

Частота метилирования генов *p14ARF*, *p15INK4B*, *RB1* и *CDKN1A* при различных типах рака

	<i>p14ARF</i>	<i>p15INK4B</i>	<i>RB1</i>	Литература	Тип рака
Частота метилирования при различных типах злокачественных новообразований	41%	41%	20%	[15]	Лимфома
	59%	40%	8%	[7]	Лимфома
	83,3%	50%	0%	[16]	Колоректальный рак
	15%	0%	5%	[6]	Рак эпидермиса
Частота метилирования при раке молочной железы	6%	32%	35%	[17]	Рак гипофиза
	50%	-	-	[4]	РМЖ
	-	0%	-	[9]	РМЖ
	-	-	-	[18]	РМЖ
	-	-	17%	[3]	РМЖ

Таблица 2

Комбинации метилирования генов *p15INK4b*, *p14ARF* и *RB1* при различных типах опухолей

Метилирование генов	Лимфома	Эпидермальный рак	Настоящее исследование РМЖ	Суммарная частота метилирования
<i>p15INK4b</i> , <i>p14ARF</i> и <i>RB1</i> , одновременное	0	0	0	0
<i>p14ARF</i> и <i>RB1</i> , одновременное	1 (4,5%)	1 (5%)	0	2 (2,4%)
<i>p15INK4b</i> и <i>RB1</i> , одновременное	0	0	0	0
<i>p14ARF</i> и <i>p15INK4b</i> , одновременное	6 (27,2%)	0	3 (7,5%)	9 (10,9%)
Только <i>p14ARF</i>	6 (27,2%)	2 (10%)	24 (60%)	32 (39%)
Только <i>p15INK4b</i>	2 (9%)	0	2 (5%)	4 (4,8%)
Только <i>RB1</i>	1 (4,5%)	0	0	1 (1,2%)
Отсутствие метилирования всех трех генов	6 (27,2%)	17 (85%)	11 (27,5%)	34 (41,4%)
Всего образцов	22	20	40	82
Ссылки	[7]	[6]		

наблюдались в 6,8%, а в образцах без эпимутаций – в 25% случаев ( $p = 0,19$ ). Менструальный цикл у больных с аномалиями метилирования был сохранен в 38,7%, у больных без аномалий метилирования – в 55,5% случаев ( $p = 0,30$ ). У образцов с эпимутациями наследственная отягощенность наблюдалась в 29%, в то время как у образцов без эпимутаций отягощенность – в 55,5% случаев ( $p = 0,09$ ).

Нами обнаружены результаты единичных исследований, в которых оценивался статус метилирования данных генов при РМЖ. Что касается других типов опухолей, то частоты метилирования генов *RB1*, *p14ARF* и *p15INK4B* варьируют в широком диапазоне (табл. 1). Однако эта информация не дает представления о механизмах эпигенетической инактивации путей регуляции клеточного цикла при развитии опухолевого процесса. В связи с этим нами была предпринята попытка провести

сравнительный анализ характера метилирования исследованных генов как в образцах опухолей молочной железы, так и при других типах рака, опираясь на доступные в литературе первичные данные (табл. 2).

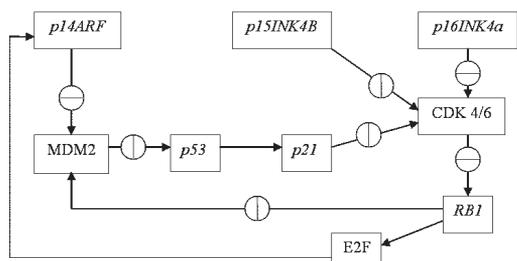
Для более ясного представления процессов, в которых задействованы данные гены, следует рассмотреть основные механизмы их взаимодействия в процессе регуляции клеточного цикла. Белок *RB* в норме связывает семейство транскрипционных факторов *E2F*. Фосфорилирование ретинобластомного белка, осуществляемого комплексом циклина *D* и циклин-зависимой киназы *CDK4*, приводит к высвобождению и активации транскрипционных факторов *E2F*, что индуцирует переход клетки с *G1*-фазы в *S*-период. Продукт гена *p15INK4B* формирует комплексы с циклин-зависимыми киназами, блокируя тем самым связывание последних с циклином *D1* и *CIP/KIP*-протеинами, что в конечном итоге ведет к ингибированию фосфорилирования *RB*-белка. При нарушении экспрессии гена *p15INK4B* происходит гиперфосфорилирование *RB*-белка, следовательно, и усиленная клеточная пролиферация (рисунок) [10].

Ген *p14ARF* участвует как в ретинобластомном, так и в *p53*-зависимом путях регуляции клеточного цикла. Аберрантная экспрессия *E2F* и *c-Myc* приводит к

активации белка *ARF*, продукта гена *p14ARF*. Белок *ARF* взаимодействует с *MDM2*-фактором и инициирует функционирование гена *p53*. Активация *p53* приводит к стимуляции транскрипции гена *CDKN1A*, который является ингибитором циклин-зависимых киназ (рисунок) [13].

Подобный механизм взаимодействия генов *RB1*, *p14ARF* и *p15INK4B* позволяет выдвинуть гипотезу о том, что при метилировании гена *RB1* изменение экспрессионной активности генов *p14ARF* и *p15INK4B* уже не будет оказывать влияния на *RB*-зависимый путь регуляции клеточного цикла, поскольку белок *pRB* будет отсутствовать в клетке, следовательно транскрипционный фактор *E2F* будет находиться в активном состоянии и без фосфорилирования *pRB*. Анализ литературных данных показывает, что метилирование гена *RB1* одновременно с генами *p15INK4B* и *p14ARF* происходит с невысокой частотой (4-5%) (табл. 2). При этом, безусловно, нельзя исключить возможность участия генов *p15INK4B* и *p14ARF* в других процессах, в том числе и в качестве онкосупрессоров. Отсюда следует, что даже если их эпигенетическая инактивация не играет существенной роли в нарушении *RB*-зависимого пути регуляции клеточного цикла в клетках с метилированными аллелями гена *RB1*, она может повлиять на канцерогенез через другие механизмы, приводящие к малигнизации клеток.

В настоящем исследовании метилирования гена *RB1* не было обнаружено ни в одном из обследованных случаев, в то время как метилирование генов *p14ARF* и *p15INK4B* в различных комбинациях встретилось в 29 образцах (72,5%), что в целом соответствует результатам аналогичных исследований статуса метилирования этих генов при эпидермальном раке и лимфоме (табл. 2). Возможно, что эпигенетическая инактивация *RB*-зависимого пути регуляции клеточного цикла при раке молочной железы, а также при других типах рака, реализуется не через метилирование самого гена *RB1*, а через инактивацию генов, кодирующих ингибиторы циклин-зависимых киназ. В таком случае даже при нормальной экспрессионной активности гена *RB1* белок *RB* будет активно фосфорилироваться комплексом циклина *D* и циклин-зависимых киназ, ингибиторы которых находятся в неактивном состоянии. В конечном итоге такое состояние обусловит возможность прохождения клеткой серии непрерывных клеточных делений.



Взаимодействие основных генов, участвующих в регуляции клеточного цикла по *RB* и *p53*-зависимым путям

### Заключение

Сравнительный анализ статуса метилирования генов RB1, p14ARF и p15INK4B в образцах опухолевой ДНК от пациенток с раком молочных желез демонстрирует высокую частоту аномального метилирования генов p14ARF и p15INK4B при нормальном эпигенетическом статусе гена RB1. Анализ литературных данных, доступных в отношении других форм рака, свидетельствует о том, что по крайней мере при лимфомах и при эпидермальном раке преимущественно наблюдается аналогичная ситуация. Не исключено, что такая комбинация эпигенотипов исследованных генов, с одной стороны, может объясняться более высокой частотой метилирования генов ингибиторов циклин-зависимых киназ, по сравнению с геном RB1, с другой – может указывать на существование особых эпигенетических механизмов дизрегуляции клеточного цикла и поддержания стабильности генома при канцерогенезе, которые запускаются уже на уровне ингибиторов циклин-зависимых киназ.

Работа выполнена в рамках интегративного проекта СО РАМН «Мо-

лекулярно-генетические механизмы формирования и прогрессии рака молочной железы: разработка критериев риска, прогноза клинического течения и чувствительности к химиотерапии на основании информативных маркеров опухоли и организма».

### Литература

1. Аномальное метилирование некоторых генов-супрессоров при спорадическом раке молочной железы / Землякова В.В. [и др.] // Молекулярная биология. – 2003. – Т. 37. – С. 696-703.
2. Заболеваемость злокачественными новообразованиями в регионе Сибири и Дальнего Востока. Состояние онкологической службы и пути ее улучшения. / Е.Л. Чойзонзов [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2004. – № 2. – С. 41-47.
3. Aberrant methylation of p16INK4a and deletion of p15INK4b are frequent events in human esophageal cancer in Linxian, China / E.P. Xing [et al.] // Carcinogenesis. – 1999. – Vol. 20. – P. 77-84.
4. Analysis of genetic and epigenetic processes that influence p14ARF expression in breast cancer. / J. Silva [et al.] // Oncogene. – 2001. – Vol. 20. – P. 4586-4590.
5. CpG island methylation STATus and mutation analysis of the RB1 gene essential promoter region and protein-binding pocket domain in nervous system tumour / P. Gonzalez-Gomez [et al.] // Brit. J. Cancer. – 2003. – Vol. 88. – P. 109-114.
6. Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways / K. Murao [et al.] // Brit. J. Dermatology. – 2006. – Vol. 155. – P. 999-1005.

7. Epigenetic silencing of multiple genes in primary CNS lymphoma. / C.C. Linda [et al.] // Int. J. Cancer. – 2006. – Vol. 119. – P. 2487-2491.

8. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15. / J.G. Hennen [et al.] // Cancer Res. – 1996. – Vol. 56. – P. 722-727.

9. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational STATus / M. Esteller [et al.] // Cancer Res. – 2000. – Vol. 60. – P. 129-133.

10. Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island / D. J. Simpson [et al.] // Cancer Res. – 2000. – Vol. 60. – P. 1211-1216.

11. Methylation framework of cell cycle inhibitors in cirrhosis and associated hepatocellular carcinoma / M. Roncalli [et al.] // Hepatology. – 2002. – Vol. 36. – P. 427-432.

12. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation of CpG islands / J.G. Herman [et al.] // PNAS. – 1996. – Vol. 93. – P. 9821-9826.

13. p14ARF silencing by promoter hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2 / M. Esteller [et al.] // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61. – P. 2816-2821.

14. Prognostic significance of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in patients with diffuse large B-cell lymphomas / K. Amara [et al.] // Ann Oncol. – 2008. – Vol. 19. – P. 1774-86.

15. Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum / S.M. Dong [et al.] // Mod. Pathology. – 2005. – Vol. 18. – P. 170-178.

16. Promoter hypermethylation profile of cell cycle regulator genes in pituitary adenomas / A. Yoshino [et al.] // J. Neurooncol. – 2007. – Vol. 83. – P. 153-62.

17. Promoter Hypermethylation of the RB1 Gene in Glioblastomas / M. Nakamura [et al.] // Laboratory Investigation. – 2001. – Vol. 81. – P. 77-82.

А.Р. Фарахтдинова, С.А. Федорова, Т.И. Николаева, П.М. Иванов, М.А. Бермишева, Т. Дюерк, Э.К. Хуснутдинова

## АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ BRCA1, CHEK2, NBS1 У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ИЗ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК 616-092; 575.224

Проведен скрининг у больных раком молочной железы (РМЖ) (n=60) и контрольной группы (n=120) из Республики Саха (Якутия) на наличие мутаций 5382insC, 4153delA, C61G гена BRCA1, мутаций IVS2+1G>A, CHEK2dele9,10 (5kb), 1100delC гена CHEK2 и 657del5 гена NBN. Данные мутации в изученной выборке не обнаружены.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, мутации, популяция.

We carried out screening of patients with breast cancer (n=60) and healthy population controls (n=120) of Republic Sakha (Yakutia) on presence of mutations 5382insC, 4153delA, C61G in BRCA1 gene, mutations IVS2+1 G>A, CHEK2dele9,10 (5kb), 1100delC in CHEK2 gene and 657del5 in NBN gene. These mutations have not been found in the cohort.

**Keywords:** breast cancer, mutations, population.

### Введение

В последние годы в России отмечается тенденция к росту заболеваемости

**ФАРАХТДИНОВА Альбина Рауфовна** – аспирант Института биохимии и генетики УНЦ РАН, e-mail: albina\_far\_81@mail.ru; **ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна** – д.б.н., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН, sardaanafedorova@mail.ru; **НИКОЛАЕВА Татьяна Ивановна** – к.м.н., н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, ysc@sakha.ru; **ИВАНОВ Петр Михайлович** – д.м.н., проф., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; **БЕРМИШЕВА Марина Алексеевна** – к.б.н., с.н.с. ИБГ УНЦ РАН, e-mail: marina\_berm@mail.ru; **ДЮЕРК Тило** – Ганноверская медицинская школа, г. Ганновер, Германия; **ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна** – д.б.н., проф., зав. отделом геномики ИБГ УНЦ РАН, ekkh@anrb.ru.

раком молочной железы (РМЖ). Риск возникновения заболевания в течение жизни оценивается в среднем у женщин 11%. Изучение распространения генетических маркеров предрасположенности к РМЖ в популяциях России дает необходимую информацию для скрининговых исследований, ранней диагностики и профилактики данной патологии.

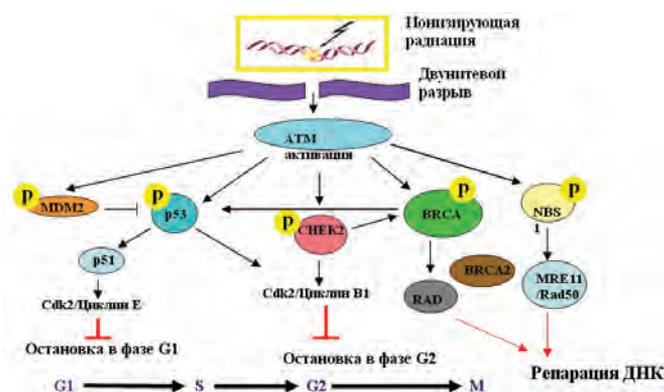
Рак молочной железы в Республике Саха (Якутия) в структуре онкологической заболеваемости (19,2%) и смертности (12,8%) занимает лидирующие позиции. Стандартизованные показатели заболеваемости и смертности в 1,4 и 1,5 раза ниже российского уровня и составляют 28,5±1,2 и 11,7±1,5

на 100000 населения соответственно. Средний возраст заболевших РМЖ составил 56 лет [4].

На сегодняшний день установлено, что мутации в генах BRCA1, BRCA2, CHEK2 и NBS1 приводят к развитию РМЖ. Продукты этих генов участвуют в процессах репарации ДНК, регуляции клеточного цикла, дифференцировки клеток, апоптоза (рисунок).

Анализ структурных изменений в этих генах у женщин с отягощенным семейным анамнезом может способствовать ранней диагностике заболевания.

На сегодняшний день молекулярно-генетические исследования по изучению РМЖ в Республике Саха не про-



Сигнальные пути, вовлеченные в процесс репарации радиационно-индуцированных повреждений ДНК

водились. Исходя из того факта, что в генофонде данной этнической группы присутствует компонент, характерный для народов Восточной Европы [5], мы провели анализ мутаций, встречающихся в популяциях Европы.

#### Материалы и методы

Материалом нашего исследования явились образцы ДНК пациенток с РМЖ (n=60), находившихся на стационарном лечении в Якутском республиканском онкологическом диспансере. У исследуемой группы больных диагноз был верифицирован. Данные о каждой пациентке заносились в специально разработанную нами формализованную карту (ФК), на основании которой создана компьютерная база данных. Возраст пациенток колеблется от 27 до 77 лет. Выборки больных РМЖ и здоровых доноров по этнической принадлежности относятся к якутам. Средний возраст манифестации заболевания составил 43,5 года (от 27 до 77 лет). У 50% больных репродуктивная функция сохранена. Данные о наличии семейных случаев в анамнезе у больных РМЖ отсутствуют. Преобладающей гистологической формой является инфильтрирующая карцинома (28%) и аденокарцинома (12%). По клиническим стадиям на первом месте II стадия -64%, на втором - III стадия -12%. Наличие метастаз в лимфоузлах обнаружено в 50% случаев. В качестве контрольной группы использовались образцы ДНК здоровых доноров (n=120), без онкологического диагноза.

ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Определение мутаций проводили методами аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР), ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).

#### Результаты и обсуждение

Существенная роль в развитии рака молочной железы отводится генам BRCA1, CHEK2, NBN, вовлеченным в процесс репарации радиационно-индуцированных повреждений ДНК. Наличие мутаций в этих генах может привести

к ошибкам репарации ДНК и, соответственно, к возникновению опухоли.

Мутации в генах BRCA1 характеризуются высокой пенетрантностью. Риск возникновения РМЖ у носителей данных мутаций достигает 50-90% в течение жизни [14, 17]. В разных регионах и этнических группах спектр и частота мутаций гена BRCA1 варьирует. Мутации 5382insC и 6174delT гена BRCA1 были обнаружены в большинстве семей с РМЖ или яичников у евреев ашкенази [17, 18]. Мутация 5382insC широко распространена в странах Центральной и Восточной Европы [2, 3]. Например, в выборке больных РМЖ из Республики Башкортостан она встречается с частотой не более 4% [1]. Мутация С61G гена BRCA1 обнаружена в Польше, Литве, Белоруссии и Латвии [17]. В азиатских популяциях были обнаружены мутации в гене BRCA1 у сингапурцев (8,6% n=70), китайцев (3,8% n=130), японцев (0,8% n=1000) [16, 20]. Спектр мутаций в гене BRCA1 в азиатских популяциях отличается. У корейцев встречаются мутации L63X, 2509delAA гена BRCA1 [16, 12]. У китайцев в гене BRCA1 обнаружены мутации 2372delTG, 1082delG, 1100delAT [16, 20]. В Таиланде и Малайзии обнаружена мутация 3300delA BRCA1 [20]. Для большинства носителей мутаций гена BRCA1 отмечается ранний возраст манифестации заболевания (до 40 лет).

Мутации 5382insC, 4153delA, С61G в гене BRCA1, характерные для европейских популяций, в выборке больных РМЖ и контрольной группе якутов не обнаружены.

CHEK2 (cell-cycle checkpoint kinase) является ключевым медиатором, участвующим в процессах репарации ДНК или апоптоза. Предполагают, что герминальные мутации CHEK2 ассоциированы с раком молочной железы. В частности, мутация 1100delC была

определена как низкопенетрантный аллель РМЖ [10]. Гетерозиготные носители данной мутации имеют повышенный риск развития (в 2-3 раза) онкологического заболевания. Мутация CHEK2 1100delC присутствует у 0.2-1.5% жителей Европы и Северной Америки [22]. В популяциях Азии (у корейцев (n=493), сингапурцев (n=94), и китайцев (n=74)) мутация 1100delC гена CHEK2 не обнаружена [6, 12]. Мутации IVS2+1G>A и CHEK2dele9,10 (5kb) выявлены у поляков, белорусов, чехов и немцев [10, 22]. На сегодняшний день значимость данных полиморфных вариантов гена CHEK2 в развитии РМЖ в азиатских популяциях не выяснена. В выборке больных РМЖ из Китая обнаружена миссенс мутация 1111C>T (His371Tyr) [12].

Мы провели скрининг мутаций IVS2+1G>A, CHEK2dele9,10 (5kb), 1100delC в гене CHEK2, у больных РМЖ из Республики Саха (Якутия) и в контрольной группе. Данные мутации не были обнаружены в изученной выборке.

Ген NBN (NBS1, Nijmegen Breakage syndrome) участвует в процессах сохранения хромосомной стабильности, включая чувствительность к двухцепочечным разрывам ДНК, регуляции клеточного цикла [11]. Зародышевые мутации в гене NBN в гомозиготном состоянии приводят к возникновению синдрома Ниймегена, который является аутосомно-рецессивным заболеванием, характеризующийся микроцефалией, замедленным ростом, иммунной недостаточностью, и предрасположенностью к раку [7]. «Founder» мутация 657del5 гена NBN встречается в популяциях России и Восточной Европы [7, 8].

В исследуемой нами выборке больных РМЖ и контрольной группе мутация 657del5 гена NBN не обнаружена.

Тот факт, что мутации, характерные для европейских популяций, не обнаружены у больных РМЖ из Республики Саха (Якутия), можно объяснить несколькими причинами: во-первых, исследуемые мутации могут быть не характерны для популяции якутов, во-вторых, наша выборка представляет собой небольшое количество больных РМЖ (n=60), в-третьих, отсутствуют исследования в группах больных РМЖ сотягощенным семейным анамнезом. Полученные результаты соответствуют данным о выраженности восточно-евразийского компонента и низком содержании западноевразийских линий мтДНК и Y-хромосомы в генофонде якутов (10%) [5].

### Заключение

Таким образом, мутации, характерные для народов Восточной Европы, не выявлены у больных якутского этнического происхождения. Необходимо проведение дальнейшего поиска мутаций, специфичных для якутов, с целью разработки подходов ДНК-диагностики и профилактики рака молочной железы в Республике Саха.

Работа проводилась при поддержке гранта РГНФ 08-06-00033а.

### Литература

1. Бермишева М.А. Частота выявления мутации 5382insC гена BRCA1 / М.А. Бермишева, Г.Ф. Зиннатуллина, Э.К. Хуснутдинова // Вопросы онкологии. - 2008. - Т. 54, №1. - С. 31-34.
2. Карпухин А.В. Наследственная предрасположенность к раку молочной железы / А.В. Карпухин [и др.] // Медицинская генетика. - 2002. - Т. 6, №6. - С. 254-259.
3. Мандельштам М.Ю. Молекулярно-генетический анализ моногенных форм атеросклероза и рака молочной железы у жителей Санкт - Петербурга: автореф. дисс. д-ра биол. наук / М.Ю. Мандельштам. - СПб. - 2005.
4. Николаева Т.И. Рак молочной железы в условиях крайнего севера. Анализ эффективности онкологической помощи: автореф. дисс. канд. мед. наук / Т.И. Николаева. - Томск, 2007.
5. Федорова С.А. Этногеномика коренных народов республики Саха (Якутия): автореф. дисс. д-ра биол. наук / Федорова С.А. - М., 2008.
6. Ann S., Lee G. CHEK2\*1100delC Screening of Asian Women With a Family History of Breast Cancer Is Unwarranted / S. Ann, G. Lee // Supported by the Sing Health Cluster Research Grant. - 2001 P. 313-318.
7. Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer / Bogdanova N. [et al.] // Int. J. Cancer, 2008. P. 802-806.
8. Buslov K. NBS1 657del5 mutation may contribute only to a limited fraction of breast cancer cases in Russia / K. Buslov, A. Iyevleva, E. Chekmariova // Int. J. Cancer, 2004. P. 585-589
9. Chen W. Breast Cancer Low-Penetrance Allele 1100delC in the CHEK2 Gene: Not Present in the Chinese Familial Breast Cancer Population / W. Chen, S. Yurong, N. Liansheng // Journal of Clinical Oncology, Vol 26. - 2008: P. 419-422.
10. A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased proSTATe cancer risk / Cybulski C. [et al.] // Cancer Res, 2004. P. 677-679.
11. Digweed M. Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks / M. Digweed, K. Sperling // DNA Repair, 2004. P.1207-1214.
12. The CHEK2 1100delC mutation is not present in Korean patients with breast cancer cases tested for BRCA1 and BRCA2 mutation / H. Doo [et al.] // Breast Cancer Res Treat, 2008. P. 569-573.
13. Gatti R. Ataxia-telangiectasia. In: Vogelstein B, Kinzler KW (eds) The genetic basis of human cancer / R. Gatti // McGraw-Hill, New York, 2002. P. - 239-266.
14. Grzybowska E. High frequency of recurrent mutations in the BRCA1 and BRCA2 in Polish families with breast and ovarian cancer / Grzybowska E. [et al.] // Hum. Mutat, 2000. V.16. P. 482-490.
15. Khoo U. Recurrent BRCA1 and BRCA2 germline mutations in ovarian cancer: a founder mutation of BRCA1 identified in the Chinese population / U. Khoo [et al.] // Hum Mutat, 2002. P. 307-308.
16. Liede A. Hereditary Breast and Ovarian Cancer in Asia. Genetic Epidemiology of BRCA1 and BRCA2 / A. Liede, A. Narod // Hum. Mutat, 2002. P. 413-424.
17. Mitchell G. Mammographic density and breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers / G. Mitchell [et al.] // Cancer Res. - 2006. - Vol. 66. - P. - 1866-1872.
18. Pohlreich P. High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area / Pohlreich P. [et al.] // Breast Cancer Research. - 2005. V.7, № 5. P. 728-736.
19. Song C. The prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in eastern Chinese women with breast cancer / C. Song [et al.] // Cancer Res Clin Oncol. - 2006. P. 617-626.
20. Tang N. Prevalence of breast cancer predisposition gene mutations in Chinese women and guidelines for genetic testing / N. Tang [et al.] // Clin Chim Acta. - 2001. P.179-185.
21. Van der Looij M. Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary / M. Van der Looij [et al.] // Int. J. Cancer, 2000. V.86. P. 737-740.
22. Walsh T. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in families at high risk of breast cancer / T. Walsh [et al.] // JAMA. - 2006. - Vol. - 295. P. - 1379-1388.

Ю.Ю. Федорова, А.С. Карунас, О.А. Гра, Н.Н. Рамазанова, Л.Л. Гурьева, Э.И. Эткина, И.В. Голденкова-Павлова, Э.К. Хуснутдинова

## АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ У ТАТАР

УДК: 577.21

С помощью аллель-специфичной гибридизации на биочипе определены частоты генотипов и аллелей полиморфных локусов генов биотрансформации ксенобиотиков (*CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2*) у больных бронхиальной астмой и здоровых индивидов татарской этнической принадлежности. Выявлены маркеры повышенного риска развития астмы – аллели *NAT2\*481T*, *MTHFR\*677C* и генотип *NAT2\*481T/T*.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, полиморфный вариант, ассоциация, биологические микрочипы, гены системы биотрансформации.

Using allele-specific hybridization on the biochip the frequencies of xenobiotic-metabolizing gene polymorphisms (*CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2*) in patients with bronchial asthma and controls of Tatar ethnicity have been determined. It has been shown that *NAT2\*481T/T* genotype and *NAT2\*481T*, *MTHFR\*677C* alleles are markers of asthma risk.

**Keywords:** bronchial asthma, polymorphism, association, oligonucleotide biochips, xenobiotic-metabolizing genes.

Собранные за последние 20 лет данные свидетельствуют о существ-

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН: **ФЕДОРОВА Юлия Юрьевна** – аспирант; e-mail: fedorova-y@yandex.ru, **КАРУНАС Александра Станиславовна** – к.м.н., с.н.с., **ХУСНУТДИНОВА Эльза Камильевна** – д.б.н., проф., зав. отделом молекулярной генетики человека. Кафедра детских болезней Башкирского гос. мед. ун-та: **РАМАЗАНОВА Наиля Назыфовна** – к.м.н., ассистент, **ГУРЬЕВА Лариса Львовна** – к.м.н., доцент, **ЭТКИНА Эсфирь Исааковна** – д.м.н., проф., зав. кафедрой, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН: **ГРА Ольга Алексеевна** – к.б.н., н.с., **ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА Ирина Васильевна** – д.б.н., зав. группой биохимической генетики.

вовании взаимосвязи между генетическими вариациями в геноме и возникновением различных заболеваний [5]. Существуют гены, полиморфизм в которых коррелирует с рядом патологий, а также с вариабельностью в отношении метаболизма целого спектра лекарственных препаратов, потенциальных канцерогенов и ксенобиотиков. К таким генам относятся гены системы биотрансформации, определяющие индивидуальную чувствительность организма к факторам внешней среды. На сегодняшний день доказано, что полиморфные варианты генов детоксикации ксенобиотиков обуславливают наследственную предрасположенность к множеству многофакторных

заболеваний, в том числе и к аллергическим [9, 11, 16]. Бронхиальная астма (БА) принадлежит к числу наиболее распространенных хронических воспалительных заболеваний. В мире среди взрослого населения БА встречается с частотой 1-18% и почти вдвое чаще регистрируется у детей [2]. В настоящей работе нами проведено исследование 13 полиморфных локусов в восьми генах биотрансформации ксенобиотиков: *CYP1A1* (4887C>A, 4889A>G, 6235T>C), *CYP2D6* (1934G>A), *GSTT1* (делеция), *GSTM1* (делеция), *MTHFR* (677C>T), *CYP2C9* (430C>T, 1075C>T), *CYP2C19* (681G>A) и *NAT2* (481C>T, 590G>A, 857G>A) у больных БА и здоровых индивидов татарской этничес-

кой принадлежности, проживающих в Республике Башкортостан.

#### Материалы и методы

В работе использованы образцы ДНК 96 пациентов с бронхиальной астмой, средний возраст 24 года. Диагноз заболевания устанавливался на основании данных клинического и лабораторного обследования, кожных аллергологических проб, спирографии. В качестве контроля исследована группа здоровых индивидов без каких-либо признаков аллергических заболеваний, состоящая из 99 чел., средний возраст 20 лет. Все обследуемые лица татарской этнической принадлежности и являются жителями Республики Башкортостан.

ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции по стандартной методике [10]. Необходимые для анализа фрагменты ДНК получали с помощью двухэтапной мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Типы исследованных полиморфных вариантов и последовательности праймеров опубликованы ранее [3]. Для гибридизации на биочипе использовали флуоресцентно меченые образцы, полученные на второй стадии мультиплексной ПЦР. Микрочипы были разработаны и изготовлены в лаборатории биологических микрочипов Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. После проведения гибридизации флуоресцентный сигнал от ячеек микрочипа регистрировали с помощью портативного анализатора биочипов, снабженного камерой ПЗС и программным обеспечением Imageware («Биочип-ИМБ», Москва) [3].

При попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля применялся критерий  $\chi^2$  для таблицы сопряженности  $2 \times 2$  с поправкой Йейтса на непрерывность (<http://www.biometrika.tomsk.ru/>). Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . В случае наличия достоверных отличий в исследуемых выборках проводилась оценка показателя отношения шансов (odds ratio, OR) по формуле  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  и  $b$  – число больных с наличием или отсутствием данного генотипа (аллеля) соответственно, а  $c$  и  $d$  – число здоровых лиц с наличием или отсутствием данного генотипа (аллеля).

#### Результаты и обсуждение

Проведенная нами оценка распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов *CYP1A1*

(4887C>A, 4889A>G, 6235T>C), *CYP2D6* (1934G>A), *GSTT1* (делеция), *GSTT1* (делеция), *CYP2C9* (430C>T, 1075C>T), *CYP2C19* (681G>A) и *NAT2* (590G>A, 857G>A) не выявила статистически значимых различий между сравниваемыми группами больных бронхиальной астмой и контроля ( $P > 0,05$ ). Установлена ассоциация бронхиальной астмы с полиморфными вариантами генов *NAT2* (481C>T) и *MTHFR* (677C>T) у индивидов татарской этнической принадлежности ( $p < 0,05$ ).

Ариламин-N-ацетилтрансфераза-2 (*NAT2*) принимает участие в метаболизме различных ксенобиотиков, к которым относятся многие используемые лекарственные препараты и экзогенные химические вещества. В ряде работ показано, что при ацетилировании происходит инактивация аминов, в том числе и гистамина, который является медиатором аллергического воспаления. Избыток гистамина приводит к аккумуляции в тканях его ацетилированных форм, которые образуют физиологический резерв для последующих процессов деацетилирования [16]. В состав кодирующего района гена *NAT2* входит участок длиной 701 п.н., в котором у разных индивидов выявлены 16 точечных мутаций, в том числе, 12 транзиций, три трансверсии и одна делеция, приводящая к сдвигу рамки считывания. В настоящее время на основе сопоставления генетических и биохимических данных выделяют аллели, определяющие фенотип медленного ацетилирования – *NAT2\*5* (481C>T), *NAT2\*6* (590G>A), *NAT2\*7* (857G>A) и аллель «дикого типа» – *NAT2\*4*, не содержащий вышеперечисленных замен [1, 4].

Проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов по трем полиморфным локусам 481C>T, 590G>A и 857G>A гена *NAT2* у больных БА татарской этнической принадлежности и в соответствующей группе здоровых индивидов. Выявлен ряд особенностей в распределении частот аллелей гена *NAT2* в контрольной выборке татар по сравнению с популяциями Европы и Азии. Так, частота аллеля *NAT2\*481T* в популяциях Западной Европы составляет 38-43%, у жителей европейской части России – 36-43% [4, 12], тогда как в популяциях Азии (Китай, Киргизия) частота аллеля *NAT2\*481T* ниже (6-19%) [12]. У татар значение частоты аллеля *NAT2\*481T*, составляющее 29,29%, является промежуточным и вписывается в тенденцию снижения частоты встречаемости аллеля с Запада на Восток. Анализ распределения частот аллелей и генотипов по-

лиморфного варианта 857G>A гена *NAT2* в различных популяциях мира выявил обратную тенденцию – увеличение частоты встречаемости аллеля *NAT2\*857A* с Запада на Восток. У европейцев частота аллеля *NAT2\*857A* составила 2-3%, в популяциях Азии – 11-16%, а в выборке татар – 7,07% [8, 16]. По данным литературы, в распределении частот аллелей полиморфного варианта 590G>A гена *NAT2* не обнаружено существенных межэтнических различий. Для населения Европы характерна частота встречаемости аллеля *NAT2\*590A* – 26-27%, у жителей Азии – 23-30%, а в контрольной группе татар – 27,27% [4, 8, 12].

Последующий анализ полиморфного варианта 481C>T гена *NAT2* выявил статистически значимые различия между выборкой больных БА и контрольной группой (табл. 1). В группе больных обнаружено достоверное увеличение частоты гомозиготного генотипа *NAT2\*481T/T* (20,00%) и аллеля *NAT2\*481T* (38,95%) по сравнению с контролем (7,07 и 29,29% соответственно). Показатель соотношения шансов для носителей генотипа *NAT2\*481T/T* составил 3,29 (95%CI 1,31-8,23), для носителей аллеля *NAT2\*481T* – 1,54 (95%CI 1,01-2,35). Аллель *NAT2\*481C*, соответственно, является маркером пониженного риска развития БА (OR=0,65, 95%CI 0,43-0,99) (табл. 1).

Полученные данные согласуются с результатами других исследований. Так, в работах Zielinska E. с соавт. было

Таблица 1

Распределение частот генотипов и аллелей 481C>T полиморфного варианта гена *NAT2* у больных БА и здоровых индивидов

Генотип/ аллель	Группа больных БА (N=95)	Контрольная группа (N=99)
*C/*C	n (p)	40 (42,11)
	P	0,37
	OR (95%CI)	-
*C/*T	n (p)	36 (37,89)
	P	0,35
	OR (95%CI)	-
*T/*T	n (p)	19 (20,00)
	P	0,008
	OR (95%CI)	3,29 (1,31-8,23)
*C	n (p)	116 (61,05)
	P	0,045
	OR (95%CI)	0,65 (0,43-0,99)
*T	n (p)	74 (38,95)
	P	0,045
	OR (95%CI)	1,54 (1,01-2,35)

Таблица 2

Распределение частот генотипов и аллелей 677C>T полиморфного варианта гена *MTHFR* у больных БА и здоровых индивидов

Генотип/аллель		Группа больных БА (N=96)	Контрольная группа (N=99)
*C/*C	n (p)	63 (65,63)	51 (51,52)
	P	0,05	-
	OR (95%CI)	-	-
*C/*T	n (p)	29 (30,21)	39 (39,39)
	P	0,18	-
	OR (95%CI)	-	-
*T/*T	n (p)	4 (4,17)	9 (9,09)
	P	0,17	-
	OR (95%CI)	-	-
*C	n (p)	155 (80,73)	141 (71,21)
	P	0,03	-
	OR (95%CI)	1,69 (1,06-2,72)	-
*T	n (p)	37 (19,27)	57 (28,79)
	P	0,03	-
	OR (95%CI)	0,59 (0,37-0,95)	-

Примечание к табл. 1, 2: N – объем выборки; n – численность групп; p – частота аллеля (генотипа); OR (odds ratio) – отношение шансов; P – значение достоверности; 95%CI (confidence interval) – 95% доверительный интервал, рассчитанный при статистически значимых различиях между сравниваемыми выборками.

показано, что медленные ацетиляторы преобладают в группе пациентов с аллергией, проживающих на территории центральной Польши, по сравнению с контролем (91 и 62% соответственно) [16]. Достоверное увеличение частот генотипов, определяющих фенотип медленного ацетилирования среди больных с аллергическим заболеванием из Польши, было отмечено и в работах Gawronska-Sklarz B. с соавт. [6]. Описана ассоциация между медленным ацетилированием, обусловленным сочетанием генотипов гена *NAT2*, и чувствительностью к астме у больных из Турции [11].

Метилентетрагидрофолат-редуктаза (*MTHFR*) обеспечивает превращение 5, 10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат, который является главной циркулирующей в организме формой фолиевой кислоты. В свою очередь, фолиевая кислота участвует во многих биохимических путях, включая метилирование гомоцистеина и синтез нуклеотидов. Полиморфный вариант 677C>T гена *MTHFR* приводит к аминокислотной замене Ala222Val в каталитическом домене *MTHFR*, что ведет к синтезу фермента со сниженной активностью. В ряде работ показано, что дефицит фолата ассоциирован с различными патологиями, связанными

с активацией клеточного иммунного ответа (Th1 иммунный ответ), которые могут приводить к развитию болезни Альцгеймера, ревматоидного артрита, сердечно-сосудистых заболеваний [7, 9].

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного варианта *MTHFR* (677C>T) у больных бронхиальной астмой и в контрольной группе представлено в табл.2. В контрольной группе частота аллеля *MTHFR*\*677T составила 28,79%, что входит в диапазон частот аллелей, характерных для популяций Европы (23-41%) и Азии (Китая) (23-45%) [13, 15]. Самая высокая частота аллеля *MTHFR*\*677T выявлена у латиноамериканцев – 50%, самая низкая – у афроамериканцев (11%) [14]. В исследованной нами группе больных бронхиальной астмой отмечено достоверное увеличение частоты аллеля *MTHFR*\*677C (80,73%) по сравнению с контролем (71,21%, OR=1,69, 95%CI 1,06-2,72), тогда как аллель *MTHFR*\*677T с более высокой частотой определен у здоровых индивидов – в 28,79% случаев по сравнению с 19,27% у больных (OR=0,59, 95%CI 0,37-0,95).

Следует отметить, что в исследованиях Husemoen L. с соавт. обнаружена ассоциация между маркерами фолатного метаболизма и развитием атопии. Авторы предположили, что одной из причин развития аллергической реакции у носителей генотипа *MTHFR*\*677T/T может быть изменение Th1/Th2 иммунного ответа. Возможно, дефицит фолата способен вызывать Th1/Th2 дисбаланс, что приводит к увеличению продукции цитокинов Th2-типа, и, в дальнейшем, к развитию аллергического воспаления. Дополнительно, развитие атопии может также обуславливаться направленным эффектом повышенного уровня гомоцистеина, который обладает выраженным токсическим действием на клетки [9]. Наблюдаемые противоречия с нашими данными можно объяснить популяционными различиями (этнические и географические вариации в распределении частот аллелей данного локуса). Кроме того, существует множество факторов, влияющих на уровень гомоцистеина в организме: поступление фолиевой кислоты и витаминов группы B с пищей, существование других генов, вовлеченных в метаболизм фолата [14].

На основании результатов проведенного исследования полиморфных локусов генов системы биотрансформации ксенобиотиков (*CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTT1*, *MTHFR*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2*) можно

заключить, что аллельные варианты генов ариламин-N-ацетилтрансферазы-2 и метилентетрагидрофолат-редуктазы вносят вклад в развитие бронхиальной астмы у татар. Маркерами повышенного риска развития БА являются генотип *NAT2*\*481T/T, аллели *NAT2*\*481T, *MTHFR*\*677C, маркерами пониженного риска – аллели *NAT2*\*481C и *MTHFR*\*677T.

## Литература

1. Голденкова-Павлова И.В., Брускин С.А., Абдеев Р.М. и др. Сравнительный анализ результатов фенотипирования и генотипирования по полиморфизму N-ацетилирования у человека // Генетика. – 2006. – Т.42. – С.1-8.
2. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / Под ред. А. Г. Чучалина. – М.: «Атмосфера», 2007.
3. Глотов А.С., Наседкина Т.В., Иващенко Т.Э. и др. Создание биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации // Молекулярная биология. – 2005. – Т.39 (3). – С.403-412.
4. Кожембаева Ж.М., Гра О.А., Фадеев В.С. и др. Ассоциация полиморфизма *NAT2* с риском развития псориаза в Московской популяции // Молекулярная биология. – 2009. – Т.43 (1). – С.1-15.
5. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Макарова С.И. и др. Экогенетический аспект полифакторных заболеваний // Вестник ВОГиС. – 2006. – Т.10 (3). – С. 514-519.
6. Gawronska-Szklarz B., Pawlik A., Czaja-Bulsa G. et al. Genotype of N-acetyltransferase 2 (*NAT2*) polymorphism in children with immunoglobulin E-mediated food allergy // Clin Pharmacol Ther. – 2001. – V.69 (5). – P.372-378.
7. Granell R., Heron J., Lewis S. et al. The association between mother and child *MTHFR* C677T polymorphisms, dietary folate intake and childhood atopy in a population-based, longitudinal birth cohort // Clin. Exp. Allergy. – 2008. – V.38 (2). – P.320-328.
8. Hamdy S.I., Hiratsuka M., Narahara K. et al. Genotype and allele frequencies of TPMT, *NAT2*, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2003. – V.55 (6). – P.560-569.
9. Husemoen L.L., Toft U., Fenger M. et al. The association between atopy and factors influencing folate metabolism: is low folate *STAT5* causally related to the development of atopy? // Int. J. Epidemiol. – 2006. – V.35 (4). – P.954-961.
10. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // Methods in molecular biology / Ed. Walker J.M. N.Y.; Human press. – 1984. – V.2 – P.31-34.
11. Nacak M., Aynacioglu A.S., Filiz A. et al. Association between the N-acetylation genetic polymorphism and bronchial asthma // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2002 – V.54 (6). – P.671-674.
12. Rabstein S., Unfried K., Ranft U. et al. Variation of the N-acetyltransferase 2 gene in a Romanian and a Kyrgyz population // Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev. – 2006. – V.15 (1). – P.138-141.
13. Skibola C.F., Smith M.T., Kane E. et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1999. – V.96 (22). – P.12810-12815.
14. Trabetti E. Homocysteine, *MTHFR* gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk // J. Appl. Genet. – 2008. – V.49 (3). – P.267-282.
15. Yu J., Chen B., Zhang G. et al. The 677 C->T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene in five Chinese ethnic groups // Hum. Hered. – 2000. – V.50 (4). – P.268-270.
16. Zielinska E., Niewiarowski W., Bodalski J. et al. Arylamine N-acetyltransferase (*NAT2*) gene mutations in children with allergic diseases // Clin. Pharmacol. Ther. – 1997. – V.62. – P. 635-642.

Р.И. Хусаинова, Л.И. Селезнева, Э.А. Фазлыева, Р.З. Нурлыгаянов,  
Д.Д. Надыршина, О.М. Лесняк, Э.К. Хуснутдинова

## РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ЭСТРОГЕНА- $\alpha$ (*ESR1*) В РАЗВИТИИ ПОСТМЕНОПАУЗАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗА В ВОЛГО-УРАЛЬСКОМ РЕГИОНЕ РОССИИ

УДК 575.1:599.9

Проведено изучение с.454-397T>C, с.454-351A>G и (TA)n полиморфных локусов гена *ESR1* у женщин постменопаузального возраста татарской и русской этнической принадлежности из Волго-Уральского региона и поиск ассоциаций полиморфных вариантов гена *ESR1* с риском развития переломов, уровнем эстрадиола и минеральной плотности костной ткани. Обнаружена ассоциация генотипа *ESR1*\*G\*A полиморфизма с.454-351A>G с пониженным риском развития переломов (OR=0,61; 95%CI 0,46-0,95), а аллеля *ESR1*\*G – с повышенным риском развития остеопороза (OR=1,57; 95%CI 1,06-2,3) у женщин русской этнической принадлежности. Выявлена ассоциация генотипа *ESR1*\*A\*A и гаплотипа *ESR1*\*T\*A гена *ESR1* с повышенным уровнем эстрадиола у женщин татарской этнической принадлежности.

**Ключевые слова:** остеопороз, рецептор эстрогенов, полиморфные локусы, эстрадиол

The analysis of с.454-397T>C, с.454-351A>G и (TA)n polymorphic loci of *ESR1* gene in postmenopausal women Tatars and Russians origin from Volga-Ural region and association of the allelic variants and their combination with the risk of fracture development and BMD, estradiol level has been conducted. The association of *ESR1*\*G\*A genotype of с.454-351A>G polymorphic locus with the low risk of osteoporotic fractures has been discovered (OR=0,61; 95%CI 0,46-0,95), and allele *ESR1*\*G – with the high risk of osteoporotic fractures (OR=1,57; 95%CI 1,06-2,3) in Russians women. The associations of *ESR1*\*A\*A genotype and *ESR1*\*T\*A haplotype of *ESR1* gene with high level of estradiol has been shown in Tatars women.

**Keywords:** osteoporosis, estrogen receptor, polymorphic loci, estradiol.

Эстрогены играют важную роль в метаболизме костной ткани. Об этом свидетельствует значительное ускорение потери костной массы после наступления менопаузы и эффективность заместительной гормональной терапии в профилактике и лечении остеопороза [15, 18]. Считается, что эстрогены оказывают прямое и опосредованное действие на скелет [21]. Эстрогены ингибируют дифференцировку и пролиферацию остеокластов (ОК), а также активируют синтез кальцитонина, который оказывает ингибирующее действие на ОК [20]. Действие эстрогенов опосредовано через их связывание со специфическими рецепторами, обнаруженными на остеобластах, остеокластах и остеоцитах [14, 15]. Описано два типа рецепторов эстрогенов – *ERA* и *ERB*, действие эстрогенов на костную ткань опосредовано главным образом через *ERA* рецепторы и ген *ESR1* является одним из важнейших генов-кандидатов остеопороза (ОП). Ген *ESR1* расположен на хромосоме 6q25, содержит 8 экзонов и 7 интронов. В этом гене

обнаружено три полиморфных локуса: с.454-397T>C (*PvuII*, rs2234693) и с.454-351A>G (*XbaI*, rs9340799), расположенные в первом интроне, и (TA)n повторы (rs3138774) в промоторе гена *ESR1*. Ряд исследователей отмечают ассоциацию полиморфных вариантов гена *ESR1* с развитием остеопороза и уровнем МПКТ [4, 6, 11], тогда как другие не обнаруживают значимых ассоциаций [2, 7].

**Целью** данного исследования являлись: изучение с.454-397T>C, с.454-351A>G и (TA)n полиморфных локусов гена *ESR1* у женщин постменопаузального возраста татарской и русской этнической принадлежности из Волго-Уральского региона и поиск ассоциаций полиморфных вариантов гена *ESR1* с риском развития переломов, уровнем эстрадиола и минеральной плотности костной ткани в различных отделах скелета.

### Материалы и методы исследования

В качестве материала исследования использованы образцы ДНК 477 женщин в возрасте от 48 до 77 лет, проживающих на территории Республики Башкортостан и Свердловской области (с информированного согласия на участие в исследовании). По этнической принадлежности и наличия переломов общая выборка разделена на русских – 372 женщины (175 с переломами, 197 без переломов) и татар – 105 (42 с переломами и 63 без переломов). В группы с переломами вошли женщины с наличием низкотравматичных переломов, произошедших в постменопаузе. Критериями исключения были сопутствующие заболевания и

состояния, которые могут привести к потере костной массы.

Оценка МПКТ шейки бедра и поясничного отдела позвоночника проводилась методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA) на аппарате QDR 4500A («Hologic», США). Показатели МПКТ шейки бедра измерены у 185 женщин, МПКТ поясничного отдела позвоночника – у 203 женщин. Для диагностики ОП были использованы критерии ВОЗ (WHO, 1994), согласно которым к нормальным значениям МПКТ относятся показатели выше -1SD от референтной базы данных по Т-критерию, значения от -1SD до -2,5SD классифицируются как остеопения, отклонение ниже -2,5SD – остеопороз.

В группе из 168 женщин было проведено определение уровня эстрадиола в сыворотке крови иммунохемилюминесцентным методом на анализаторе Immulite 2000 («DPC», США).

ДНК выделяли из цельной крови методом фенольно-хлороформной экстракции [13]. Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом ПЦР с последующей рестрикцией и электрофорезом в 7% ПААГ, согласно ранее описанным протоколам [10].

**Статистическая обработка полученных результатов.** Математическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ статистического анализа «SPSS v.13» [SPSS Inc., Chicago, Illinois]. Взаимосвязь между количественными признаками оценивали с помощью метода корреляционного анализа Спирмена. Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя соотношения шансов

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, E-mail 021gen@mail.ru: ХУСАИНОВА Рита Игоревна – к.б.н., с.н.с., СЕЛЕЗНЕВА Лиана Ильдусовна – к.м.н., м.н.с., НАДЫРШИНА Дина Даяновна – аспирант, ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна – д.б.н., проф., зав. Отделом геномики; ФАЗЛЫЕВА Эльза Ахметовна – к.м.н., зав. женской консультацией №5, НУРЛЫГАЯНОВ Радик Зуфарович – к.м.н., врач-травматолог гор. больницы №21, ЛЕСНЯК Ольга Михайловна – д.м.н., зав. кафедрой Уральской медицинской академии, г. Екатеринбург.

(Odds Ratio, OR). Для оценки неравновесия по сцеплению применяли программу LDA, определение частот гаплотипов и тестирование различий в распределении частот гаплотипов в исследуемых группах проводили с помощью программы CHAPLIN [Epstein and Satten, 2003].

### Результаты и обсуждение

В результате изучения с.454-397T>C полиморфного локуса гена *ESR1* не обнаружено статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов между группами с переломами и без переломов, как у женщин русской, так и татарской этнической принадлежности. У русских преобладающими в обеих группах были аллель *ESR1\*Т* (56% у женщин с переломами и 52,1% в контроле) и генотип *ESR1\*Т\*С* (45,7 и 50,3%, соответственно). В группе с переломами частота гомозиготного генотипа *ESR1\*Т\*Т* была выше и составила 33,1% по сравнению с 26,9% в группе без переломов, однако различия статистически не значимы ( $\chi^2=1,73$ ;  $p=0,421$ ;  $df=2$ ). В группе женщин с переломами татарской этнической принадлежности частота аллеля *ESR1\*Т* составила 60,7%, у женщин без переломов – 55,5%, различия в распределении частот аллелей в исследуемых группах статистически не достоверны ( $\chi^2=0,36$ ;  $p=0,55$ ;  $df=1$ ). Частота генотипа *ESR1\*Т\*Т* у больных с переломами была выше по сравнению с контролем (42,8% и 33,4%, соответственно), генотипа *ESR1\*Т\*С* – ниже (35,7% и 44,4%, соответственно), различия в распределении частот генотипов статистически не значимы ( $\chi^2=1,09$ ;  $p=0,58$ ;  $df=2$ ).

Мы провели анализ с.454-397T>C полиморфного варианта гена *ESR1* в выборках женщин с нормальными показателями МПКТ, с остеопенией и остеопорозом. Частота аллеля *ESR1\*С* в группе женщин с ОП составила 52%, в группе с остеопенией – 46%, у женщин с нормальными показателями МПКТ – 45%. У больных ОП частота генотипа *ESR\*С\*С* была наибольшей и составила 26,9%, в группе с остеопенией – 20,2%, у здоровых – 18,3%, однако различия в распределении частот аллелей и генотипов с.454-397T>C полиморфизма в исследуемых выборках не были статистически значимыми. В среднем самые высокие значения МПКТ шейки бедра и поясничных позвонков отмечались у женщин с генотипом *ESR1\*Т\*Т*, однако различия не достигали статистически достоверных значений.

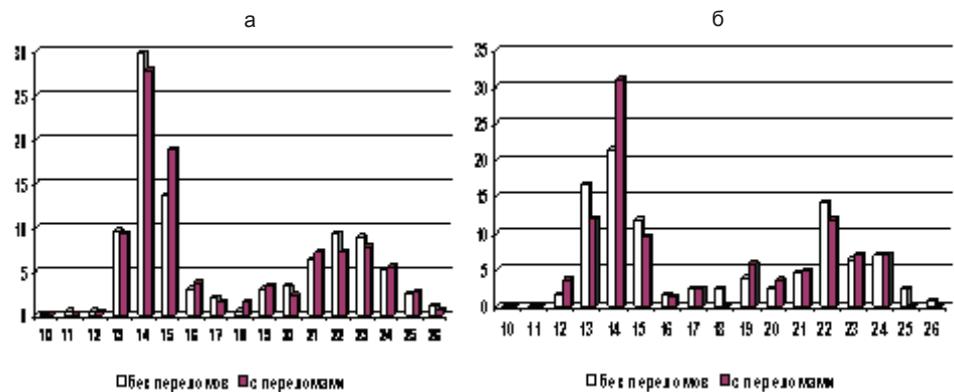


Рис. 1. Распределение частот аллелей ( $(TA)_n$ ) полиморфизма гена *ESR1* у женщин русской (а) и татарской (б) этнической принадлежности

Таким образом, в результате проведенных исследований не выявлена ассоциация с.454-397T>C полиморфного локуса гена *ESR1* с переломами и уровнем МПКТ у женщин постменопаузального возраста из Волга-Уральского региона.

В результате исследования с.454-351A>G полиморфного локуса гена *ESR1* не выявлено статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов между группами женщин с переломами и без переломов татарской этнической принадлежности. У женщин без переломов русской этнической принадлежности выявлена достоверно высокая частота гетерозиготного генотипа *ESR1\*А\*G* (50,25%) по сравнению с группой с переломами (38,29%;  $\chi^2=4,89$ ;  $p=0,027$ ;  $df=1$ ), что позволяет рассматривать его в качестве маркера пониженного риска развития переломов (OR=0,61; 95%CI 0,46-0,95). Частота гомозиготного генотипа *ESR1\*А\*А* была выше в группе с переломами (43,52%) по сравнению с контролем (34,52%), отличия не достигли статистической значимости ( $p=0,09$ ).

Частота аллеля *ESR1\*G* в объединенной выборке здоровых и женщин с остеопенией составила 36,7%, в группе с ОП – 47,7% ( $\chi^2=5,68$ ;  $p=0,022$ ;  $df=1$ ). Таким образом, аллель *ESR1\*G* ассоциирован с развитием ОП у женщин русской этнической принадлежности (OR=1,57; 95%CI 1,06-2,3), что согласуется с исследованием, проведенным в Болгарии, где генотип *ESR1\*G\*G* также ассоциирован с повышенным риском развития ОП у женщин постменопаузального возраста [17]. Генотип *ESR1\*G\*G* чаще встречался у больных ОП по сравнению с женщинами с остеопенией и здоровыми (22,47; 12,12 и 11,67%, соответственно), однако различия не были статистически значимыми. У женщин с генотипом *ESR1\*G\*G*

в среднем отмечаются более низкие показатели МПКТ шейки бедра и поясничных позвонков по сравнению с носителями генотипа *ESR1\*А\*А*.

Таким образом, в результате изучения с.454-351A>G полиморфизма гена *ESR1* обнаружена ассоциация генотипа *ESR1\*А\*G* с пониженным риском развития переломов и аллеля *ESR1\*G* с повышенным риском развития ОП у женщин русской этнической принадлежности.

Существуют противоречивые литературные данные об ассоциации локусов с.454-397T>C и с.454-351A>G гена *ESR1* с риском развития переломов в различных популяциях. Так, не было выявлено ассоциации данных полиморфизмов с переломами у женщин из Дании [1] и Бельгии [12, 16], тогда как согласно многоцентровому исследованию, проведенному с участием ряда европейских стран, генотип *ESR\*G\*G* ассоциирован с пониженным риском развития переломов у женщин постменопаузального возраста [8]. В данном исследовании не было выявлено связи с.454-397T>C полиморфного локуса гена *ESR1* с переломами, что согласуется с полученными нами данными. Связь полиморфных локусов гена *ESR1* с уровнем МПКТ была исследована во многих популяциях, однако результаты весьма противоречивы. Так, не выявлена ассоциация с.454-397T>C, с.454-351A>G полиморфных вариантов с уровнем МПКТ у женщин из Испании [2], Италии [10], Дании [1], Бельгии [16]. Обнаружено, что локус с.454-397T>C ассоциирован с уровнем МПКТ у афро-американцев и китайцев [11]. Связь с.454-397T>C полиморфизма с показателями МПКТ у азиатских женщин была обнаружена в одних исследованиях [4, 6] и не выявлена в других [7].

Мы провели поиск ассоциаций ( $(TA)_n$ ) полиморфного локуса гена *ESR1* у жен-

щин с переломами и без переломов русской и татарской этнической принадлежности. В изученных нами группах обнаружено 17 вариантов аллелей, соответствующих числу ТА-повторов от 10 до 26 копий. Распределение частот аллелей (ТА)*n* полиморфизма в исследуемых выборках бимодальное, с пиками частот аллелей, соответствующих числу ТА-повторов 14 и 22-23, что согласуется с данными других исследователей [3, 10].

Сравнительный анализ не выявил статистически значимых различий в распределении частот аллелей (ТА)*n* полиморфного локуса у женщин с переломами и без переломов русской этнической принадлежности ( $X^2=11,17$ ;  $p=0,87$ ;  $df=16$ ). Частота аллеля *ESR1\*14* была максимальной и составила 29,95% в группе без переломов и 27,91% у женщин с переломами. В группе с переломами отмечается повышение частот аллеля *ESR1\*15* (18,9%) по сравнению с контролем (13,7%), а также снижение частот аллелей *ESR1\*22* (7,3%) и *ESR1\*23* (7,8%) по сравнению с группой без переломов (9,4% и 8,9%, соответственно).

Наиболее частым у женщин татарской этнической принадлежности также был аллель *ESR1\*14*, который встречался с частотой 30,95% у лиц с переломами и 21,43% у женщин без переломов. Различия в распределении частот аллелей в выборках с переломами и без переломов женщин татарской этнической принадлежности не были статистически значимы ( $X^2=9,33$ ;  $p=0,81$ ;  $df=14$ ).

При изучении (ТА)*n* полиморфизма гена *ESR1* в исследуемых выборках выявлено 90 генотипов. Учитывая, что (ТА)*n* локус гена *ESR1* является высокополиморфным, а также бимодальное распределение частот аллелей, мы сгруппировали аллели в две группы: с числом повторов  $\geq 18$  (группа Н) и менее 18 повторов (группа L). По литературным данным, существуют противоречивые данные об ассоциации (ТА)*n* полиморфизма с переломами: с повышенным риском переломов ассоциированы аллели с низким числом ТА-повторов у женщин из Голландии [3], Италии [10] и аллели с числом ТА-повторов более 20 у женщин из Китая [19]. Согласно многоцентровому европейскому исследованию, не было выявлено

ассоциации (ТА)*n* полиморфизма гена *ESR1* с риском развития переломов [8].

Частота генотипа *ESR1\*L\*L* была несколько снижена у больных ОП (30,7%) по сравнению с группами с остеопенией и здоровыми (39,2 и 36,7% соответственно), однако различия в распределении частот генотипов в исследуемых группах не были статистически значимы. У женщин с гетерозиготным генотипом *ESR1\*H\*L* отмечаются в среднем более низкие показатели МПКТ шейки бедра и поясничных позвонков, различия статистически не значимы после поправки на возраст и ИМТ.

Таким образом, нами не выявлена ассоциация (ТА)*n* полиморфизма гена *ESR1* с риском развития переломов и уровнем МПКТ у женщин из Волго-Уральского региона.

Мы рассчитали показатель неравновесия по сцеплению *s.454-397T>C*, *s.454-351A>G* и (ТА)*n* полиморфных локусов гена *ESR1*, который составил 0,66-0,82. Учитывая существование неравновесия по сцеплению, мы провели гаплотипический анализ в исследуемых группах. Оказалось, что аллели *ESR1\*T* и *ESR1\*A*, тесно сцепленные друг с другом, сцеплены также с аллелями (ТА)*n* полиморфизма с низким числом ТА-повторов, а аллели *ESR1\*C* и *ESR1\*G* – с аллелями с высоким числом ТА-повторов. Так, частота гаплотипа *ESR1\*T\*A\*L* составила 48,23% у русских женщин и 48,03% у женщин татарской этнической принадлежности, гаплотипа *ESR1\*C\*G\*H* – 27,7% и 28,8%, соответственно. Отмечалось некоторое снижение частоты гаплотипов *ESR1\*C\*G\*L* (4,7%) и *ESR1\*C\*A\*H* (10,9%) у женщин с переломами по сравнению с контрольной группой (8,1% и 6,3%, соответственно), различия не были статистически значимыми.

Мы провели поиск ассоциаций гаплотипов *ESR1\*T\*A\*L* и *ESR1\*C\*G\*H* с уровнем МПКТ. Выявлено, что у лиц, гомозиготных по гаплотипу *ESR1\*T\*A\*L* в среднем отмечаются более высокие показатели МПКТ во всех точках измерения, однако различия статистически не значимы. Ассоциация аллелей с низким числом ТА-повторов (ТА)*n* полиморфизма с низкими показателями МПКТ была показана у женщин из Италии [10], Голландии [3], Дании [1], у женщин из Китая была выявлена противоположная ассоциация [19]. Согласно другим исследованиям, полиморфный локус (ТА)*n* не ассоциирован с МПКТ [5, 8].

Таким образом, не обнаружено связи (ТА)*n* полиморфных вариантов и гаплотипов гена *ESR1* с риском развития переломов и уровнем МПКТ у женщин из Волго-Уральского региона.

В результате анализа ассоциации полиморфных вариантов *s.454-397T>C*, *s.454-351A>G* и (ТА)*n* гена *ESR1* с уровнем эстрадиола обнаружили, что у женщин татарской этнической принадлежности с генотипом *ESR1\*A\*A* уровень эстрадиола был выше по сравнению с носителями генотипов *ESR1\*A\*G* ( $p=0,046$ ) и *ESR1\*G\*G* ( $p=0,011$ ). Также выявлено повышение уровня эстрадиола у женщин, гомозиготных по гаплотипу *s.454-397T/C*, *s.454-351A* по сравнению с носителями гаплотипа в гетерозиготном состоянии и с его отсутствием ( $p=0,035$ ). У женщин русской этнической принадлежности не обнаружено ассоциации уровня эстрадиола с полиморфными вариантами *s.454-397T>C*, *s.454-351A>G* и (ТА)*n* гена *ESR1*. Согласно литературным данным, гаплотип *s.454-397T/C*, *s.454-351A* гена *ESR1* ассоциирован с низким уровнем эстрадиола у женщин постменопаузального возраста из Голландии [9]. У женщин из Чехии не было обнаружено ассоциации *s.454-397T>C*

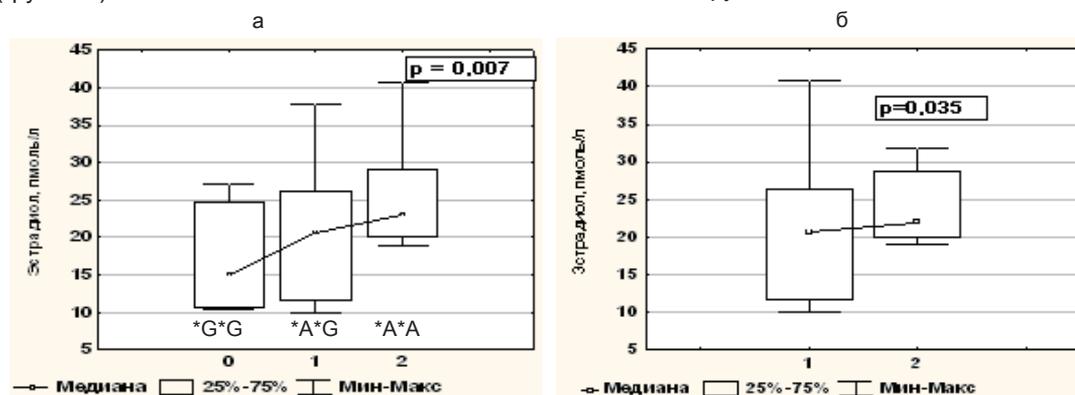


Рис. 2. Сравнительный анализ уровня эстрадиола у женщин татарской этнической принадлежности: а – с различными генотипами локуса *s.454-351A>G* гена *ESR1*, б – с 0, 1 копиями (группа 1) и 2 копиями (группа 2) гаплотипа *ESR1\*T\*A* гена *ESR*

и с.454-351A>G полиморфных локусов гена *ESR1* с уровнем эстрадиола [23].

Таким образом, изучение с.454-397T>C, с.454-351A>G и (TA)<sub>n</sub> полиморфных локусов гена *ESR1* выявило ассоциацию генотипа *ESR1*\*G\*A с пониженным риском развития переломов (OR=0,61; 95%CI 0,46-0,95), а аллеля *ESR1*\*G – с повышенным риском развития остеопороза (OR=1,57; 95%CI 1,06-2,3) у женщин русской этнической принадлежности. Генотип *ESR1*\*A\*A и гаплотип *ESR1*\*T\*A гена *ESR1* оказались ассоциированы с повышенным уровнем эстрадиола у женщин татарской этнической принадлежности. Не обнаружено связи с.454-397T>C и (TA)<sub>n</sub> полиморфных вариантов и гаплотипов гена *ESR1* с риском развития переломов и уровнем МПКТ у женщин из Волго-Уральского региона.

#### Литература

1. A sequence variation: 713-8delC in the transforming growth factor-beta 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women / B.L. Langdahl [et al.] // *Bone*. – 1997. – Vol. 20, № 3. – P. 289-294.
2. Association between bone mineral density and polymorphisms of the VDR, ERalpha, COL1A1 and CTR genes in Spanish postmenopausal women / E. Bandres [et al.] // *J. Endocrinol. Invest.* – 2005. – Vol. 28, № 4. – P. 312-321.
3. Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk / J.B. van Meurs [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2003. – Vol. 12, № 14. – P. 1745-1754.
4. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density in Chinese women: a meta-analysis / C.L. Wang [et al.] // *Osteoporos. Int.* – 2007. – Vol. 18, № 3. – P. 295-305.
5. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with postmenopausal bone loss, bone mass, and quantitative ultrasound properties of bone / O.M. Albagha [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2005. – Vol. 42, № 3. – P. 240 – 246.
6. Association of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal Korean women / H.S. Nam [et al.] // *J. Bone. Miner. Metab.* – 2005. – Vol. 23, № 1. – P. 84-89.
7. Association of vitamin D receptor and estrogen receptor-alpha gene polymorphism with peak bone mass and bone size in Chinese women / Y.J. Qin [et al.] // *Acta. Pharmacol. Sin.* – 2004. – Vol. 25, № 4. – P. 462-468.
8. Differential genetic effects of *ESR1* gene polymorphisms on osteoporosis outcomes / J.P. Ioannidis [et al.] // *JAMA* – 2004. – Vol. 292, № 17. – P. 2105-2114.
9. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with estradiol levels in postmenopausal women / S.C. Schuit [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2005. – Vol. 153, № 2. – P. 327-334.
10. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women / L. Becherini [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2000. – Vol. 9, № 13. – P. 2043-2050.
11. Greendale, G.A. Endogenous sex steroids and bone mineral density in older women and men: the Rancho Bernardo Study / G.A. Greendale, S. Edelstein, E. Barrett-Connor // *J. Bone. Miner. Res.* – 1997. – Vol. 12, № 11. – P. 1833-1843.
12. Influence of the vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic women / C. Vandevyver [et al.] // *J. Bone. Miner. Res.* – 1997. – Vol. 12, № 2. – P. 241-247.
13. Mathew, C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA / C.C. Mathew // *Methods in molecular biology*. – Ed. Walker J.M. N.Y.; Haman press, 1984. – P. 31-34.
14. Monroe, D.G. Overview of estrogen action in osteoblasts: role of the ligand, the receptor, and the co-regulators / D.G. Monroe, F.J. Secreto, T.C. Spelsberg // *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* – 2003. – Vol. 3, № 4. – P. 357-362;
15. Pacifici, R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis – the second decade / R. Pacifici // *Endocrinology.* – 1998. – Vol. 139, № 6. – P. 2659-2661.
16. Polymorphisms of the VDR, ER and COL1A1 genes and osteoporotic hip fracture in elderly postmenopausal women / J. Aerssens [et al.] // *Osteoporos. Int.* – 2000. – Vol. 11, № 7. – P. 583-591
17. *PvuII* and *XbaI* polymorphisms of the estrogen receptor gene and bone mineral density in a Bulgarian population sample / J.T. Ivanova, P.B. Doukova, M.A. Boyanov, P.R. Popivanov // *Hormones (Athens).* – 2007. – Vol. 6, № 1. – P. 36-43.
18. Raisz, L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects / L.G. Raisz // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115, № 12. – P. 3318-3325.
19. Relation of the estrogen receptor alpha gene microsatellite polymorphism to bone mineral density and the susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Chinese women in Taiwan / H.Y. Chen [et al.] // *Maturitas.* – 2001. – Vol. 40, № 2. – P. 143-150.
20. Teitelbaum, S.L. Bone resorption by osteoclasts / S.L. Teitelbaum // *Science.* – 2000. – Vol. 1, № 289(5484). – P. 1504-1508.
21. Turner, R.T. Skeletal effects of estrogen / R.T. Turner, B.L. Riggs, T.C. Spelsberg // *Endocr. Rev.* – 1994. – Vol. 15, № 3. – P. 275-300.
22. Weitzmann, M.N. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale / M.N. Weitzmann, R. Pacifici // *J. Clin. Invest.* – 2006. – Vol. 116, № 5. – P. 1186-1194.
23. Zofkova, I. The estrogen receptor alpha gene determines serum androstenedione levels in postmenopausal women / I. Zofkova, K. Zajickova, M. Hill // *Steroids.* – 2002. – Vol. 67, № 10. – P. 815-819.

Л.В. Григорьева, Т.Р. Насибуллин, В.В. Паук, А.Н. Романова, С.А. Федорова, О.Е. Мустафина, А.Н. Ноговицына, Э.К. Хуснутдинова

## АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ С ИНФАРКТОМ МИОКАРДА ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В ПОПУЛЯЦИИ ЯКУТОВ

УДК 575.174:599.9

**Цель исследования.** Анализ наследственной предрасположенности к развитию инфаркта миокарда в популяции якутов по полиморфизму генов-кандидатов.

**Материалы и методы.** Методом полимеразной цепной реакции и анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов были исследованы полиморфные маркеры генов – кандидатов сердечно-сосудистых заболеваний (*APOE 2059C/T* и *2197C/T*, *APOB 34622C/T* и *41064A/G*, *LPL 22125T/G*, *CETP 20200A/G*, *NOS3 VNTR*, *PON1 16341G/A*, *ACE I/D*, *AT1R 1166A/C*) в группе мужчин, перенесших крупноочаговый инфаркт миокарда (n=102) и у здоровых лиц (n=152).

ЯНЦ комплексных мед. проблем СО РАМН: ГРИГОРЬЕВА Лена Валерьевна – к.м.н., зав. лаб., lenagrigor@rambler.ru, РОМАНОВА Анна Николаевна – к.м.н., зав. лаб., ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна – д.б.н., зав. лаб., НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна – к.м.н., зав. лаб.; Институт биохимии ЯНЦ РАН: НАСИБУЛЛИН Тимур Русланович – к.м.н., с.н.с., ПАУК Вера Викторовна – к.б.н., н.с., МУСТАФИНА Ольга Евгеньевна – д.б.н., проф., зав. лаб., ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна – д.б.н., проф., руковод. Отдела.

**Результаты исследования.** На основе анализа ассоциаций установлено, что в популяции якутов полиморфизмы генов *APOB*, *AT1R*, *APOE*, *NOS3* ассоциированы с риском развития инфаркта миокарда. Относительный риск заболевания повышен у носителей генотипов *APOB*\*X+/\*X+, *APOB*\*X+/\*X-, *AT1R*\*A/\*C и понижен у носителей генотипов *APOB*\*X-/\*X-, *APOE*\*3/\*3, *NOS3*\*4B/\*4B.

**Ключевые слова.** Полиморфизм, гены-кандидаты, инфаркт миокарда.

**The purpose of research.** Studying polymorphisms of some candidate genes of the cardiovascular diseases in Yakut with myocardial infarction.

**Summary:** We genotyped by the polymerase chain reaction (PCR) and RFLP – restriction fragment length polymorphism 254 male for the following polymorphisms: *2059C/T* and *2197C/T* of *APOE* gene, *34622C/T* and *41064A/G* of *APOB* gene, *22125T/G* of *LPL* gene, *20200A/G* of *CETP* gene, *VNTR* of *NOS3* gene, *16341G/A* of *PON1* gene, *I/D* of *ACE* gene, *1166A/C* of *AT1R* gene. The *41064A/G* of *APOB*, *1166A/C* of *AT1R*, *2059C/T* and *2197C/T* of *APOE*, *VNTR* of *NOS3*, *I/D* of *ACE* were associated with myocardial infarction in Yakut.

**Keywords:** polymorphism, candidate genes, myocardial infarction.

### Введение

В последнее десятилетие активно проводится изучение этиологии и патогенеза мультифакторной патологии различных органов и систем организма. В основе возникновения мультифакторных (комплексных, полигенных) заболеваний (МФЗ) лежат сложные взаимодействия генетических и средовых факторов. Идентификация генов, детерминирующих МФЗ, является одной из сложных и важных задач современной генетики [1]. Одним из подходов к изучению наследственной предрасположенности к МФЗ является метод анализа ассоциаций полиморфных маркеров генов-кандидатов с риском заболевания в различных этнических группах [2-6].

Метод анализа ассоциаций, или неравновесия по сцеплению, основан на том, что частота совместной встречи двух аллелей разных локусов в популяции отличается от ожидаемой при их случайной независимой встрече. Если у большинства больных в популяции мутантный аллель имеет общее происхождение, окружающие маркеры находятся с ним в неравновесии по сцеплению. Для локализации гена, контролирующего болезнь, надо найти такой маркер, один из аллелей которого преобладает у больных. Предполагается, что у больных из разных семей этот маркер не только имеет одинаковую локализацию в геноме, но и содержит один и тот же аллель. Поэтому при анализе ассоциаций не надо исследовать родословные, материалом для этого анализа могут служить независимые группы больных и здоровых людей. Тем не менее предположение об общности мутации у большинства больных означает наличие общего предка, существовавшего много поколений назад. За время, необходимое для распространения болезни в популяции, произошло много рекомбинационных событий, и неравновесие по сцеплению могло сохраниться только между мутацией и аллелем тесно сцепленного маркера. Идеальными маркерами для анализа неравновесия по сцеплению являются SNP-маркеры, характеризующиеся полиморфизмом единичных нуклеотидов [7].

Для снижения генетической гетерогенности при анализе ассоциаций обычно исследуют отдельные формы болезни.

Кроме того, при анализе ассоциаций весьма перспективен подход в изучении изолированных популяций [8]. В изолированных популяциях проявляется эффект основателя, в результате которого снижается генетическая

полиморфность. Популяцию якутов можно охарактеризовать как относительно изолированную. В сравнении с другими тюркоязычными этносами, показанным на основе исследований митохондриальной ДНК и Y-хромосомы выявлен самый низкий показатель генетического разнообразия [9,10].

**Целью** данного исследования являлся анализ наследственной предрасположенности к развитию инфаркта миокарда (ИМ) в популяции якутов по полиморфизму генов-кандидатов.

### Материалы и методы исследования

В исследование включено 254 мужчин, якутов по этнической принадлежности, неродственных между собой. Выборка разделена на две группы. В первую группу включены больные с перенесенным крупноочаговым инфарктом миокарда (102 чел.) в возрасте от 30 до 62 лет (средний возраст на момент обследования составил  $50.8 \pm 0.62$  года). У пациентов обязательно должно было быть на электрокардиограмме наличие патологического зубца Q, на эхокардиографии – наличие зоны нарушения локальной сократимости миокарда. Пациенты не имели в анамнезе указаний на сахарный диабет. Во второй (контрольной) группе использовалась выборка мужчин до 60 лет без признаков ССЗ и сахарного диабета (152 чел., средний возраст на момент обследования  $48.0 \pm 0.8$  года).

Исследование одобрено локальным комитетом по биомедицинской этике при ЯНЦ КМП СО РАМН. Всеми обследуемыми даны письменные согласия на проведение биомедицинских исследований в рамках данной работы.

В настоящем исследовании мы провели анализ наследственной предрасположенности к развитию ИМ в популяции якутов по полиморфизму следующих генов-кандидатов: гена апополипротеина E (2059C/T и 2197C/T), апополипротеина B (34622C/T и 41064A/G), липопротеинлипазы (22125T/G), белка переносчика эфиров холестерина (20200A/G), эндотелиальной синтазы окиси азота (VNTR в интроне 4), параоксоназы 1 (16341G/A), ангиотензин-превращающего фермента (I/D в интроне 16), сосудистого рецептора ангиотензина II 1 типа (1166A/C).

Образцы ДНК получены из цельной венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции [11]. Амплификацию проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на аппаратах «Терцик» (Россия) и «PCR Sprint» (США). Реакционная смесь объемом 15 мкл, содержала 1.5 мкл буфера

(670 мМ трис-HCl, pH=8.6, 166 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.01% Три-тон X-100), смесь dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP по 200 мМ каждого), 10-30 нг геномной ДНК, Taq-полимеразу и соответствующие праймеры с определенной концентрацией в зависимости от амплифицируемого маркера. Разделение фрагментов ДНК после амплификации и рестрикции проводили при помощи электрофореза в полиакриламидном или агарозном гелях.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программ «STATistica for Windows 5.0» (STATSoft), программного обеспечения MS Excel XP (Microsoft) и компьютерных программ «GENEPOP» и «RxC» (Rows x Columns). Для проверки соответствия эмпирического распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга использовали модифицированный критерий  $\chi^2(P)$ , определяемый с помощью программы RxC по алгоритму, описанному D. Roff и P. Bentzen [12]. Этот алгоритм позволяет оценить статистическую значимость отклонений от ожидаемого частотного распределения в случае, когда число наблюдений по значимому числу классов меньше 5, и применение стандартного критерия  $\chi^2$  неправомерно.

Доверительные интервалы частот аллелей и генотипов рассчитывали на основе точной формулы с использованием F-распределения. При попарном сравнении частот генотипов и аллелей в группах больных и здоровых лиц использовался двусторонний критерий Фишера P (F<sub>2</sub>), а также критерий  $\chi^2(P)$  для таблиц сопряженности 2x2 с поправкой Йейтса на непрерывность. Достоверными считали различия частот аллелей и генотипов у больных и здоровых при значении P<0.05 (при необходимости проводили коррекцию на число сравнений).

Относительный риск заболевания по конкретному аллелю или генотипу вычисляли как соотношения шансов (odds ratio – OR) [13] по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где a – частота аллеля (генотипа) в выборке больных, b – частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке; c – сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных; d – сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке. В случае если один из показателей равен 0, принимается поправка на непрерывность – 0,5. При OR=1 – ассоциации нет, OR>1 – положительная ассоциация заболевания с аллелем и генотипом и OR<1 – отрицательная ассоциация.

### Результаты и обсуждение

Эмпирическое распределение частот генотипов, изученных полиморфных маркеров в популяции якутов соответствует равновесному теоретически ожидаемому распределению Харди-Вайнберга ( $P > 0.05$ ), кроме полиморфизма *41064A/G* гена *APOB*. При изучении полиморфизма *41064A/G* гена *APOB* показано отклонение от теоретически ожидаемого равновесного распределения Харди-Вайнберга; частота гетерозиготного генотипа *APOB*\*R1/\*R2 не превышала 5%, в связи с чем дальнейшее изучение данного полиморфизма не проводилось (таблица).

При сравнении больных ИМ с контролем по распределению частот генотипов полиморфных маркеров *2059C/T* и *2197C/T* гена *APOE* обнаружены различия по частотам генотипа \*3/\*3. В контроле с большей частотой встречаются генотип \*3/\*3 ( $OR=0.55$ ,  $CIOR=0.32-0.95$ ) и аллель \*3 ( $OR=0.59$ ,  $CIOR=0.36-0.96$ ). Генотип \*3/\*3 и аллель \*3 в популяции якутов являются маркерами пониженного риска развития ИМ.

По возрасту возникновения первого инфаркта миокарда подгруппа больных, перенесших ИМ до 50 лет, не отличается по частотам генотипов и аллелей полиморфизма гена *APOE* от контрольной группы до 50 лет. Среди лиц, перенесших ИМ после 50 лет, достоверно реже встречается генотип \*3/\*3, чем в контроле ( $P=0.04$ ,  $OR=0.51$ ,  $CIOR=0.25-1.04$ ).

Анализ ассоциаций полиморфизма *34622C/T* гена *APOB* с ИМ показал, что в группе больных ИМ чаще встречаются генотипы \*X+/\*X- ( $OR=2.02$ ,  $CIOR=1.12-3.65$ ) и \*X+/\*X+ ( $OR=4.02$ ,  $CIOR=1.22-13.19$ ), реже генотип \*X-/\*X- ( $OR=0.38$ ,  $CIOR=0.22-0.66$ ). По частотам аллелей среди больных достоверно чаще встречается аллель \*X+ ( $OR=2.56$ ,  $CIOR=1.59-4.11$ ), реже аллель \*X- ( $OR=0.39$ ,  $CIOR=0.24-0.63$ ). Среди лиц перенесших инфаркт до 50 лет, чаще встречается генотип \*X+/\*X- ( $P=0.008$ ,  $OR=3.31$ ,  $CIOR=1.33-8.24$ ) и аллель \*X+ ( $P=0.01$ ,  $OR=2.45$ ,  $CIOR=1.2-4.99$ ). У лиц, перенесших ИМ после 50 лет, наблюдается повышение частоты генотипа \*X+/\*X+ ( $P=0.006$ ,  $OR=12.5$ ,  $CIOR=1.49-105.09$ ) и аллеля \*X+ ( $P=0.002$ ,  $OR=2.64$ ,  $CIOR=1.39-5.02$ ). Показано, что у лиц с повышенной массой тела и ожирением достоверно чаще встречается генотип \*X+/\*X- ( $P=0.02$ ,  $OR=4.07$ ,  $CIOR=1.02-21.38$ ) и аллель \*X+ ( $P=0.01$ ,  $OR=3.33$ ,  $CIOR=1.13-9.84$ ), реже генотип \*X-/\*X- ( $P=0.01$ ,  $OR=0.23$ ,  $CIOR=0.06-0.84$ ).

Результаты анализа ассоциаций

минисателлита в 4-м интроне гена *NOS3* с ИМ в популяции якутов показали различия на уровне выраженной тенденции ( $\chi^2=5.978$ ,  $P=0.055$ ). В группе больных чаще встречается генотип \*4B/\*4A и реже генотип \*4B/\*4B. Достоверно чаще среди больных встречается аллель \*4A ( $OR=2.35$ ,  $CIOR=1.11-4.99$ ), реже аллель \*4B ( $OR=0.46$ ,  $CIOR=0.22-0.96$ ). Среди перенесших ИМ до 50 лет наблюдается увеличение частоты генотипа \*4B/\*4A ( $P=0.02$ ,  $OR=3.41$ ,  $CIOR=1.19-9.77$ ), аллеля \*4A ( $P=0.02$ ,  $OR=1.55$ ,  $CIOR=0.49-4.95$ ) и понижение частоты генотипа \*4B/\*4B ( $OR=0.2$ ,  $CIOR=0.1-0.83$ ), аллеля \*4B ( $OR=0.32$ ,  $CIOR=0.12-0.88$ ).

Анализ ассоциаций I/D полиморфизма в интроне 16 гена *ACE* с ИМ в популяции якутов показал, что в группе контроля с большей частотой встречается генотип \*D/\*D ( $OR=0.54$ ,  $CIOR=0.28-1.13$ ), но различия имеют характер выраженной тенденции. При сравнении группы больных по возрасту возникновения первого ИМ выявлено, что среди больных, перенесших первый ИМ до 50 лет, чаще встречается генотип \*I/\*D по сравнению с контролем до 50 лет ( $P=0.022$ ,  $OR=2.21$ ,  $CIOR=1.08-4.52$ ) и подгруппой больных перенесших ИМ после 50 лет ( $P=0.037$ ,  $OR=2.21$ ,  $CIOR=1.0-4.88$ ).

Анализ ассоциации полиморфизма *1166A/C* гена *AT1R* с ИМ в популяции якутов показал достоверные отличия: среди больных ИМ чаще встречается генотип \*A/\*C ( $OR=2.45$ ,  $CIOR=1.15-5.22$ ) и аллель \*C ( $OR=2.21$ ,  $CIOR=1.11-4.4$ ). По возрасту начала ИМ, среди лиц перенесших ИМ до 50 лет чаще встречается генотип \*A/\*C ( $P=0.009$ ,  $OR=3.79$ ,  $CIOR=1.34-10.75$ ) и аллель \*C ( $P=0.012$ ,  $OR=3.4$ ,  $CIOR=1.25-9.26$ ), реже генотип \*A/\*A ( $P=0.009$ ,  $OR=0.26$ ,  $CIOR=0.09-0.74$ ) и аллель \*A ( $P=0.012$ ,  $OR=0.29$ ,  $CIOR=0.11-0.79$ ). При сравнении подгрупп больных по возрасту начала первого ИМ наблюдаются различия на уровне выраженной тенденции по генотипу \*A/\*C ( $P=0.089$ ,  $OR=2.33$ ,  $CIOR=0.81-6.27$ ). Данный генотип чаще встречается среди лиц перенесших ИМ до 50 лет, чем среди тех, кто перенес ИМ позже.

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных маркеров генов-кандидатов сердечно-сосудистых заболеваний в популяции якутов

Ген / полиморфизм	Генотипы / аллели	1 группа	2 группа	P
		мужчины с ИМ (N=102)	контроль (N=152)	
		p <sub>i</sub> (%)	p <sub>i</sub> (%)	
<i>APOE</i> <i>2059T/C</i> <i>2197C/T</i>	*2/*2	1.96	0.66	-
	*2/*3	13.73	9.21	-
	*2/*4	0.98	-	-
	*3/*3	63.73	76.32	0.042
	*3/*4	19.61	13.16	-
	*4/*4	-	0.66	-
	*2	9.31	5.26	-
*3	80.39	87.5	0.029	
*4	10.29	7.24	-	
<i>APOB</i> <i>34622C/T</i>	*X-/*X-	59.8	79.61	0.001
	*X+/*X-	30.39	17.76	0.022
	*X+/*X+	9.8	2.63	0.022
	*X-	75	88.49	0.0001
	*X+	25.0	11.51	0.0001
<i>LPL</i> <i>22125T/G</i>	*H-/*H-	3.92	6.58	-
	*H+/*H-	31.37	30.26	-
	*H+/*H+	64.71	63.16	-
	*H+	19.61	21.71	-
	*H-	80.39	78.29	-
<i>CETP</i> <i>20200G/A</i>	*I/*I	50	46.05	-
	*I/*V	48.04	51.32	-
	*V/*V	1.96	2.63	-
	*I	74.02	71.71	-
	*V	25.98	28.29	-
<i>NOS3</i> <i>VNTR</i>	*4B/*4B	83.33	91.45	-
	*4B/*4A	15.69	7.89	0.065
	*4B/*4C	-	0.66	-
	*4A/*4A	0.98	-	0.072
	*4A	8.82	3.95	0.022
*4B	91.18	95.72	0.035	
*4C	-	0.33	-	
<i>PON1</i> <i>16341A/G</i>	*Q/*Q	42.16	42.11	-
	*Q/*R	45.1	41.45	-
	*R/*R	12.75	16.45	-
	*Q	64.71	62.83	-
	*R	35.29	37.17	-
<i>ACE</i> <i>I/D</i>	*I/*I	32.35	33.55	-
	*I/*D	51.96	40.79	-
	*D/*D	15.69	25.66	0.063
	*I	58.33	53.95	-
	*D	41.67	46.05	-
<i>AT1R</i> <i>1166A/C</i>	*A/*A	80.39	90.79	-
	*A/*C	18.63	8.55	0.021
	*C/*C	0.98	0.66	-
	*A	89.71	95.07	-
	*C	10.29	4.93	0.021

Примечание: p<sub>i</sub> — частота встречаемости генотипа (аллеля); N — объем выборки.

Представлял интерес анализа всех возможных сочетаний генотипов полиморфных маркеров генов-кандидатов *CC3*, так или иначе задействованных в патогенезе заболевания.

Нами был проведен анализ всех возможных попарных сочетаний изученных нами полиморфных маркеров. Сравнительный анализ частот встречаемости полученных сочетаний в группе больных ИМ и группе здорового контроля в популяции якутов показал 17 статистически значимых сочетаний.

Из них маркируют повышенный риск развития ИМ 6 сочетаний: *ACE1/\*D* – *APOB\*X+/\*X-* (OR=3.14, CIOR=1.28-7.71); *ACE1/\*D* – *NOS3\*4B/\*4A* (OR=2.94, CIOR=1.05-8.22); *APOB\*X+/\*X-* – *AT1R\*A/\*C* (OR=6.38, CIOR=1.33-30.69); *APOB\*X+/\*X+* – *NOS3\*4B/\*4B* (OR=3.82, CIOR=0.99-14.74); *AT1R\*A/\*C* – *NOS3\*4B/\*4B* (OR=2.56, CIOR=1.14-5.72); *NOS3\*4B/\*4A* – *PON1\*Q/\*Q* (OR=3.82, CIOR=0.99-14.74).

Различные сочетания генотипов полиморфных вариантов генов могут иметь различные комбинации. В зависимости от различных вариантов сочетаний генотипов и степени их относительного риска, надо полагать, будет различным проявление заболевания или клинического фенотипа.

### Выводы

Таким образом, установлено, что с развитием инфаркта миокарда в популяции якутов ассоциированы полиморфные маркеры генов *APOE*, *APOB*, *NOS3*, *ACE*, *AT1R*. Относительный риск заболевания повышен у носителей ге-

нотипов *APOB\*X+/\*X+*, *APOB\*X+/\*X*, *AT1R\*A/\*C* и понижен у носителей генотипов *APOB\*X-/\*X-*, *APOE\*3/\*3*, *NOS3\*4B/\*4B*. Обнаружено, что полиморфные маркеры генов *NOS3*, *ACE* повышают риск развития инфаркта миокарда в возрасте до 50 лет.

### Литература

1. Large scale association analysis for identification of genes underlying premature coronary heart disease: cumulative perspective from analysis of 111 candidate genes / J. J. McCarthy [et al.] // J. Med. Genet. – 2004. – V. 41. – P. 334-341.
2. Полиморфизм гена аполипопротеина Е и риск развития инфаркта миокарда / О. Е. Мустафина [и др.] // Молекулярная биология. – 2002. – Т. 36. – №6. – С. 1-7.
3. Шахтштейнер Е. В. Связь полиморфизма гена аполипопротеина Е с факторами риска хронических неинфекционных заболеваний в популяциях г. Новосибирска и коренных жителей Горной Шории: автореф. дис. ... к-та мед. наук: 14.00.05, 03.00.15 / Е. В. Шахтштейнер; ГУ НИИ терапии СО РАМН. – Новосибирск. – 2004. – 23 с.
4. Янченко О. В. Особенности распространенности и связи с инфарктом миокарда факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний у мужчин коренной национальности Республики Хакасия: автореф. дис. ... к-та мед. наук: 14.00.06 / О. В. Янченко; ГУ НИИ терапии СО РАМН. – Новосибирск, 2005. – 18 с.

5. *ACE* and *AT1R* gene polymorphisms and hypertension in Indian population / T. F. Ashavaid [et al.] // J. Clin. Lab. Anal. – 2000. – V. 14. – P. 230-237.

6. Association of apolipoprotein genetic polymorphisms with plasma cholesterol in a Japanese rural population / M. Zaman [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 1997. – V. 17. – P. 3495-3504.

7. Аульченко Ю. С. Методологические подходы и стратегии картирования генов, контролирующих комплексные признаки человека / Ю. С. Аульченко, Т. И. Аксенович // Вестник ВОГиС. – 2006. – Том 10. – №1. – С. 189-202.

8. Mapping genes through the use of linkage disequilibrium generated by genetic drift: 'drift mapping' in small populations with no demographic expansion / Terwilliger J. D. [et al.] // Hum. Hered. – 1998. – V. 48. – № 3. – P. 138-154.

9. Анализ линий митохондриальной ДНК в популяции якутов / С. А. Федорова [и др.] // Молекулярная биология. – 2003. – Т. 37. – С. 643-653.

10. Diversity of mtDNA and Y-chromosome lineages in populations of Republic Sakha (Yakutia) / S. A. Fedorova [et al.] // HGM. Kyoto. – 2005. – P. 59.

11. Purification of human genomic DNA from whole blood using proteinase K treatment followed by phenol-chloroform extraction / M. Johns [et al.] // Anal. Biochem. – 1989. – V. 180. – P. 276-278.

12. Roff P. The STATistical analysis of DNA polymorphisms chi 2 and problem of small samples / P. Roff, P. Bentzen // Mol. Biol. Evol. – 1989. – V. 6. – P. 539-545.

13. Bland J. M. The odds ratio / J. M. Bland, D. G. Altman // BMJ. – 2000. – V. 320. – P. 1468.

О.Г. Иванова, О.А. Макеева, А.А. Лежнев, И.В. Цимбалюк, В.В. Шипулин, В. П. Пузырев

## СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА *GATA4* С ЭХОКАРДИОГРАФИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ В ПОПУЛЯЦИИ И У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

УДК 575.191:616.12-008.46

В работе изучены полиморфные варианты гена транскрипционного фактора *GATA4*, контролирующего экспрессию генов миокарда на разных этапах биологического развития, а также при патологических состояниях. Генотипы по однонуклеотидным полиморфным меткам (tagging SNP) гена *GATA4 rs804271*, *rs8191515* и *rs2898293* были определены в контрольной выборке лиц с нормальными эхокардиографическими показателями (N=280) и у больных с ишемической болезнью сердца (N=130). Выявлена ассоциация генотипа GG полиморфизма *rs804271* с более высокими значениями индекса массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ) у женщин в контрольной выборке:  $96,0 \pm 12,7$  г/м<sup>2</sup> у носительниц генотипа TT против  $90,3 \pm 12,2$  г/м<sup>2</sup> и  $90,4 \pm 12,1$  г/м<sup>2</sup> с генотипами GG и GT, соответственно (p=0,037). Полиморфный вариант *rs2898293* ассоциирован с величиной фракции выброса у больных ИБС (p=0,05).

**Ключевые слова:** ИБС, генетический полиморфизм, кальцинеурин.

Polymorphisms of *GATA4* gene, encoding cardiac specific transcription factor, influencing genetic expression in the heart at the different stages of biological development, as well as at the pathological conditions have been studied. Genotypes on *GATA4* tagging SNPs *rs804271*, *rs8191515* and *rs2898293* were identified in control group with normal echocardiographic parameters (N=280) and in patients with ischemic heart disease (n=130). Association of *rs804271* GG genotype with higher left ventricular mass index in woman of control group had been revealed:  $96,0 \pm 12,7$  g/m<sup>2</sup> in TT carriers versus  $90,3 \pm 12,2$  g/m<sup>2</sup> and  $90,4 \pm 12,1$  g/m<sup>2</sup> with genotypes GG and GT, accordingly (p=0,037). *rs2898293* genotypes were associated with ejection fraction in patients with ischemic heart disease (p=0,05).

**Keywords:** ischemic heart disease, polymorphism, calcineurin.

Сотрудники НИИ МГ СО РАМН (г. Томск): **ИВАНОВА Оксана Геннадьевна** – лаборант-исследователь, e-mail: o\_iwanowa@mail.ru, **МАКЕЕВА Оксана Алексеевна** – к.м.н., рук. группы, e-mail: oksana.makeeva@medgenetics.ru, **ПУЗЫРЕВ Валерий Павлович** – акад. РАМН, проф., директор; сотрудники НИИ кардиологии СО РАМН (г. Томск): **ЛЕЖНЕВ Александр Александрович** – аспирант, e-mail: mdralex@cardio.tsu.ru, **ШИПУЛИН Владимир Митрофанович** – д.м.н., проф., зав. отделением, e-mail: shipulin@cardio.tsu.ru; **ЦИМБАЛЮК Игорь Владимирович** – к.м.н., ассистент ГУ ВПО «Сибирский гос. мед. ун-т», e-mail: doctor\_ivts@mail.ru.

### Введение

Ремоделирование сердца является одним из этапов сердечно-сосудистого континуума и представляет собой весь комплекс изменений, ведущих к дисфункции миокарда и развитию сердечной недостаточности [9]. В ответ на хроническую перегрузку сердца при разных заболеваниях развивается гипертрофия миокарда, прогрессирование которой приводит в конечном итоге к декомпенсации, нарушению архитектоники камер сердца и сердечной недостаточности.

Множество сигнальных путей мо-

жет вовлекаться в формирование ремоделирования миокарда. Экспериментальные исследования показывают важнейшую роль кальцинеурина в развитии гипертрофии сердца [3]. Модель участия кальцинеурина в развитии гипертрофии была предложена Molkentin с соавторами и предполагает, что активированный при длительном увеличении базальной концентрации Ca<sup>2+</sup> кальцинеурин дефосфорилирует ядерный фактор активированных T-клеток (NFAT3). Это сопровождается транслокацией NFAT3 в ядро, взаимодействием с фактором транскрипции

типа цинковых пальцев *GATA4*, что приводит к активации экспрессии генов гипертрофического ответа [3].

В настоящее время существует всего несколько исследований, посвященных изучению роли генетического полиморфизма в генах сигнального пути кальцинеурина при гипертрофии сердца и дилатационной кардиомиопатии [2,7,10,12]. Ранее нами были изучены полиморфные варианты *A160G* в гене транскрипционного фактора *NFATC4*, инсерционно-делеционный полиморфизм *51/5D* в промоторе гена кальцинеурина *B*, *PPP3R1* и тринуклеотидный повтор в промоторе гена альфа изоформы каталитической субъединицы кальцинеурина *A*, *PPP3CA* у больных с эссенциальной гипертензией [2,12]. Нами также были изучены два полиморфных варианта в 4 итронне гена *GATA4*, однако не было обнаружено связи полиморфных вариантов в этом гене с наличием гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ), а также эхокардиографическими (ЭхоКГ) параметрами [2].

В задачи настоящего исследования входило изучение взаимосвязи полиморфных вариантов, представляющих собой tagging SNP – однонуклеотидные полиморфные метки) в гене транскрипционного фактора *GATA4* с ЭхоКГ параметрами в выборке здоровых жителей г. Томска, а также с некоторыми клинически значимыми эхокардиографическими показателями в выборке больных ишемической болезнью сердца (ИБС).

#### Материалы и методы

В исследование включено 130 пациентов, больных ИБС, перенесших инфаркт миокарда, средний возраст составил 53 года. Пациенты обследованы в НИИ кардиологии СО РАМН. Контрольная группа в размере 280 чел. в возрасте старше 30 лет (120 мужчин, 165 женщин) была сформирована путем отбора из большой популяционной выборки индивидуумов, имеющих нормальные эхокардиографические параметры, такие как толщина межжелудочковой перегородки, задней стенки левого желудочка, величина конечного диастолического размера и индекса массы миокарда левого желудочка. Пациенты контрольной группы были обследованы на базе Сибирского государственного медицинского университета. Массу миокарда левого желудочка (ММЛЖ) определяли по критериям PENN и стандартной формуле [4]. Индекс ММЛЖ (ИММЛЖ) рассчитывался как отношение ММЛЖ к площади тела пациента. Факт наличия или отсутствия ГЛЖ устанавливали на основании

ИММЛЖ  $>134$  г/м<sup>2</sup> у мужчин и  $>110$  г/м<sup>2</sup> у женщин.

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенол/хлороформной экстракции, амплифицировали фрагменты гена *GATA4*, содержащие изучаемые полиморфные варианты. Праймеры для проведения ПЦР участков гена *GATA4* были подобраны при помощи программы Primer3 [11]. Синтезированный фрагмент гена *GATA4*, содержащий полиморфный вариант *rs804271* после рестрикции ферментом *Bst*MAI в случае аллеля “Т” расщеплялся на фрагменты размером 153 и 55 пар оснований (п.о.). Аллелю “G” полиморфизма *rs8191515* после рестрикции ферментом *Bst*V1 I соответствовали фрагменты длиной 111 и 60 п.о., а аллелю “А” - нерестрицированный фрагмент размером 171 п.о. Аллелю “G” полиморфизма *rs2898293* соответствовали фрагменты длиной 120 и 98 п.о. после рестрикции ферментом *Bst*C8I, аллелю “А” - 218 п.о. Фрагменты ДНК фракционировали в 3% агарозном геле.

Статистическая обработка результатов включала тест на равновесие Харди-Вайнберга, определение частот аллелей и генотипов. Оценку различия частот генотипов и аллелей между разными группами осуществляли по точному тесту Фишера. Сравнение средних значений ЭхоКГ показателей в группах, выделенных в зависимости от генотипа по исследуемому полиморфизму, проводили посредством однофакторного дисперсионного анализа. Зависимость показателя от возраста и индекса массы тела исследовали при помощи линейного регрессионного анализа.

#### Результаты и обсуждение

Распределение генотипов по полиморфизмам *rs804271* и *rs2898293* гена *GATA4* соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга в обеих группах. Частота редкого аллеля “G” полиморфизма *rs804271* в контрольной выборке составила 48%, частота редких аллелей полиморфизмов *rs8191515* и *rs2898293* - 10 и 32% соответственно, что совпадает с частотами, зафиксированными у европейцев по данным OMIM (42, 8,5 и 33%).

На первом этапе исследования была изучена связь полиморфных вариантов в гене *GATA4* с ИБС. Ген транскрипционного фактора *GATA4* является кандидатным в отношении ИБС: с помощью анализа сцепления было показано, что локус хромосомы 8p, включающий ген *GATA4*, вносит вклад в формирование ишемической болезни сердца [6]. Однако в нашем исследовании больные ИБС не отличались от контрольной выборки по частотам аллелей и генотипов (табл.1).

В дальнейшем был проведен анализ дисперсии ЭхоКГ параметров в зависимости от генотипа по изученным полиморфным вариантам гена *GATA4*.

В контрольной группе при сравнении средних значений индекса массы миокарда ЛЖ (ИММЛЖ) у пациентов с разными генотипами не выявлено ассоциации полиморфных вариантов *rs8191515* и *rs2898293* гена *GATA4* с ИММЛЖ. Наличие аллеля “Т” полиморфизма *rs804271*, находящегося в промоторе гена *GATA4*, было связано с более высокими значениями ИММЛЖ у женщин ( $p=0,037$ ). Кроме того, при объединении пациентов с генотипами “GG” и “GT” также была показана ассоциация аллеля “Т” с более высокими значениями ИММЛЖ как отдельно у женщин ( $p=0,010$ ), так и в общей группе мужчин и женщин ( $p=0,047$ ). Средние значения ИММЛЖ в зависимости от генотипа по полиморфизму *rs804271* представлены в табл. 2.

Ген *GATA4* кодирует член GATA семейства транскрипционных факторов типа цинковых пальцев. Члены этого семейства распознают GATA мотив, который присутствует в промоторах многих структурных и регуляторных генов, в том числе генов гипертрофического ответа, таких как гены тяжелой цепи

Таблица 1

Сравнение по частотам аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена *GATA4* в контрольной выборке и у больных ИБС

Полиморфизм/ выборка	Генотипы			Аллели	
	GG	GT	TT	T (%)	G (%)
<i>rs804271, GATA4</i>					
Контроль	64	141	78	297 (52,47)	269 (47,53)
ИБС	33	62	32	126(49,61)	128(50,39)
	$p=0,733$			$p=0,494$	
<i>rs8191515, GATA4</i>					
Контроль	227	48	5	58(10,36)	502(89,64)
ИБС	99	28	2	32(12,40)	226(87,60)
	$p^*=0,513$			$p=0,454$	
<i>rs2898293, GATA4</i>					
Контроль	33	117	134	183(32,22)	385(67,78)
ИБС	9	57	64	75(28,85)	185(71,15)
	$p=0,333$			$p=0,373$	

Примечание. p – достигнутый уровень значимости для теста  $\chi^2$  с поправкой Йетеса на непрерывность,  $p^*$  - для точного теста Фишера

Таблица 2

Значения ИММЛЖ в зависимости от генотипа по полиморфизму rs804271 гена GATA4 в контрольной выборке

Генотип	ИММЛЖ, г/м <sup>2</sup> мужчины	ИММЛЖ, г/м <sup>2</sup> женщины	ИММЛЖ, г/м <sup>2</sup> Общая группа (мужчины и женщины)
GG	100,90±13,73	90,26±12,21	94,41±13,75
GT	101,84±17,96	90,39±12,06	95,18±15,81
TT	102,60±17,26	95,99±12,67	98,96±15,17
p	0,928863	0,037	0,133
GG+GT vs. TT rs 804271			
GG+GT	101,56±16,74	90,35±12,05	94,94±15,16
TT	102,60±17,26	95,99±12,67	98,96±15,17
p	0,76	0,010	0,047
GT+TT vs. GG rs 804271			
GG	100,90±13,75	90,26±12,21	94,41±13,75
GT+TT	102,12±17,614	92,32±12,51	96,53±15,65
p	0,75	0,367	0,330

α-миозина, сердечного тропонина С, предсердного и мозгового натрийуретических пептидов, сердечного тропонина I, натрий-кальциевого обменника и др. [5]. Полиморфизмы, находящиеся в промоторе гена GATA4 могут непосредственно влиять на экспрессию гена, и, таким образом, участвовать в механизмах ремоделирования сердца.

Больные ишемической болезнью сердца, включенные в исследование, перенесли инфаркт миокарда и характеризовались сниженными значениями ФВ и высокими значениями конечного диастолического объема. Механизмы развития повреждения миокарда при ИБС, в том числе ишемической кардиомиопатии, остаются в значительной степени неизученными. Основной причиной заболевания является множественное атеросклеротическое поражение коронарных артерий [1]. Однако выраженная дилатация камер сердца происходит далеко не у каждого больного, и между ее степенью и выраженностью нарушения коронарного кровотока нет прямой зависимости [1].

Несколько исследований продемонстрировали, что гены сигнального пути кальцинеурина могут играть

важную роль в прогрессии сердечной недостаточности у человека [8]. Так, при дилатационной кардиомиопатии, Diedrichs с соавторами показали, увеличивается экспрессия GATA4, а также энзиматическая активность кальцинеурина и экспрессия кальцинеурина В.

Нами была изучена роль полиморфных вариантов в гене GATA4 в формировании клинически значимых фенотипов, таких как ИМЛЖ у здоровых лиц контрольной группы и фракции выброса левого желудочка у больных с ИБС. При сравнении средних значений ФВ у пациентов с разными генотипами по полиморфизмам rs804271 и rs8191515 гена GATA4 в этой группе пациентов не выявлено ассоциации с носительством тех или иных генотипов по изученным полиморфизмам гена GATA4.

Средние значения ФВ в зависимости от генотипа по полиморфизму rs2898293 представлены в табл.3. Выявлено, что генотип "GG" полиморфизма rs2898293, находящийся в интроне гена GATA4, связан с более низким значением ФВ у женщин (p=0,050).

Средние значения ФВ в зависимости от генотипа по полиморфизму rs2898293 представлены в табл.3. Выявлено, что генотип "GG" полиморфизма rs2898293, находящийся в интроне гена GATA4, связан с более низким значением ФВ у женщин (p=0,050).

#### Заключение

Ген транскрипционного фактора GATA4 – один из важнейших компонентов сигнального пути кальцинеурина – является важным геном-кандидатом гипертрофии миокарда. Как показывают различные экспериментальные исследования, ген GATA4 может вносить вклад в формирование ремоделирования сердца и на более поздних этапах сердечно-сосудистого континуума – в формировании дилатации камер сердца после инфаркта миокарда. В настоящем исследовании показана ассоциация полиморфизма rs804271 с ИММЛЖ в контрольной группе, а так-

же rs2898293 с фракцией выброса у больных ИБС. Ранее были выявлены ассоциации полиморфных вариантов генов NFATC4, PPP3R1 с эхокардиографическими параметрами при эссенциальной гипертонии и сахарном диабете. Таким образом, полученные результаты указывают на необходимость дополнительных исследований этих генов, так как функционально-значимые полиморфизмы сигнального пути кальцинеурина еще неизвестны.

Работа поддержана грантом РФФИ 08-04-01814-а

#### Литература

1. Бойцов С.А., Глухов А.А., И.М.Ильинский. Ишемическая кардиомиопатия (обзор литературы) // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 1999, №2-3, С. 39-44.
2. Полиморфизмы генов фактора транскрипции GATA-4 и альфа-изоформы кальцинеурина А в связи с гипертрофией миокарда при эссенциальной гипертонии / О.А. Makeeva, К.В. Пузырев, М.В. Голубенко и др. // Генетика человека и патология: Сб. научных трудов. под ред. В.П. Пузырева. - 2004 – Вып.7.- С. 108-117.
3. A Calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy / J.D. Molkentin, [et al.] // Cell. - 1998. - V. 93.-P. 215-228.
4. Devereux R. B., Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man: anatomic validation of the method / R. B. Devereux, N. Reichek // Circulation. - 1977. -V.55.-P.613-618.
5. GATA transcription factors in the developing and adult heart / S. Pikkariainen, [et al.] // Cardiovasc. Res. - 2004. - V. 63. - P.196-207.
6. Identification of a chromosome 8p locus for early-onset coronary heart disease in a French Canadian population / J.C. Engert [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. - 2008. V.16.-P. 105-14.
7. Identification of a novel 5-base pair deletion in calcineurin B(PPP3R1) promoter region and its association with left ventricular hypertrophy / W.Tang, [et al.] // Am. Heart J.- 2005.-V.150.-P. 845-51.
8. Increased regulatory activity of the calcineurin NFAT pathway in human heart failure / H. Diedrichs, [et al.] // Europ. J. Heart Fail. - 2004.-V.6. - P. 3-9.
9. Maisch B. Ventricular remodeling / B. Maisch // Cardiology. – 1996.- V. 87 (Suppl. 1). P. 2-10.
10. Polymorphisms of genes of the cardiac hypertrophy / O. Poirier [et al.] // Europ.J. Hum. Genet.-2003.-V.11. - P.659-664.
11. Rozen S., Skaletsky H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. / S. Rozen, H.J. Skaletsky // Methods in Molecular Biology. Humana -2000.P.365-386.
12. The role of calcineurin pathway genes polymorphisms in cardiac remodeling of different origin / O. A. Makeeva [et al.] // European Heart Journal – 2008.-V.29 (Abstract Suppl.).

С.А. Чугунова, М.А. Судомоина, Т.Я. Николаева, М.Г. Парфенов,  
О.Ю. Макарычева, А.Б. Гехт, О.О. Фаворова

## ПОЛИМОРФИЗМ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И ГЕМОРАГИЧЕСКИЙ ИНСУЛЬТ У ЯКУТОВ

УДК 575,162

Впервые для якутской популяции проведен анализ вклада аллелей генов системы гемостаза, кодирующих альфа-фибриноген (*FGA*), бета-фибриноген (*FGB*) и тканевой активатор плазминогена (*TPA*), в генетическую предрасположенность к геморрагическому инсульту (ГИ) и в особенности его клинического течения. У больных ГИ по сравнению с контрольной группой выявлено значимое повышение частоты носительства генотипа *FGA4266 A/A*: 26,9% против 16,1% ( $p=0,04$ ,  $ОШ=1,9$ , ДИ 1,0 - 3,8) и, соответственно, понижение частоты носительства аллеля *FGA4266G* 73,1% против 83,9% ( $p=0,04$ ,  $ОШ=0,5$ , ДИ 0,3 - 1,0). Выявлено триаллельное сочетание *FGB-249C*; *FGA4266G*; *TPA-7351C*, частота носительства которого значимо различается у больных ГИ с разным типом гематомы.

**Ключевые слова:** геморрагический инсульт, генетическая предрасположенность, альфа-фибриноген, бета-фибриноген, тканевой активатор плазминогена

For the first time an analysis of contribution of alleles of haemostasis genes, encoding fibrinogen alpha (*FGA*), fibrinogen beta (*FGB*) and tissue plasminogen activator (*TPA*), in genetic susceptibility to and clinical aspects of hemorrhagic stroke (HS) was performed in ethnic Yakuts. HS patients compared to controls demonstrated significant increase of frequency of *FGA4266A/A* genotype carriage: 26,9% vs 16,1% ( $p=0,04$ ,  $OR=1,9$ ,  $CI$  1,0 - 3,8) and corresponding decrease of *FGA4266G* allele carriage: 73,1% vs 83,9% ( $p=0,04$ ,  $OR=0,5$ ,  $CI$  0,3 - 1,0). We identified tri-allelic combination: *FGB-249C*; *FGA4266G*; *TPA-7351C*, which carriage is significantly differed in HS patients with different types of haemorrhage.

**Keywords:** hemorrhagic stroke, genetic susceptibility, fibrinogen alpha, fibrinogen beta, tissue plasminogen activator.

### Введение

Геморрагический инсульт (ГИ) является широко распространенным полигенным заболеванием большой социальной значимости. Изучение генетической предрасположенности к нему осложняется как многочисленностью генов, вносящих вклад в развитие ГИ, так и наличием этиопатогенетической гетерогенности [10]. Генетические исследования предрасположенности к ГИ в основном направлены на анализ роли генов-кандидатов, выбранных на основе их функциональной связи с патофизиологией ГИ. Как правило, в качестве генов-кандидатов для ГИ рассматривают гены, кодирующие компоненты систем гемостаза, липидного и гомоцистеинового метаболизма, продукции оксида азота (II) и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Кроме того, в качестве кандидатов на ассоциацию с предрасположенностью к ГИ рассматривают ряд генов, не входящих в эти системы, например, гены, продукты которых участвуют в развитии воспаления.

Настоящее ретроспективное исследование посвящено изучению у этнических якутов методом «случай-контроль» возможных ассоциаций аллельных вариантов генов, кодирующих компоненты системы гемостаза, а именно, генов альфа-фибриногена (*FGA*), бета-фибриногена (*FGB*) и тканевого активатора плазминогена (*TPA*), с риском ГИ, а также с некоторыми особенностями его клинического течения.

### Материалы и методы исследования

В исследование включено 148 неродственных якутских больных с ГИ, проходивших лечение в нейрососудистом отделении Центра экстренной медицинской помощи г. Якутска, со средним возрастом ( $\pm$  ст. откл.)  $57,0 \pm 10,5$  лет (из них 88 мужчин, средний возраст -  $55,7 \pm 9,3$  года, и 60 женщин, средний возраст -  $59,2 \pm 11,8$  лет). Диагноз был поставлен на основании анамнестических сведений, результатов клинического осмотра и данных дополнительных методов исследования (компьютерная томография головного мозга, люмбальная пункция). У всех пациентов инсульт был зарегистрирован впервые. Все больные были охарактеризованы по типу гематомы (медиаальный, латеральный, лобарный и смешанный типы), протромбиновому индексу (ПТИ) при дебюте заболевания и исходу заболевания (летальный и нелетальный) по данным наблюдения в течение года. Все индивиды (или их родственники) давали информированное согласие на проведение генетических исследований. Контрольную группу составили 88 здоровых по медицинским показаниям индивидов

якутской этнической принадлежности, средний возраст  $\pm$  ст. откл.  $59,1 \pm 14,9$  лет. Из них 46 мужчин (средний возраст  $58,9 \pm 15,6$  лет) и 42 женщины (средний возраст -  $59,2 \pm 14,3$  лет).

ДНК выделяли стандартным методом с применением экстракции смесью фенол/хлороформ. Геномное типирование проводили описанными в литературе методами, основанными на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод анализа полиморфизма длины рестриционных фрагментов продуктов ПЦР (метод ПЦР-ПДРФ) применяли для анализа однонуклеотидной замены *A4266G* в 5-м экзоне гена *FGA*, приводящей к замене Thr на Ala в положении 312 аминокислотной цепи [2] и для анализа однонуклеотидной замены в *C-249T* в гене *FGB* [13]. Метод ПЦР с использованием аллельспецифических праймеров (метод ПЦР-SSP) применяли для анализа однонуклеотидной замены *C-7351T* гена *TPA* [8]. Для выявления аллелей и аллельных сочетаний, носительство которых достоверно связано с ГИ или его клиническими характеристиками, применяли оригинальное программное обеспечение «APSampler», использующее метод Монте-Карло Марковскими цепями и Байесовскую непараметрическую статистику и позволяющее верифицировать значимость выявленных ассоциаций ГИ с носительством отдельных «паттернов» (аллелей и сочетаний аллелей) с помощью точного критерия Фишера [6]. Значимым считали различие сравниваемых частот при значении  $p \leq 0,05$ . Силу ассоциаций выражали в значениях отношения шансов (ОШ), принимая значение доверительного интервала (ДИ) равным 95%.

**ЧУГУНОВА Саргылана Афанасьевна** – м.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, врач-невролог РБ№2 ЦЭМП высшей квалиф. категории, e-mail: sargys@mail.ru; сотрудники ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет» Росздрава, г. Москва: **СУДОМОИНА Марина Анатольевна** – к.б.н., с.н.с., доцент, **ПАРФЕНОВ Михаил Григорьевич** – к.б.н., м.н.с., **ГЕХТ Алла Борисовна** – д.м.н., проф., **ФАВОРОВА Ольга Олеговна** – д.б.н., проф., зав. кафедрой; **НИКОЛАЕВА Татьяна Яковлевна** – д.м.н., зав. кафедрой МИ ЯГУ; **МАКАРЫЧЕВА Ольга Юрьевна** – аспирант ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Росмедтехнологий, Москва.

Таблица 1

Частота носительства аллелей и генотипов полиморфного участка A4266G (Thr312Ala) гена альфа-фибриногена у больных ГИ и группы контроля якутской этнической группы

Аллели и генотипы	Больные ГИ, 145 чел.	Здоровые, 87 чел.	Значение $p$ при сравнении частот, ОШ, 95%ДИ
Аллели, число (%) носителей			
G	106 (73,1%)	73 (83,9%)	$p=0,04$ , ОШ=0,5, ДИ 0,3 - 1,0
A	110 (75,9%)	58 (66,7%)	н.з.
Генотипы, число (%) носителей			
G/G	35 (24,1%)	29 (33,3%)	н.з.
A/G	71 (49,0%)	44 (50,6%)	н.з.
A/A	39 (26,9%)	14 (16,1%)	$p=0,04$ , ОШ=1,9, ДИ 1,0 - 3,8

Примечание. н.з.- не обнаружено значимых различий.

### Результаты и обсуждение

Частоты носительства аллелей и генотипов исследуемых полиморфных участков приведены в табл.1-3. Для частот всех генотипов в группе больных ГИ и в контрольной группе соблюдалось равновесие Харди-Вайнберга.

В случае однонуклеотидной замены A4266G (Thr312Ala) в гене *FGA* у больных ГИ по сравнению с контрольной группой выявлено значимое повышение частоты носительства генотипа A/A: 26,9% против 16,1% ( $p=0,04$ , ОШ=1,9, ДИ 1,0 - 3,8) и, соответственно, понижение частоты носительства аллеля G: 73,1% против 83,9% ( $p=0,04$ , ОШ=0,5, ДИ 0,3 - 1,0). Значимых отличий в распределении аллелей и генотипов *FGB* и *TPA* в сравниваемых группах не обнаружено.

Выявлено триаллельное сочетание *FGB-249C*; *FGA4266G*; *TPA-7351C*, частота носительства которого отличается у больных ГИ с разным типом гематомы (табл.4). Статистически значимое повышение частоты носительства этого сочетания наблюдается у больных ГИ как с лобарной гематомой ( $p=0,02$ , ОШ=4,5, ДИ 1,2 - 16,4), так и с латеральной гематомой ( $p=0,02$ , ОШ=4,2, ДИ 1,2 - 14,6) по сравнению с больными с медиальной гематомой. Соответственно, у больных ГИ с медиальной гематомой выявлено понижение частоты носительства этого сочетания по сравнению как со всеми остальными больными ( $p=0,01$ , ОШ=0,2, ДИ 0,08 - 0,8), так и с больными с лобарной гематомой ( $p=0,02$ , ОШ=0,2, ДИ 0,06 - 0,8), и с больными с латеральной гематомой ( $p=0,02$ , ОШ=0,2, ДИ 0,07 - 0,8).

В исследуемой выборке больных не выявлено ассоциаций аллелей рассматриваемых генов ни с исходом заболевания, ни с ПТИ.

Некоторые авторы считают ГИ наиболее удобной моделью для генетических исследований среди всех инсультов. ГИ характеризуется точностью фенотипических проявлений и в некоторых случаях - убедительными доказательствами генетической этиологии [11]. Согласно сложившимся в результате многочисленных исследований представлениям, развитие ГИ, как и многих других сердечно-сосудистых заболеваний, обусловлено совместным вкладом многих полиморфных генов. Для выявления этих генов проводили как исследование генетической предрасположенности к ГИ для отдельных этнических групп [например, 1, 4, 5, 7, 9, 14-16], так и обобщение полученных данных с помощью мета-анализа [10]. Что касается генов системы гемостаза, в этой работе обнаружили ассоциации с ГИ аллелей генов ингибитора активатора плазминогена I *SERPINE1* и фактора свертывания крови V. При проведении мета-анализа пришли к выводу о возможных различиях генетической предрасположенности к различным типам ГИ, подтверждая тем самым этиопатогенетическую гетерогенность этого заболевания.

Известно, что частой причиной лобарных гематом является церебральная амилоидная ангиопатия. В отличие от медиально расположенных они имеют склонность к рецидивированию. В свою очередь, медиальные гематомы отличаются более тяжелым течением с нарушениями сознания и склонностью к прорыву крови в желудочки мозга. Наблюдаемое нами у больных ГИ с медиальной гематомой понижение частоты носительства триаллельного сочетания *FGB-249C*; *FGA4266G*; *TPA-7351C* может свидетельствовать о различии генетических факторов, предрасполагающих к гематомам различного типа. С этим выводом согласуются данные нескольких исследований о достоверной ассоциации аллеля  $\epsilon 2$  гена *APOE* с развитием

Таблица 2

Частота носительства аллелей и генотипов полиморфного участка C-249T гена бета-фибриногена у больных ГИ и группы контроля якутской этнической группы

Аллели и генотипы	Больные ГИ, 128 чел.	Здоровые, 82 чел.
Аллели, число (%) носителей		
C	65 (50,8%)	43 (52,4%)
T	113 (88,3%)	77 (93,9%)
Генотипы, число (%) носителей		
C/C	15 (11,7%)	5 (6,1%)
C/T	50 (39,1%)	38 (46,3%)
T/T	63 (49,2%)	39 (47,6%)

Примечание. В табл.2-3 значимых различий между больными ГИ и здоровыми не обнаружено.

Таблица 3

Частота носительства аллелей и генотипов полиморфного участка C-7351T гена тканевого активатора плазминогена у больных ГИ и группы контроля якутской этнической группы

Аллели и генотипы	Больные ГИ, 127 чел.	Здоровые, 73 чел.
Аллели, число (%) носителей		
C	123 (96,9%)	66 (90,4%)
T	60 (47,2%)	36 (49,3%)
Генотипы, число (%) носителей		
C/C	67 (52,8%)	37 (50,7%)
C/T	56 (44,1%)	29 (39,7%)
T/T	4 (3,1%)	7 (9,6%)

лобарных гематом, но не медиально расположенных [10, 11]. В этих исследованиях, однако, не получили данных об ассоциации аллелей генов, кодирующих компоненты системы гемостаза, с каким-либо типом ГИ (рассматривали гены факторов свертывания крови V и XIII, ген ингибитора активатора плазминогена I *SERPINE1*). Существование генетических предпосылок для различной локализации гематом при ГИ обсуждается также в обзоре [11].

Необходимо анализа совместно-го вклада независимо действующих и/или взаимодействующих аллелей и генотипов нескольких генов в генетическую предрасположенность к ГИ также давно признается исследователями, и его проводят для различных популяций. Такое исследование проводили,

Таблица 4

Частота носительства триаллельного сочетания *FGB-249C*; *FGA4266G*; *TPA-7351C* у больных ГИ с различным типом гематом (всего 106 чел.)

	Тип гематомы			
	лобарная	латеральная	медиальная	смешанная
Всего больных с данным типом гематомы	27(100%)	38(100%)	30(100%)	11(100%)
Среди них число (%) носителей сочетания	11(40,7%)*	15(39,5%)*	4(13,3%)*	3(27,3%)

\* Группы, для которых попарно выявлены значимые различия.

в частности, в Голландии для генов гамма-фибриногена (*FGG*) и *FGA*, где получили ассоциацию ГИ с определенным гаплотипом аллелей этих двух генов, но не с их отдельными аллелями [3]. Эти результаты в принципе соответствуют нашим данным об ассоциации сочетания *FGB-249C; FGA4266G; TPA-7351C*, несущего аллели генов *FGB* и *FGA*, с разным типом гематомы. При исследовании в Турции показали ассоциацию ГИ с носительством сочетания аллелей двух полиморфных участков в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), но не с отдельными аллелями этих участков [12]. Однако в этих исследованиях в основном рассматривают сочетания аллелей и генотипов не более двух генов, возможно, из-за недостаточной распространенности доступных способов статистического анализа. Насколько нам известно, в России подобных исследований не проводили.

Наше исследование проведено для якутов, проживающих в Республике Саха (Якутия). Якуты представляют собой генетически изолированную популяцию, которая отвечает многим требованиям, предъявляемым при проведении молекулярно-генетических исследований, что обеспечивает адекватные условия для выявления генетической предрасположенности к заболеваниям. Кроме того, использование программного обеспечения «APSampler» для анализа ассоциации с заболеванием как отдельных аллелей, так и сочетаний аллелей и генотипов нескольких генов, значительно повышает эффективность проводимого

анализа. Комплексный анализ позволил выявить на сравнительно небольшой выборке индивидов ассоциацию ГИ с носительством аллелей и генотипов гена *FGA*, а также связь сочетания аллелей генов *FGA*, *FGB* и *TPA* с типом гематомы у больных ГИ. Тем не менее относительно невысокая статистическая значимость полученных результатов говорит о желательности валидации полученных результатов для расширенной группы больных и контрольной группы.

#### Заключение

Впервые для якутской популяции проведен анализ вклада аллелей генов, кодирующих компоненты системы гемостаза - *FGA*, *FGB* и *TPA*, в генетическую предрасположенность к ГИ и в особенности его клинического течения. Выявлена ассоциация ГИ с носительством аллелей и генотипов гена *FGA*, а также связь сочетания трех аллелей генов *FGA*, *FGB* и *TPA* с типом гематомы у больных ГИ.

#### Литература

1. Banerjee I., Gupta V., Ahmed T. et al. Inflammatory system gene polymorphisms and the risk of stroke: a case-control study in an Indian population // *Brain Res Bull.* - 2008. - Vol. 75. - P. 158-165.
2. Carter A.M., Catto A.J., Grant P.J.: Association of the alpha-fibrinogen Thr312Ala polymorphism with poststroke mortality in subjects with atrial fibrillation // *Circulation.* - 1999. - Vol. 99. - P. 2423-2426.
3. Cheung E.Y., Bos M.J., Leebeek F.W. et al. Variation in fibrinogen *FGG* and *FGA* genes and risk of stroke: the Rotterdam Study // *Thromb Haemost.* 2008. - Vol. 100. - P. 308-313.
4. Cho K.H., Kim B.C., Kim M.K. et al. No association of factor XIII Val34Leu polymorphism with primary intracerebral hemorrhage and healthy controls in Korean population // *J Korean Med Sci.*

2002. - Vol. 17. - P. 249-53.

5. Corral J., Iniesta J.A., González-Conejero R. et al. Factor XIII Val34Leu polymorphism in primary intracerebral haemorrhage // *Hematol J.* 2000. - Vol. 1. - P. 269-273.
6. Favorov A.V., Andreewski T.V., Sudomoina M.A. et al // A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans // *Genetics.* 2005. - Vol. 171. - P. 2113-2121.
7. Greisenegger S., Weber M., Funk M. et al. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and risk of primary intracerebral hemorrhage // *Eur J Neurol.* 2007. - Vol. 14. - P. 1098-1101.
8. Janes J., Hamilton-Bruce M.A., Pilotto L. et al. Tissue plasminogen activator -7351C/T enhancer polymorphism is a risk factor for lacunar stroke // *Stroke.* 2004. - Vol. 35. - P. 1090-1094.
9. Liu X.N., Song L., Wang D.W. et al. Correlation of thrombospondin-1 G1678A polymorphism to stroke: a study in Chinese population // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2004. - Vol. 84. - P. 1959-1962.
10. Peck G., Smeeth L., Whittaker J. et al. The genetics of primary haemorrhagic stroke, subarachnoid haemorrhage and ruptured intracranial aneurysms in adults // *PLoS ONE.* 2008. - Vol. 3. - P. e3691.
11. Rost N.S., Greenberg S.M., Rosand J. et al. The Genetic Architecture of Intracerebral Hemorrhage // *Stroke.* - 2008. - Vol. 39. - P. 2166-2173.
12. Sazci A., Ergul E., Tuncer N. et al. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms are associated with ischemic and hemorrhagic stroke: Dual effect of *MTHFR* polymorphisms C677T and A1298C // *Brain Res Bull.* 2006. - Vol. 71. - P. 45-50.
13. van 't Hooft F.M., von Bahr S.J., Silveira A. et al. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999. - Vol. 19. - P. 3063-3070.
14. Wang Q., Ding H., Tang J.R. et al. C-reactive protein polymorphisms and genetic susceptibility to ischemic stroke and hemorrhagic stroke in the Chinese Han population // *Acta Pharmacol Sin.* 2009. - Vol. 30. - P. 291-298.
15. Xue H., Wang H., Song X. et al. Phosphodiesterase 4D gene polymorphism is associated with ischaemic and haemorrhagic stroke // *Clin Sci (Lond).* 2009. - Vol. 116. - P. 335-340.
16. Yamada Y., Metoki N., Yoshida H. et al. Genetic factors for ischemic and hemorrhagic stroke in Japanese individuals // *Stroke.* 2008. - Vol. 39. - P.

### А.В. Казанцева, Г.Г. Фасхутдинова, С.С. Куличкин, Э.К. Хуснутдинова РОЛЬ ПОЛИМОРФНОГО VNTR ЛОКУСА В ГЕНЕ DRD4 В РАЗВИТИИ АЛКОГОЛЬНОЙ И НАРКОТИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ И ФОРМИРОВАНИИ ЛИЧНОСТНЫХ ЧЕРТ У ЗДОРОВЫХ ИНДИВИДОВ

УДК 575.162, 575.167, 57.026,  
57.024, 57.022

Известно, что черты личности, характеризующие социабельность, являются промежуточными фенотипами при развитии аддиктивных расстройств. С целью выявления маркеров риска развития алкоголизма и опийной наркомании у татар, русских, башкир, якутов, эвенков по этнической принадлежности был проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного VNTR локуса в промоторном регионе гена *DRD4* между пациентами и здоровыми донорами. Выявлено, что маркером повышенного риска развития опийной наркомании у татар является аллель *DRD4\*5*, а алкоголизма у татар и русских - генотип *DRD4\*5/S* и аллель *DRD4\*5*. Однофакторный дисперсионный анализ, проведенный с учетом половой и этнической принадлежности у здоровых индивидов, прошедших психологическое тестирование, показал ассоциацию аллеля *DRD4\*5* с повышенной «экстраверсией» у мужчин татар и с «настойчивостью» у русских мужчин. Полученные результаты свидетельствуют о взаимосвязи пониженной дофаминергической активности с риском развития аддиктивных расстройств, повышенной «экстраверсией» и пониженной «настойчивостью».

**Ключевые слова:** дофаминергическая система, алкоголизм, наркомания, черты личности, полиморфный локус, анализ ассоциаций.

Sociability-related personality traits are assumed to be intermediate phenotypes predisposing to addiction. In order to reveal alcoholism and opiate addiction risk markers we conducted comparative analysis of allele and genotype distribution of VNTR loci in promoter region of *DRD4* gene between patients of Tatar, Russian, Bashkir, Yakut, Evenk ethnicity and matched controls. *DRD4* S-allele was revealed to be the risk marker for opiate addiction in Tatar male, while both *DRD4* S/S-genotype and *DRD4* S-allele were demonstrated to be the risk markers for alcoholism

**КАЗАНЦЕВА Анастасия Валерьевна** – м.н.с. Института биохимии и генетики УНЦ РАН, e-mail: kazantsa@mail.ru; **ФАСХУТДИНОВА Гульназ Габдулахатовна** – аспирант Института биохимии и генетики УНЦ РАН, faskhutdinova@gmail.com; ekkh@anrb.ru; **КУЛИЧКИН Степан Степанович** – м.н.с. ЯнЦ КМП СО РАМН, e-mail: kulichkin\_stepan@mail.ru; **ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна** – д.б.н., проф., зав. отделом Института биохимии и генетики УНЦ РАН.

in Tatar and Russian males. As a result of analysis of variance considering gender and ethnical differences and performed in healthy individuals subjected to personality traits assessment, *STATistically* significant increase in Extraversion in Tatar male and in Persistence in Russian male *DRD4* S-allele carriers was observed. Revealed findings point to the presence of positive correlation between decreased dopaminergic activity and higher risk of alcohol and opiate addiction, increase in Extraversion and decrease in Persistence.

**Keywords:** dopaminergic system, alcoholism, addiction, personality traits, polymorphic locus.

### Введение

Согласно мировой статистике, аддиктивные расстройства, промежуточными фенотипами которых являются определенные черты личности [10], входят в первую десятку причин смертности и представляют важную социальную проблему в большинстве развитых стран. Согласно результатам близнецовых исследований, конкордантность по алкоголизму достаточно высока как у монозиготных (до 70%), так и дизиготных (40–45%) близнецов [1], а показатели наследуемости для черт темперамента составляют 40–60% [11]. Известно, что экспрессия генов, вовлеченных в развитие этих мультифакториальных признаков, варьирует в процессе индивидуального развития индивида и находится под влиянием факторов окружающей среды [11]. Изучение генов дофаминергической системы, вовлеченной в функционирование системы подкрепления мозга, являющейся фокусом действия нейрофизиологических механизмов положительного подкрепления психоактивных веществ (ПАВ), представляет особый интерес [1].

Важную роль в дофаминергической нейротрансмиссии играет рецептор D4 дофамина (*DRD4*), который экспрессируется в отделах мозга, ответственных за регуляцию памяти, эмоций и когнитивной деятельности [20]. Ряд работ свидетельствует о том, что мыши-нокауты по гену *DRD4* характеризуются снижением исследовательской активности [9] и чувствительностью к ПАВ [15]. Полиморфный локус, представляющий дубликацию участка 120 п.н. в промоторном регионе (5'-UTR) гена *DRD4* (11p15.5) (1,24 кб от иницирующего кодона), содержит сайты связывания нескольких транскрипционных факторов [20], следовательно, влияет на экспрессию гена: в экспериментах на клеточных линиях было отмечено уменьшение экспрессии гена в ряду: 1 повтор > 2 повтора > 4 повтора в *VNTR* локусе [3, 13]. Результаты исследований, вовлекающих *VNTR* локус в 5'-UTR гена *DRD4*, свидетельствуют об ассоциации генотипа *DRD4*\*S/\*S с повышенным «поиском новизны» [4], с развитием расстройства дефицита внимания и гиперактивности (ADHD) (которое, как и аддиктивная зависимость, характеризуется повышенным стремлением к новым впечатлениям) [3], а гаплотипа гена *DRD4* - с метам-

фенаминовой зависимостью [2]. Существуют и противоположные данные [13, 22]. Противоречивость опубликованных результатов обусловлена влиянием множества факторов, включающих гендерные, возрастные, этнические различия, а также различия в факторах окружающей среды. Поэтому важным аспектом при проведении такого рода исследований является учет этнической и половой принадлежности исследуемых индивидов.

**Целью** настоящей работы являлась оценка распределения частот генотипов и аллелей *VNTR* локуса в промоторном регионе (5'-UTR) гена *DRD4* у татар, русских, башкир, якутов, эвенков по этнической принадлежности и анализу ассоциаций этого маркера с алкоголизмом, опийной наркоманией и чертами личности у здоровых индивидов в данных этнических группах.

### Материалы и методы исследования

В исследовании по выявлению генетической предрасположенности к аддиктивным расстройствам приняли участие 302 мужчины (113 русских, 91 татарин, 98 башкир) (средний возраст: 40,8±11,0) с диагнозом острый алкогольный психоз; 168 мужчин (93 русских, 75 татар) (средний возраст: 22,9±4,0 лет) с установленным клиническим диагнозом опийная наркомания, находившихся на стационарном лечении в Республиканском наркологическом диспансере № 1 МЗ РБ; 106 якутов и 34 эвенка (средний возраст: 43,4±13,4) с диагнозом алкоголизм 2-й стадии, находившиеся на стационарном лечении в Якутском республиканском наркологическом диспансере. Диагноз был поставлен в соответствии с Международной классификацией болезней десятого пересмотра (МКБ-10, 1994). Контрольную группу составили 425 чел. (114 русских, 99 татар, 72 башкира, 93 якута и 47 эвенков), соответствующих по полу и возрасту группе больных, не состоявших на учете у психиатра и нарколога и отрицавших злоупотребление ПАВ. Психологическое тестирование по методикам Айзенка (EPI) и Клонинджера (TCI-125) [6] было проведено у 652 психически здоровых индивидов из Башкортостана в возрасте 17–26 лет (средний возраст: 19,53±2,24 лет). Все лица были проинформированы о характере проводимого научного исследования и дали пись-

менное согласие на забор крови.

ДНК была выделена из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Реакционную смесь для амплификации, состоящую из 0,1–1 мкг геномной ДНК, 10 пмоль каждого олигопрайма, 250 мкМ dNTP, 0,05 ед. Taq-полимеразы, помещали в 15 мкл однократного буфера для ПЦР («Силекс», Москва). *VNTR* локус в гене *DRD4* выявляли при помощи ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров 5'-GAACCTAAGCCGACCAGAG-3' и 5'-GTGAGCCTCACACAGGACAAG-3'. Условия ПЦР были следующими: 94°C – 3 мин, 35 циклов: (94°C – 30 секунд (с), 60°C – 30 с, 72°C – 1 мин), 72°C – 3 мин. ПЦР продукты анализировались электрофоретически в 7% полиакриламидном геле с визуализацией ДНК в ультрафиолетовом свете. При этом выявлялись аллель *DRD4*\*S (274 п.н.) и аллель *DRD4*\*L (394 п.н.).

Для сравнения распределения частот встречаемости аллелей и генотипов полиморфных ДНК-локусов в двух этнических группах была использована компьютерная программа RxC (Rows x Columns) на основе алгоритма, описанного Roff и Bentzen [19]. Вычисление показателей  $\chi^2$  для бинарных данных проводили с использованием интерактивной таблицы сопряженности 2×2 с вычислением статистик связи OR (odds ratio), а также их доверительных интервалов (с поправкой Изйтса на непрерывность) (<http://www.staTPAges.org/ctab2x2.html>). Для выявления ассоциации между значениями личностных черт и генотипами (аллелями) статистическая обработка включала проведение однофакторного (ANOVA) дисперсионного анализа (SPSS 13.0).

### Результаты и обсуждение

Частоты генотипов и аллелей *VNTR* локуса в 5'-UTR гена *DRD4* во всех изученных группах соответствовали распределению Харди-Вайнберга (таблица). Согласно литературным данным, частота редкого аллеля *DRD4*\*S *VNTR* локуса в промоторном регионе гена *DRD4* варьирует от 17% в европейских популяциях до 27,6% в китайской популяции и 59,6% у африканцев [13]. При оценке распределения частот генотипов *VNTR* локуса гена *DRD4* у здоровых индивидов показано преобладание генотипа *DRD4*\*L/\*L у татар, башкир, русских и эвенков по этничес-

Распределение частот генотипов и аллелей VNTR локуса в 5'-UTR гена DRD4 у индивидов с опийной наркоманией, алкоголизмом и здоровых доноров

Группа	N	Частоты генотипов, n (%)			Частоты аллелей, 2n (%)		
		*S/*S	*S/*L	*L/*L	*S	*L	
Контроль ВУР	В целом	285	11 (3,9)	75 (26,3)	199 (69,8)	97 (17,0)	473 (83,0)
	Татары	99	1 (1,0)	30 (30,3)	68 (68,7)	32 (16,2)	166 (83,8)
	Русские	114	3 (2,6)	24 (21,0)	87 (76,3)	30 (13,2)	198 (86,8)
	Башкиры	72	7 (9,6)	21 (28,9)	44 (61,5)	35 (24,3)	109 (75,7)
Больные ОН	В целом	168	10 (5,9)	47 (28,0)	111 (66,0)	67 (19,9)	269 (80,1)
	Татары	75	6 (8,0)	26 (34,6)	43 (57,4)	38 (25,4)	112 (74,6)
	Русские	93	4 (4,3)	21 (22,6)	68 (73,1)	29 (15,6)	157 (84,4)
Больные ОАП	В целом	302	23 (7,6)	88 (29,1)	191 (63,2)	134 (22,2)	470 (77,8)
	Татары	91	9 (9,8)	29 (31,7)	53 (58,5)	47 (25,8)	135 (74,2)
	Русские	113	12 (10,9)	27 (23,9)	74 (65,2)	51 (22,6)	175 (77,4)
	Башкиры	98	2 (2,0)	32 (32,7)	64 (65,3)	36 (18,4)	160 (81,6)
Контроль Республика Саха	В целом	140	18 (12,9)	65 (46,4)	57 (40,7)	101 (36,1)	179 (63,9)
	Якуты	93	16 (17,2)	43 (46,2)	34 (36,6)	75 (40,3)	111 (59,7)
	Эвенки	47	2 (4,3)	22 (46,8)	23 (48,9)	26 (27,7)	68 (72,3)
Больные алкоголизмом	В целом	140	20 (14,3)	79 (56,4)	41 (29,3)	119 (42,5)	161 (57,5)
	Якуты	106	17 (16,1)	61 (57,5)	28 (26,4)	95 (44,8)	117 (55,2)
	Эвенки	34	3 (8,8)	18 (52,9)	13 (38,2)	24 (35,3)	44 (64,7)
Черты темперамента	В целом	652	17 (2,6)	189 (29,0)	446 (68,4)	223 (17,1)	1081 (82,9)
Татары	Мужчины	158	3 (1,9)	53 (33,5)	102 (64,6)	59 (18,7)	257 (81,3)
	Женщины	261	10 (3,8)	69 (26,4)	182 (69,7)	89 (17,0)	433 (83,0)
Русские	Мужчины	64	0 (0)	19 (29,7)	45 (70,3)	19 (14,8)	109 (85,2)
	Женщины	169	4 (2,4)	48 (28,4)	117 (69,2)	56 (16,6)	282 (83,4)

кой принадлежности. Сравнительный анализ распределения частот аллелей VNTR локуса гена DRD4 обнаружил сходство в группе русских, татар, башкир с европейскими популяциями [3], якутов и эвенков – с жителями Восточной Азии (китайцами, японцами), в то время как все изученные этнические группы статистически значимо отличались от жителей Африки [20].

При анализе распределения частот генотипов и аллелей VNTR локуса гена DRD4 у здоровых индивидов статистически значимые различия были выявлены между индивидами русской, татарской, башкирской этнической принадлежности (для генотипов:  $X^2 = 12,45$ ;  $p = 0,014$ ;  $df = 4$ ; для аллелей:  $X^2 = 7,92$ ;  $p = 0,019$ ;  $df = 2$ ), в то время как между якутами и эвенками была отмечена лишь тенденция к существованию этнических различий (для генотипов:  $X^2 = 5,25$ ;  $p = 0,072$ ;  $df = 2$ ; для аллелей:  $X^2 = 3,81$ ;  $p = 0,051$ ;  $df = 1$ ). Результаты распределения частот аллелей и генотипов VNTR локуса в гене DRD4 у индивидов с зависимостью от ПАВ свидетельствуют о существовании статистически значимых различий в распределении частот аллелей данного локуса между татарами и русскими среди пациентов с опийной наркоманией ( $X^2 = 4,34$ ;  $p = 0,037$ ;  $df = 1$ ).

Последующий анализ, проведенный для индивидов каждой этнической принадлежности по отдельности, обнаружил, что маркером повышенного риска развития опийной наркомании у татар является аллель DRD4\*S ( $X^2 = 3,92$ ;  $p = 0,048$ ;  $df = 1$ ; OR = 1,76; 95%CI 1,00-3,09), имеющий частоту 25,8 и 16,2 % у больных и здоровых доноров

соответственно (таблица). В характере распределения частот генотипов и аллелей между группой больных опийной наркоманией и контролем у русских достоверные различия не обнаружены.

Анализ, проведенный с целью выявления маркеров риска развития алкоголизма у индивидов из Волго-Уральского региона и Республики Саха (Якутия), показал статистически значимые различия в распределении частот аллелей и генотипов VNTR локуса в гене DRD4 между больными алкоголизмом и здоровыми донорами как среди индивидов татарской (для генотипов:  $X^2 = 7,95$ ;  $p = 0,019$ ;  $df = 2$ , для аллелей:  $X^2 = 4,81$ ;  $p = 0,028$ ;  $df = 1$ ), так и русской этнической принадлежности (для генотипов:  $X^2 = 6,62$ ;  $p = 0,036$ ;  $df = 2$ , для аллелей:  $X^2 = 6,23$ ;  $p = 0,013$ ;  $df = 1$ ) (таблица). Таким образом, маркером риска развития алкоголизма у татар и русских являются генотип DRD4\*S/\*S (для татар: OR = 10,76, 95% CI 1,35-234,65; для русских: OR = 4,40, 95% CI 1,11-20,24) и аллель DRD4\*S (для татар: OR = 1,81; 95%CI 1,06-3,08; для русских: OR = 1,92; 95%CI 1,14-3,25). Поскольку 95% доверительный интервал для соотношения шансов (OR) для генотипа DRD4\*S/\*S у индивидов татарской этнической принадлежности является очень широким, что обусловлено малым числом наблюдений этого генотипа, выявленные результаты следует интерпретировать с осторожностью. В характере распределения частот генотипов и аллелей между группой больных алкоголизмом и контролем у якутов, эвенков, башкир статистически значимые различия не обнаружены.

Поскольку на первом этапе анализа не были выявлены статистически значимые этнические различия в распределении частот генотипов VNTR локуса в гене DRD4 между якутами и эвенками, нами был проведен сравнительный анализ распределения частот генотипов VNTR локуса между больными алкоголизмом и контрольной группой в объединенной выборке из Республики Саха (Якутия), в результате которого была отмечена тенденция к повышению частоты генотипа DRD4\*L/\*L у здоровых доноров по сравнению с больными алкоголизмом ( $X^2 = 3,53$ ;  $p = 0,060$ ;  $df = 1$ ). Для подтверждения полученной тенденции в дальнейшем необходимо увеличить объем выборки данных этнических групп.

Литературные данные свидетельствуют об ассоциации аллеля DRD4\*L VNTR локуса в 5'-UTR гена с ADHD [13, 22], в то время как результаты других авторов противоположны [3]. Ранее сообщалось об ассоциации гаплотипа, состоящего из VNTR локусов в 5'-UTR и экзоне 3, с метамфетаминной зависимостью в китайской популяции [2]. Существуют работы, указывающие на взаимосвязь наличия аллеля с 7 повторами в другом VNTR локусе, находящемся в 3 экзоне гена DRD4, с повышенным количеством приема алкоголя и никотиновой зависимостью [8, 14, 16], а также со сниженной тягой к алкоголю у лиц с алкогольной зависимостью [17]. Известно, что дефицит дофамина в подкрепляющих структурах мозга является основой остающегося патологического влечения к алкоголю и высокой вероятности рецидива заболевания [1]. Таким образом, полученные нами данные, выявившие, что риском развития алкоголизма и опийной наркомании являются аллель DRD4\*S и/или генотип DRD4\*S/\*S VNTR локуса в промоторном регионе гена у мужчин татарской и русской этнической принадлежности, согласуются с вышеуказанными [8, 14, 16], поскольку свидетельствуют в пользу гипотезы, указывающей на снижение количества дофамина в синапсе у лиц с аддиктивными расстройствами [1]. Однако Czerniak с соавторами [18], наоборот, отметили повышение уровня экспрессии гена DRD4 в лимфоцитах периферической крови (т.е. снижение дофаминергической активности) у индивидов с алкогольной и героиновой зависимостью. Эта противоречивость, возможно, обусловлена различным уровнем экспрессии гена DRD4 в отделах мозга и в периферической крови.

В результате проведения однофакторного дисперсионного анализа нами

была выявлена ассоциация аллеля *DRD4\*5 VNTR* маркера в гене *DRD4* с более высокими значениями по шкале «экстраверсия» (EPI) у мужчин татарской этнической принадлежности ( $P = 0,032$ ,  $F = 4,66$ ,  $df = 1$ ) и по шкале «настойчивость» (TCI) у мужчин русской этнической принадлежности ( $P = 0,022$ ,  $F = 5,52$ ,  $df = 1$ ). В частности, у носителей аллеля *DRD4\*5* и генотипа *DRD4\*L\*L* средние значения по шкале «экстраверсия» (EPI) составили  $14,16 \pm 3,8$  и  $12,82 \pm 3,67$  соответственно (мужчины татары); в то время как по шкале «настойчивость» (TCI) –  $3,25 \pm 1,25$  и  $2,47 \pm 1,24$  соответственно (русские мужчины). У женщин статистически значимых различий по средним значениям личностных черт у индивидов с различными генотипами *VNTR* маркера гена *DRD4* обнаружено не было.

Многочисленные исследования черт личности у индивидов с алкогольной зависимостью, характеризующейся ранним временем манифестации заболевания и более тяжелой стадией, выявили характерный для них профиль личности: высокий «поиск новизны» и «импульсивность», низкое «избегание ущерба», «зависимость от вознаграждения» и «настойчивость» [7]. Полученные нами у здоровых мужчин татарской этнической принадлежности результаты, свидетельствующие о повышении «экстраверсии» (черты личности, коррелирующей с «поиском новизны») у носителей аллеля *DRD4\*5*, согласуются с полученными данными для лиц с алкогольной и наркотической зависимостями той же этнической группы и подтверждают теорию Клонинджера [7], рассматривающую повышенный «поиск новизны» и «экстраверсию» в качестве промежуточных фенотипов, опосредующих развитие ранней алкогольной зависимости.

Несмотря на то, что была показана функциональная значимость полиморфного маркера (дубликации 120 п.н.) в 5'-UTR гена *DRD4* [3], число работ, вовлекающих исследование этого локуса в отношении личностных черт, единично. В частности, было показано повышение частоты генотипа *DRD4\*S\*S* у лиц с биполярными расстройствами и алкогольной зависимостью с повышенным «поиском новизны» [4], а также у индивидов с ADHD [3]. Проведенный недавно мета-анализ, включающий более 40 тысяч здоровых индивидов, обнаружил вовлеченность локуса -521C>T, находящегося, как и изученный *VNTR* локус, в промоторном регионе гена, в межиндивидуальные различия по таким шкалам как «поиск

новизны» и «импульсивность», что может составлять до 3% фенотипической вариации [5]. Таким образом, полученные нами данные, свидетельствующие об ассоциации аллеля *DRD4\*5* с повышенной «экстраверсией» у мужчин татарской этнической принадлежности, согласуются с вышеуказанными [3, 4].

Выявленные нами результаты свидетельствуют о том, что повышенная «экстраверсия» (у мужчин татар) и «настойчивость» (у русских мужчин) ассоциированы с более высокой экспрессией гена *DRD4* (т.е. с аллелем *DRD4\*5*), что согласуется с гипотезой Wang с коллегами [21] о том, что появление аллеля, приводящего к повышенной экспрессии гена *DRD4*, совпало с периодом обширной экспансии людей; при этом полагают, что чертами, характерными для переселенцев, являются повышенная «настойчивость» и «поиск новизны».

### Заключение

В результате проведенного исследования были выявлены маркеры повышенного риска развития алкогольной и наркотической зависимости у индивидов татарской и русской этнической принадлежности: генотип *DRD4\*S\*S* и/или аллель *DRD4\*5*. Кроме того, обнаруженное повышение «экстраверсии» у мужчин татар при наличии аллеля *DRD4\*5* подтверждает гипотезу Клонинджера о том, что черты, характеризующие социальность, являются промежуточными фенотипами при развитии аддиктивных зависимостей. Однако поскольку формирование изученных в данной работе мультифакториальных признаков находится под влиянием эпистатического взаимодействия как генетических, так и средовых факторов, необходимо проведение дальнейших исследований, изучающих взаимодействие нескольких генов, кодирующих белки, вовлеченные в метаболические пути дофаминергической системы.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского гуманитарного научного фонда (№ 08-06-00579а).

### Литература

1. Иванец Н.Н., Анохина И.П. Актуальные проблемы алкоголизма // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2004. – Т. 6. – № 3. – С. 100-105.
2. Association analysis of the *DRD4* and *COMT* genes in methamphetamine abuse / Li T. [et al.] // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. – 2004. – Vol. 129B (1). – P. 120–124.
3. Association between the 120-bp duplication of the dopamine D4 receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder: genetic and molecular analyses / Keresztesi E. [et al.] // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. – 2007. – Vol. 144B(2). – P. 231-236.

4. Association of a duplicated repeat polymorphism in the 5'-untranslated region of the *DRD4* gene with novelty seeking / Rogers G. [et al.] // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. – 2004. – V. 126B(1). – P. 95-98.
5. Association of the dopamine D4 receptor (*DRD4*) gene and approach-related personality traits: meta-analysis and new data / Munafò M.R., Yalcin B., Willis-Owen S.A., Flint J. // Biol. Psychiatry. – 2008. – V. 63(2). – P. 197-206.
6. Cloninger C.R., Svrakic D.M., Przybeck T.R. A psychological model of temperament and character // Arch. Gen. Psychiatry. – 1993. – V. 50. – P. 975-990.
7. Cloninger C.R., Svrakic N.M., Svrakic D.M. Role of personality self-organization in development of mental order and disorder // Dev. Psychopathol. – 1997. – V. 9. – P. 881-906.
8. Dopamine and opioid gene variants are associated with increased smoking reward and reinforcement owing to negative mood / Perkins K.A. [et al.] // Behav. Pharmacol. – 2008. – V. 19(5-6). – P. 641-649.
9. Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli / Dulawa S.C. [et al.] // J. Neurosci. – 1999. – V. 19(21). – P. 9550-9556.
10. Ebstein R.P. The molecular genetic architecture of human personality: beyond self-report questionnaires // Mol Psychiatry. – 2006. – V. 11(5). – P. 427-445.
11. EpiSTAtic effect of genes from the dopamine and serotonin systems on the temperament traits of novelty seeking and harm avoidance / Van Gestel S. [et al.] // Mol. Psychiatry. 2002. V. 7(5). P. 448-450.
12. Evidence for linkage of a tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (*DRD4*) with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) / McCracken J.T. [et al.] // Mol. Psychiatry. – 2000. – V. 5(5). – P. 531-536.
13. Functional effects of a tandem duplication polymorphism in the 5'flanking region of the *DRD4* gene / D'Souza U.M. [et al.] // Biol. Psychiatry. – 2004. – V. 56(9). – P. 691-697.
14. Interaction between the dopamine D4 receptor and the serotonin transporter promoter polymorphisms in alcohol and tobacco use among 15-year-olds / Skowronek M.H. [et al.] // Neurogenetics. – 2006. – V. 7(4). – P. 239-246.
15. Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine / Rubinstein M. [et al.] // Cell. – 1997. – V. 90(6). – P. 991-1001.
16. Novelty seeking involved in mediating the association between the dopamine D4 receptor gene exon III polymorphism and heavy drinking in male adolescents: results from a high-risk community sample / Laucht M., Becker K., Blomeyer D., Schmidt M.H. // Biol. Psychiatry. – 2007. – V. 61(1). – P. 87-92.
17. Polymorphisms of the dopamine D4 receptor gene (*DRD4 VNTR*) and cannabinoid CB1 receptor gene (*CNR1*) are not strongly related to cue-reactivity after alcohol exposure / Van den Wildenberg E. [et al.] // Addict. Biol. – 2007. – V. 12(2). – P. 210-220.
18. Reduced dopamine D4 receptor mRNA expression in lymphocytes of long-term abstinent alcohol and heroin addicts / Czernak C. [et al.] // Addiction. – 2004. – V. 99(2). – P. 251-257.
19. Roff D.A., Bentzen P. The STATistical analysis of mitochondrial DNA:  $\square 2$  and problem of small samples // Molecular Biology and Evolution. – 1989. – Vol. 6. – P. 539–545.
20. Tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (*DRD4*) / Seaman M.I. [et al.] // Am. J. Med. Genet. – 1999. – V. 88(6). – P. 705-709.
21. The genetic architecture of selection at the human dopamine receptor D4 (*DRD4*) gene locus / Wang E. [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2004. – V. 74(5). – P. 931-944.
22. Transmission disequilibrium testing of dopamine-related candidate gene polymorphisms in ADHD: confirmation of association of ADHD with *DRD4* and *DRD5* / Kustanovich V. [et al.] // Mol. Psychiatry. – 2004. – Vol. 9(7). – P. 711–717.

Н.В. Севостьянова, А.М. Некрасова, А.П. Кошель, А.И. Дмитриева,  
С.И. Мартов, С.С. Клоков, С.С. Ракитин

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ДНК И ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

УДК 575.174.015.3:578.264.2:579.254.2  
:616.33-006.6

**Цель исследования.** Изучение (оценка) соотношения патологического и нормального генотипов генов эксцизионной репарации ДНК *hOGG1*, *XPD1*, *XPG*, *XRCC1*, *XRCC2* и генов *GSTT1*, *GSTM1* у больных раком желудка.

**Материал и методы.** В работе обследовано 90 пациентов со злокачественными новообразованиями желудка. Злокачественные неоплазии были представлены в основном аденокарциномами различной степени дифференцировки (83,3%), перстневидноклеточным (7,4%) и недифференцированным раком (9,3 %) желудка. У пациентов со злокачественными новообразованиями при наличии показаний хирургическое лечение дополнялось химиотерапией либо лучевой терапией. Также были обследованы 231 практически здоровый житель г. Томска, сопоставимые по полу и возрасту. Они составляли основную контрольную группу.

Полученные результаты свидетельствуют о статистически значимом увеличении частоты мажорного аллеля гена *XRCC1 C194T*, *XPD1 A751C*. Носительство мажорного аллеля по этому полиморфизму увеличивает риск развития рака желудка. Следует отметить, что в группе больных раком желудка была обнаружена новая ассоциация А аллеля гена *XPD1 A751C* с риском развития этой патологии. Данная ассоциация ранее не была установлена в этой группе онкологических больных.

**Ключевые слова:** полиморфизм генов, репарация ДНК, рак желудка.

To study the correlation of pathological and normal genotypes of DNA *hOGG1*, *XPD1*, *XPG*, *XRCC1*, *XRCC2* excision repair genes and *GSTT1*, *GSTM1* genes in patients with gastric cancer.

**Material and methods:** The study included 90 patients with malignant neoplasms of the stomach. Malignant neoplasm's were represented, mainly, by adenocarcinomas of various differentiation degree (83,3%), signet ring cell carcinoma (7,4%) and non-differentiated carcinoma of the stomach (9,3%). Patients with malignant neoplasms in care of indications received surgical treatment plus chemo or radiotherapy. The main control group consisted of 231 practically healthy age and sex matched residents of Tomsk.

The results obtained are indicative of a statistically significant increase of the frequency of major allele of *XRCC1 c194T*, *XPD1 A751C* gene. Major allele carriage by this polymorphism increases risk for gastric cancer development. It should be noted that in the group of patients with carcinoma of the stomach a new association of A allele of *XPD1 A751C* gene has been revealed with a high risk for this pathology development. The given association in this group of oncologic patients was not established before.

**Keywords:** polymorphism of genes, DNA repair, gastric cancer.

### Актуальность

Рак желудка (РЖ) является четвертой по частоте формой злокачественных новообразований и занимает второе место в структуре общей летальности от злокачественных новообразований. Статистические данные объясняются поздним выявлением РЖ, когда основной метод радикального лечения этого заболевания, а именно хирургический, является малоэффективным. Совершенно очевидно, что для решения проблемы ранней диагностики рака желудка необходимы надежные и простые методы детекции опухолевого процесса, которые позволяли бы выявлять опухоль на доклинических стадиях [5,6]. Известно, что трансформация клеток в раковые и прогрессия онкологического процесса связаны с накоплением генетических и эпигенетических изменений в геноме [4, 9].

Апоптоз или его отдельные элементы выполняют важные физиологические функции, при этом преодоление апоптоза является необходимым условием успешного развития опухоли [3]. Один из механизмов, регулирующих эти процессы в опухоли, связан с системой ДНК репарации. В большом ряду протоонкогенов особое место занимают гены эксцизионной репарации ДНК (*hOGG1*, *XPD1*, *XPG*, *XRCC1*, *XRCC2*), которые способны к репарации повреждений в ДНК, возникающих в результате внешних (канцерогены, ксенобиотики, вирусы и др.) и внутренних (ошибки репликации) воздействий и удалению через апоптоз клеток, генетический аппарат которых не может быть восстановлен. Известен целый ряд мутаций, инактивирующих гены репарации. В то же время описаны распространенные полиморфизмы этих генов, возможно, влияющих на функцию их белковых продуктов, модулируя, но не устраняя полностью способность к репарации ДНК [13].

В последнее время широко проводятся исследования связи полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков (клеточной детоксикации) с риском развития некоторых патологических состояний, в том числе и злокачественных новообразований. Индивидуальная чувствительность к канцерогенным

воздействиям определяется двумя основными явлениями: многостадийным характером процесса канцерогенеза и генетическим полиморфизмом факторов, играющих ведущую роль на каждом его этапе. Благодаря работе ферментов биотрансформации ксенобиотиков происходит превращение токсичных для клетки продуктов в водорастворимые нетоксичные производные. Процесс биотрансформации ксенобиотиков включает в себя две последовательные стадии (фазы). Ферменты первой фазы связывают ксенобиотики с образованием мутагенных промежуточных метаболитов (таких, как супероксид-анион-радикал и ароматические углеводороды), которые под действием ферментов второй фазы превращаются в нетоксичные продукты и выводятся из организма. В настоящее время установлено, что ключевую роль во второй фазе биотрансформации ксенобиотиков играют глутатион-S-трансферазы (GST), которые широко экспрессируются в тканях млекопитающих. Эти ферменты катализируют присоединение глутатиона к электрофильному центру разнообразных химических соединений, что приводит к потере токсичности и образованию более гидрофильных продуктов, которые в дальнейшем могут быть метаболизованы и выведены из клетки. GST обладают также некото-

ГУ ВПО НИИ гастроэнтерологии СибГМУ им. Г.К. Жерлова: **СЕВОСТЬЯНОВА Наталья Владимировна** – д.м.н., проф., зам. директора по НИР, e-mail: sev\_nv@mail.ru; **КОШЕЛЬ Андрей Петрович** – д.м.н., проф., директор НИИ, e-mail: ark@mail.ru; **ДМИТРИЕВА Алла Ивановна** – к.м.н., с.н.с.; **КЛОКОВ Сергей Сергеевич** – к.м.н., зам. директора по клинической работе; **МАРТОВ Сергей Иванович**, **РАКИТИН Сергей Сергеевич** – аспиранты ГУ ВПО НИИ гастроэнтерологии СибГМУ; **НЕКРАСОВА Анна Михайловна** – к.м.н., врач-эксперт СК «АПРОСА».

рой пероксидазной активностью, благодаря чему играют важную роль во внутриклеточном связывании и транспорте большого числа как эндогенных, так и экзогенных соединений [1, 2].

**Цель** исследования – изучение (оценка) соотношения патологических и нормальных генотипов генов эксцизионной репарации ДНК *hOGG1*, *XPDI*, *XPG*, *XRCC1*, *XRCC2* и генов *GSTT1*, *GSTM1* у больных раком желудка.

#### Материал и методы исследования

В ходе работы было обследовано 90 пациентов со злокачественными новообразованиями желудка, а также 231 практически здоровый житель г. Томска в качестве основной контрольной группы. Исследование выполняли с разрешения Комитета по этике Сибирского государственного медицинского университета (заключение №583 от 19.03.2007 г.). Пациенты находились на стационарном лечении в НИИ гастроэнтерологии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (г. Северск) и Областном государственном учреждении здравоохранения «Томский областной онкологический диспансер» (г. Томск). Все пациенты получили хирургическое лечение, удаленные ткани забирались для гистологического исследования, которое проводилось в отделении патологической морфологии Томского областного онкологического диспансера и в отделении патологической морфологии МСЧ-81 (г. Северск).

Злокачественные неоплазии были представлены, в основном, аденокарциномами различной степени дифференцировки (83,3%), перстневидноклеточным (7,4%) и недифференцированным раком (9,3%) желудка. У пациентов со злокачественными новообразованиями, при наличии показаний, хирургическое лечение дополнялось химиотерапией либо лучевой терапией.

Выделение ДНК из образцов цельной крови проводили стандартным методом с использованием фенол-хлороформной очистки [10]. Обследованные индивиды были прогенотипированы по биаллельным полиморфизмам генов репарации ДНК (*hOGG1*, *XPDI*, *XPG*, *XRCC1*). Для типирования данных генных маркеров использованы рестрикционный анализ продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) по методикам, описанным в литературе [12, 14-16]. Образцы ДНК больных ЖКТ и здоровых доноров были протипированы также по полиморфизму генов биотрансформации: *GSTT1* и *GSTM1* (кодируют соответственно глутатион S-трансферазы  $\theta 1$  и  $\mu 1$ ). Типирование

образцов по генам *GSTT1* и *GSTM1* проводили путем мультиплексной ПЦР с использованием трех пар олигонуклеотидных праймеров, специфичных к участку гена рецептора эстрогенов, ER, (F: 5'-caa-gtc-tcc-cct-cac-tcc-cc; R: 5'-gtg-cga-gtg-gct-cag-tgt-gt) и генов *GSTT1* (F: 5'-ggg-cat-tct-gaa-ggc-caa-gg; R: 5'-ttt-gtg-gac-tgc-tga-gga-cg), и *GSTM1* (F: 5'-tgc-ttc-acg-tgt-tat-gga-ggt-tc; R: 5'-ggt-ggg-ctc-aaa-tat-acg-gtg-g). Смесь для амплификации объемом 12 мкл содержала 100-200 нг ДНК, 2,5 нМ каждого праймера, 1 мМ смесь четырех dNTP, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 ед./акт. Taq ДНК-полимеразы ("СибЭнзим", Новосибирск) и 10×буфер, поставляемый производителем вместе с ферментом. Программа амплификации включала 5 мин предварительной денатурации при 94°C, четыре цикла: 94°C - 20 с, 65°C - 25 с, 72°C - 20 с; четыре цикла: 94°C - 20 с, 63°C - 25 с, 72°C - 20 с; 25 циклов: 94°C - 20 с, 61°C - 25 с, 72°C - 20 с. Программу завершала элонгация при 72°C в течение 3 мин. Продукты амплификации фракционировали в 3%-ном агарозном геле с бромистым этидием в течение 30 мин при напряжении 130 В и визуализировали в УФ-свете. Гомозиготность по нулевому аллелю (0/0) генов *GSTT1* и *GSTM1* определяли по отсутствию на электрофореграммах фрагментов размером 131 и 114 п.н. соответственно. Наличие этих фрагментов свидетельствовало о присутствии по крайней мере одной нормальной (без делеции) копии генов (гомо- и гетерозиготы, +/+ и +/0), результатом которой следует ожидать полноценное функционирование глутатион S-трансферазы. Поэтому группы +/+ и 0/+ для расчетов объединили в группу (+) и противопоставляли ей гомозиготы 0/0. В качестве внутреннего кон-

троля использовали амплификацию фрагмента гена *ER* размером 181 п.н. [8].

Для расчетов использовали стандартные алгоритмы биометрии, в том числе сравнение частот генотипов в группах больных и здоровых лиц с помощью критерия хи-квадрат Пирсона. Относительный риск (OR) развития заболевания при определенном генотипе рассчитывался по стандартной формуле  $OR = a/b \times d/c$ , где a и b – количество больных, имеющих и не имеющих мутантный генотип соответственно, и d и c – количество человек в контрольной группе, имеющих и не имеющих мутантный генотип. OR указан с 95%-ным доверительным интервалом [11].

#### Результаты и их обсуждение

В проведенном исследовании были определены гены эксцизионной ДНК репарации (*hOGG1*, *XPDI*, *XPG*, *XRCC1*, *XRCC2*), которые способны к репарации повреждений в ДНК, возникающих в результате внешних и внутренних (ошибки репликации) воздействий и удалению через апоптоз клеток, генетический аппарат которых не может быть восстановлен. Репарационный потенциал каждого индивида в большой степени связан с полиморфизмом этих генов.

Таблица 1

Распределение генотипов и аллелей генов эксцизионной репарации (*hOGG1*, *XPDI*, *XPG*, *XRCC1*, *XRCC2*) у больных раком желудка и здоровых лиц

Гистологические формы	Генотипы			Аллели		P <sub>2</sub> ош
	CC	CT	TT	C	T	
Рак ЖКТ <i>XRCC1</i> C194T n=90	46(83,7)	2(3,6)	7(12,7)	94	16	0,0019 3,03(1,46-6,34)
P <sub>1</sub>	0,0393	0,7855	0,0442			
<i>XRCC1</i> G280A n=90	48(88,9)	5(9,3)	1(1,9)	101	7	0,2566 1,77(0,71-4,56)
P <sub>1</sub>	0,3164	0,4331	0,8870			
<i>XRCC1</i> A399G n=90	10(18,5)	25(46,3)	19(35,2)	45	63	0,4218 1,24(0,77-1,99)
P <sub>1</sub>	0,9534	0,3727	0,3163			
<i>XPDI</i> A751 n=90	28(51,9)	21(38,9)	5(9,3)	77	31	0,0260 (1,07-2,92)
P <sub>1</sub>	0,0508	0,3953	0,1780			
<i>hOGG1</i> C326G n=90	35(66,0)	18(34,0)	0	88	18	0,4333 1,36(0,69-2,71)
P <sub>1</sub>	0,4760	0,6491	0,6974			
<i>XPG</i> G1104C n=90	37(69,8)	16(30,2)	0	90	16	0,1927 1,55(0,82-2,96)
P <sub>1</sub>	0,6284	0,7933	0,0719			

Примечание. P<sub>1</sub> - достоверность отличий для генотипов; P<sub>2</sub> - достоверность отличий для аллелей.

Таблица 2

Распределение генотипов и аллелей гена *CYP1A1* у больных раком желудка и у здоровых лиц

Группы обследованных	Генотип			P <sub>1</sub>	Аллели		P <sub>2</sub>
	Иле/Иле	Иле/Вал	Вал/Вал		Иле	Вал	
Здоровые, n=231	218 (94,4%)	13 (5,6%)	0	0,000 X <sup>2</sup> =24,3	449 (97,2%)	13 (2,8%)	0,000 X <sup>2</sup> =22,45
Больные раком желудка, n=90	68 (75,6%)	21 (23,3%)	1 (1,1%)		157 (87,2%)	23 (12,8%)	

Примечание. p<sub>1</sub> - уровень статистической значимости различий частот генотипов между группами больных раком желудка и здоровыми донорами, p<sub>2</sub> - уровень статистической значимости различий аллелей между группами больных раком желудка и здоровыми донорами.

Таблица 3

Частота функционально полноценных и неполноценных генотипов *GSTT1* и *GSTM1* у больных раком желудка и здоровых доноров

Ген	Генотип	Здоровые, n=231	Больные раком желудка, n=90	X <sup>2</sup> , P	OR(CI <sub>95%</sub> )
<i>GSTT1</i>	+	189 (81,8%)	80 (88,9%)	X <sup>2</sup> = 2,72 p=0,099	
	0/0	42(18,2%)	10(11,1%)		
<i>GSTM1</i>	+	138 (59,7%)	42 (46,7%)	X <sup>2</sup> = 3,98 p=0,046	OR= 1,70 CW <sub>0</sub> 1,01-2,85

Не было выявлено ассоциации аллелей и генотипов со злокачественными новообразованиями желудка для следующих полиморфизмов исследуемых нами генов репарации: *XRCC1 Arg399Gln*, *XPG Asp1104His* (табл. 1). Для рака желудка было установлено достоверное увеличение частоты гомозигот по мажорному аллелю гена *XRCC1 C194T* и снижение частоты гомозигот по минорному аллелю. Носительство мажорного аллеля С по этому полиморфизму увеличивает риск развития рака желудка (p=0,0019 ОШ(ДИ,95%)-3,03(1,46-6,34)).

Показано также увеличение риска возникновения рака ЖКТ у носителей мажорного аллеля А гена *XPD1 A751C* (p=0,0260 ОШ(ДИ,95%)- 1,76(1,07-2,92)). Следует отметить, что в группе больных раком желудка была обнаружена новая ассоциация А аллеля гена *XPD1 A751C* с риском развития этой патологии. Данная ассоциация ранее не была установлена в этой группе больных.

Следующая группа генов предрасположенности к развитию рака желудка это гены биотрансформации ксенобиотиков. Исследование Иле/Вал-полиморфизма гена первой фазы биотрансформации ксенобиотиков цитохрома Р-450 *CYP1A1* (замена аминокислоты изолейцина (Иле) на валин (Вал) в 462-кодоне молекулы цитохрома Р-450 в гем-связывающей области фермента, которая приводит к повышению активности фермента) было проведено у 90 больных раком желудка и 231 здорового донора (табл. 2).

Частота гетерозигот (Иле/Вал) в группе больных раком желудка статистически значимо превышала соот-

ветствующую величину в контрольной группе (23,3 и 5,6%), соответственно при p=0,000. В группе больных раком желудка был выявлен 1 носитель генотипа Вал/Вал (1,1%). Частота Вал-аллеля у больных раком желудка (12,8%) достоверно превышала аналогичный показатель в группе здоровых доноров, где она составила 2,8%. Полученные результаты несколько превышают по частоте Вал-аллеля показатели, полученные Ляховичем В.В. и соавт. (1997) для больных раком желудка (7,1%). Отношение разниц (OR), отражающее степень риска развития рака желудка для носителей Вал-аллеля равно 5,06 (CI<sub>95%</sub> 2,39-10,85). При анализе частоты генотипов генов ферментов второй фазы биотрансформации ксенобиотиков у больных раком желудка (n=90) в качестве группы сравнения была использована выборка здоровых жителей г. Томска (n=231). Результаты анализа генотипов глутатионтрансферазы *GSTT1* и *GSTM1* у больных раком желудка и контрольной группы представлены в табл.3.

Частота носителей гомозигот по делеционному аллелю гена *GSTT1 (0/0)* в группе больных раком желудка оказалась ниже, чем в контрольной группе (11,1 и 18,2% соответственно).

Частота 0/0-генотипа глутатион-8-трансферазы M1 в группе больных раком желудка составила 53,3%, что статистически отличается от показателя в контрольной группе (40,3%) (p=0,046). Риск развития рака желудка у здоровых носителей 0/0-генотипа *GSTM1* составляет 1,70 (CI<sub>95%</sub> 1,01-2,85).

В целом полученные нами результаты исследования полиморфизма генов

ферментов биотрансформации ксенобиотиков у больных раком желудка свидетельствуют о том, что свойства факторов риска для рака желудка проявляют: патологические генотипы *CYP1A*, *GSTT1* и *GSTM1*, и гены эксцизионной репарации ДНК *XRCC1 C194T*, *XPD1 A751*. Помимо свойства факторов предрасположенности к раку желудка патологические аллели и генотипы исследованных нами генов, по-видимому, играют патогенетическую роль в становлении клинических признаков данного злокачественного процесса. Степень риска возникновения рака желудка и развития его клинических особенностей, связанная с изученными генами, зависит также и от распределения комбинации генотипов.

### Литература

1. Анализ полиморфных аллелей генов, кодирующих ферменты 1-й и 2-й фазы детоксикации, у больных эндометриозом / Т.Э. Иващенко [и др.] // Генетика. – 2003. – Т. 39, № 4. – с. 525 – 529.
2. Геном человека и гены «предрасположенности». (Введение в предиктивную медицину.) / В.С. Баранов [и др.]. - СПб.: Интермедика, 2000. 272с.
3. Геномная медицина и новые подходы к диагностике и лечению онкозаболеваний / В.В. Ляхович [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2004. - №2(112) – с.20-26.
4. Георгиев Г.П. Молекулярно-генетические механизмы прогрессии опухолей / Г.П. Георгиев // Соросовский образовательный журнал (биология). – 2000. - № 11. – с. 17 – 22.
5. Давыдов М.И. Рак легкого / М.И. Давыдов, Б.Е. Полоцкий. – М.: Медицина, 1994. – 187 с.
6. Долл Р. Причины рака / Р. Долл, Р. Пито. - Киев: Наукова думка, 1984. - 254 с.
7. Заридзе Д.Г. Эпидемиология и этиология злокачественных новообразований / Д.Г. Заридзе // Канцерогены / Под ред. Д.Г. Заридзе. – М.: Научный мир, 2000. – С. 21 – 25.
8. Изучение полиморфизма генов *GSTT1* и *GSTM1* у больных раком легких / Дмитриева А.И. [и др.] // Бюллетень СО РАМН – 2004 - №1 – с.60-62.
9. Имянитов Е.Н. Молекулярная генетика опухоли человека / Е.Н.Имянитов, В.П. Калиновский, П.Г. Князев // Вопросы онкологии. – 1997. – т.43, №2. – С. 95 - 101.
10. К вопросу о генетических и эпигенетических факторах риска рака легкого/ Чердынцева Н.В. [и др.] // Молекулярная медицина – 2005 – №3 – с.49-54.
11. Флейс Дж. Статистические методы для изучения таблиц долей и пропорций / Дж. Флейс. М.: Финансы и статистика, 1989. – 319 с.
12. Association of the hOGG1 Ser326Cys PolymorphHism with Lung Cancer Risk1 / L. Le Marchand [et al.] // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2002. – V.11. – P. 409-412.
13. Benhamou S., Sarasin A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review // Mutat. Res. – 2000. – V.462. – P. 149-158.
14. Influence of polymorphHism in the genes for the interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1β on tuberculosis / R.J. Wilkinson [et al.]// J. Exp. Med. 1999. V. 189. P. 1863-1873.
15. Novoradovsky A. Endothelial nitric oxide synthase as a potential susceptibility gene in the pathogenesis of emphysema in α1-antitrypsin deficiency / A. Novoradovsky, M.L. Brantly, M.A. Waclawiw // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1999. V. 20 (3). P. 441-447.
16. PolymorphHisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer / Sanyal S. [et al.] // Carcinogenesis. 2004. V.25. P.729-734.

С.И. Семенов, Н.Н. Павлов, В.Г. Кривошапкин, С.Н. Кузин,  
М.И. Терехова, И.К. Зверьева, А.А. Кожевников, Л.Е. Кузина,  
Н.Н. Забелин, Е.И. Самохвалов

## ГЕНОТИПЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА В И СУБТИПЫ HBsAg В ЯКУТИИ

УДК 578.891(571.56)

**Цель исследования.** Изучение структуры генотипов вируса В и определение гетерогенности PreS1/PreS2/S-генов на территории Якутии.

**Методы и материалы.** Изучено 16 изолятов, выделенных у больных хроническим гепатитом В из Усть-Алданского района, методом «гнездовой» ПЦР.

**Результаты.** Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей показал наличие трех генотипов вируса В – А (44%), С (12%) и D (44%). Проведена амплификация фрагментов генома вируса В соответствующим PreS1/PreS2/S генам методом «гнездовой» ПЦР в сыворотках крови, положительных на ДНК вируса. Анализ нуклеотидных последовательностей изученных изолятов по локализации замен и делеций в том или ином участке PreS1/PreS2/S генов позволил выявить значительное количество замен. Выявлено значительное генетическое многообразие вирусов гепатита В, особенно изолятов, принадлежащих к генотипам ВГВ А и D. Обнаружены аминокислотные замены, обуславливающие способность ВГВ к «диагностическому» ускользанию.

**Вывод.** Обнаружены 3 варианта генотипа вируса В: А, С и D и выявлено генетическое многообразие изолятов генотипа А и D.

**Ключевые слова:** вирусный гепатит В, вирус В, генотипы А, С, субгенотипы вируса В, HBsAg.

**The purpose of research.** Studying of structure of virus B genotypes and definition of PreS1/PreS2/S-genes heterogeneity in territory of Yakutia.

**Methods and materials.** 16 isolates, allocated in patients with chronic hepatitis B from Ust-Aldanskij region by “nested” PCR method, are studied.

**Results.** The phylogenetic analysis of nucleotide sequences has shown presence of three genotypes of a virus B - A (44 %), C (12%) and D (44%). Amplification of virus B genome fragments, corresponding PreS1/PreS2/S-genes by «nested» PCR method in blood serums, positive on DNA virus, is lead. The analysis of nucleotide sequences of studied isolates on localization of replacements and deletions in *PreS1/PreS2/S* genes has allowed revealing of a significant amount of replacements. The significant genetic variety of viruses of hepatitis B, especially isolates, belonging to VHB A and D genotypes is revealed. Aminoacid replacements causing VHB ability to “diagnostic” escaping are found out.

**Conclusion.** 3 variants of virus B genotype are found out: A, C and D and genetic variety of genotype A and D is revealed.

**Keywords:** virus hepatitis B, a virus B, genotypes, virus B subgenotypes, HBsAg.

### Введение

Вирус гепатита В (ВГВ) – один из самых изменчивых ДНК-содержащих вирусов, что обусловлено сложным циклом репликации, включающим этап обратной транскрипции РНК-прегенама [8]. В настоящее время в мире ведется активный поиск мутантных штаммов ВГВ, то есть таких вариантов вируса, которые отличаются по нуклеотидным последовательностям ДНК от прототипных штаммов. Актуальность таких исследований продик-

тована тем, что в результате действия различных селективных факторов в популяции появляются и закрепляются штаммы ВГВ, называемые ускользающими. Первыми сообщили об обнаружении мутанта ВГВ, способного ускользать от вакцин-индуцированного ответа, W.F.Carman et al. [9]. По мнению В.Weber [10], обобщившего результаты многих исследователей, особую важность имеет обнаружение мутантов ВГВ, сформировавшихся и закрепившихся в популяции под давлением внешних факторов отбора, таких как вакцинопрофилактика, а также лечение интерферонами и противовирусными препаратами. В результате выполненных исследований уже описаны многочисленные варианты мутаций во всех генах ВГВ. В Западной Европе и США мутантные штаммы ВГВ выявлены, главным образом, у пациентов после трансплантации печени и у инфицированных детей, рожденных от HBeAg - позитивных матерей, несмотря на вакцинацию [5]. Сегодня уже опубликованы данные о наличии большого количества мутаций в S-гене ВГВ, причем три из них (G145R, K141E и T131I) существенно нарушают антигенную структуру HBsAg, что влияет на диагностические возможности иммуноферментных тест-систем [4].

Исследования по данной проблеме в России единичны и касаются, главным образом, определения серотипов HBsAg и генотипов ВГВ. И.Г.Нетесова с соавт. [1] показали, что у пациентов с

хроническим гепатитом В в Центральном ФО РФ наиболее часто выявляется субтип HBsAg ayw2 (57%). Кроме того, в рамках этого исследования обнаружены также субтипы HBsAg ayw3var A и B, adw2.

Наиболее интересны, с нашей точки зрения, такие исследования в регионах с высоким уровнем распространенности ВГВ и наличием других факторов (многонациональное население, активная миграция и др.), влияющих на эпидемический процесс, к числу которых можно отнести Республику Саха (Якутия).

**Цель** данной работы - изучение доли вируса гепатита В в общей картине заболеваемости парентеральными вирусными гепатитами, структуры генотипов ВГВ у пациентов с хронической HB-вирусной инфекцией и определение гетерогенности PreS1/PreS2/S-генов у естественно встречающихся вариантов ВГВ на территории Республики Саха (Якутия).

### Материалы и методы

С целью оценки широты распространения маркеров гепатита В в Якутии проведено скрининговое обследование малочисленных народностей арктической части республики, титульной нации-якутов и лиц славянской национальности в Центральной Якутии, лиц, проживающих в экологически неблагоприятной, так называемой вилюйской группе районов. Исследования проведены посредством ИФА

**СЕМЕНОВ Сергей Иннокентьевич** – д.м.н., зав. группой генетич. исследований ФГНУ «Институт здоровья», insemenov@yandex.ru; **ПАВЛОВ Николай Николаевич** – к.м.н., директор ОАО «Центр иммунопрофилактики», vaks@sakha.ru; **КРИВОШАПКИН Вадим Григорьевич** – д.м.н., проф., директор ФГНУ «Институт здоровья»; **КУЗИН Станислав Николаевич** – д.м.н., проф., зав. лаб. ФГУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, Москва; **ТЕРЕХОВА Валерьяна Валерьевна** – врач-инфекционист Республ. Центра по профилактике и борьбе со СПИД, terekhova\_mv@mail.ru; **ЗВЕРЬЕВА Ирина Константиновна** – д.м.н., н.с. НИИ вакцин и сывороток; **КОЖЕВНИКОВ Анатолий Александрович** – к.м.н., гл. врач Республ. Центра по профилактике и борьбе со СПИД; **КУЗИНА Любовь Егоровна** – к.м.н., с.н.с. НИИ вакцин и сывороток, drkuzin@mail.ru; **ЗАБЕЛИН Никита Николаевич** – аспирант НИИ вакцин и сывороток; **САМОХВАЛОВ Евгений Иванович** – к.б.н., вед.н.с. НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН.

с использованием тест-системы АО «Вектор» (Новосибирск) и подтверждением положительных результатов на импортных тест-системах «HbsAg UniForm» (Organon Teknika) в лаборатории хронических вирусных инфекций ФГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН г. Москвы. В разных регионах Якутии на наличие в сыворотке крови HbsAg обследованы 16517 чел., на а-НВс-суммарные – 661 и 130 чел. на наличие в сыворотке крови HbeAg.

Материалом для выделения ДНК вируса ГВ служила сыворотка крови пациентов с хроническим гепатитом В. Образцы сыворотки крови хранились при  $-20^{\circ}\text{C}$  до момента исследования. Вирусную ДНК выделяли с помощью набора для выделения ДНК/РНК из сыворотки или плазмы крови производства ООО НПФ «Литех», г. Москва (Россия), согласно инструкции производителя. Детекцию вирусной ДНК ГВ проводили методом «гнездовой» ПЦР в сыворотках крови, положительных на HBsAg или на anti-HBc, с помощью двух пар праймеров: S1-1, S1-2; S2-1, S2-2 [2].

Генотипирование и изучение гетерогенности 16 изолятов ВГВ проводили с использованием участка PreS1/PreS2/S-генов. С этой целью проведена амплификация фрагментов генома HBV соответствующим PreS1/PreS2/S генам методом «гнездовой» ПЦР в сыворотках крови, положительных на ДНК ВГВ. Выбор данной области для изучения генетических свойств выделенных изолятов был продиктован тем, что на этом участке расположены структурные гены вируса, анализ которых является наиболее информативным в филогенетических исследованиях, и тем, что эти гены кодируют оболочечные белки вируса, изменения в которых влияют на детекцию HBsAg с помощью иммуноферментных тест систем. Для получения ПЦР-фрагментов, соответствующих PreS1/PreS2/S генам, на матрице ДНК каждого изолята был амплифицирован участок длиной 1562 н.о. с праймерами 2805F (2805-2827) и 1208R (1208-1192) – 1 раунд и 2817F (2817-2836) и 1197R (1197-1174) - 2 раунд (позиции праймеров указаны для изолята AJ344117). Используемые при этом праймеры были разработаны нами с помощью пакета программ DNASTAR V 5.00 (Lasergene, Inc., США) по выровненным нуклеотидным последовательностям различных изолятов вируса гепатита В, опубликованных в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank. Секвенирование фрагментов было проведено с использованием прай-

меров – 2817F, 323R (323-303) и 242F (242-264) и набора Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, согласно инструкции производителя на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems, США), что позволило получить информацию о нуклеотидной последовательности участка генома размером около 1143 н.о. Нуклеотидные последовательности анализировали методом Clustal W с помощью программы «Megaling» (DNASTar V 5.00, Lasergen Inc., США).

Среди жителей арктической части республики HBsAg обнаружен в среднем в 8% случаев, с колебаниями от 7 до 14% в отдельных районах. До 14 лет этот показатель составил 4,2%, 15-19 лет – 21,6, старше 20 лет – 14,5%. Обращает на себя внимание относительная неоднородность в частоте выявления HBsAg в разных районах центральной зоны Якутии (2,1%-9%). От 4,7 до 9,2% случаев выявлен HBsAg у исследуемых из разных районов вилюйской группы.

Обследовано население мест компактного проживания малочисленных народностей (эвены, эвенки), якутов и русских (в отдаленных от центра селах проживания с традиционным укладом жизни). При этом в сыворотке крови HBsAg выделен у малочисленных народностей в 8,6% случаев, у якутов – в 9,2, у русских – 3,1%. Таким образом, отмечены различия в частоте обнаружения маркера гепатита В среди этнических групп региона, причем среди эвенков и якутов значительно часто встречается HBsAg, чем среди русско-го населения.

Для более широкой оценки широты распространения вируса гепатита В определены другие маркеры вируса гепатита В – HbeAg и а-НВс-суммарные в различных группах населения из разных зон Якутии. Так, среди населения а-НВс-суммарные выявлены в 48,4% случаев, причем в 25% случаев – они единственный маркер предыдущей встречи организма с вирусным гепатитом В. Среди детей до 14 лет этот мар-

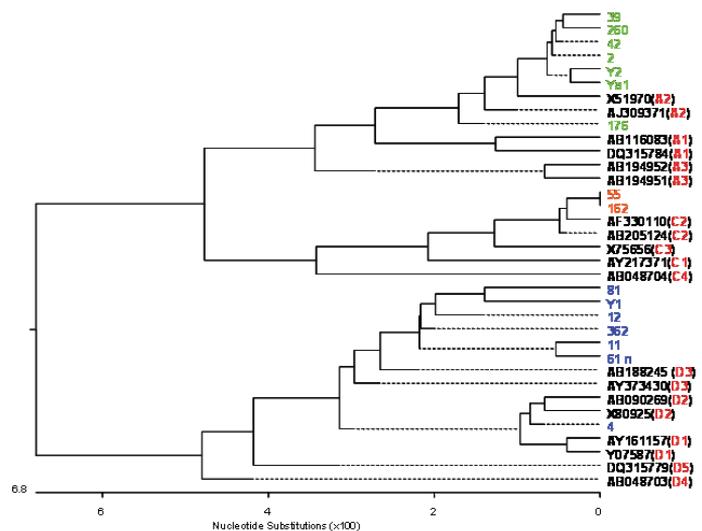
кер обнаруживается в 29,4% случаев, подростков – в 63,6, молодых людей 20-39 лет – в 57,6, людей старше 40 лет – в 59% случаев. Таким образом, больше половины обследованного населения встречались с вирусом гепатита В, больше того, 2/3 из них страдает хроническим гепатитом В.

Определение HbeAg в сыворотке крови у «носителей» HbsAg имеет важное диагностическое значение для определения активности процесса в печени, т.к. он относится к группе маркеров активной репликации вируса гепатита В и может свидетельствовать о наличии ДНК вируса. В наших исследованиях настораживает то, что среди школьников в возрасте 7-17 лет с наличием в сыворотке крови HBsAg у 34,7% встречается HbeAg, также высокий процент обнаружения этого антигена у взрослых (28,4%).

### Результаты и обсуждение

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей 16 штаммов, выделенных у хронически инфицированных лиц в Республике Саха (Якутия), показал наличие трех генотипов ВГВ. Генотипы D и A обнаружены в 7 случаях каждый (по 44%), генотип С – в 2 изолятах (12%). Кроме того, в этой группе были идентифицированы субгенотипы каждого изолята. Из 7 образцов, принадлежащих генотипу ВГВ D, в 6 определен субгенотип D3 (86%) и в 1 – D2 (14%). В случаях принадлежности ВГВ к генотипам А и С – определены только субгенотипы А2 и С2 (рисунком).

Анализ нуклеотидных последовательностей изученных изолятов по локализации замен и делеций в том



Субгенотиповая принадлежность исследуемых изолятов ВГВ, выделенных у пациентов с хронической HBV-вирусной инфекцией в Республике Саха (Якутия). Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей PreS1/PreS2/S генов (2874-835 н.о.) различных изолятов ВГВ.

Таблица 1

Нуклеотидные замены в участках PreS1/PreS2/S генов ВГВ у изолятов, принадлежащих к генотипу D, выделенных в Республике Саха (Якутия)

№№ штаммов	Замены в 5' конце преS1		Замены			
	в сайте, кодирующем вход вируса в клетку	в преS2/S промоторе	В 5' конце пре-S2-гена	В 5' конце S-гена	В MHR S-гена	В 3' конце S-гена
Субгенотип D2						
4		T3102C C3111T		C289T C357T	T472C T507C	
Субгенотип D3						
11	C2928T T2934C	C3067A A3151C	C16T C111A T150G	C373T	T592C	
12	T2934C A2965T	T3037C T3129G A3151C G3168A	T1C C4A C16T A43G C111A	T176C G241A C373T T393C		C732T C767A T770C A771T T814A
61п	T2934C C2967T	G3024A C3067A G3123A A3151C A3154G	T1C C14A C16T C111A	C373T C400A		A773C T780C
81	T2934C	G3010A T3013C C3067A T3115A A3151C A3154G	T1C C16T T52C делеция 53-55 C111A G148A	T176C C373T		C732T C762G T791A
362	T2934C	A3072C T3076G A3151C	T1C C16T C111A	C373T		
Y1	T2934C	C3018T C3067A T3076C A3120G C3132A A3144T A3151C A3154G	T1C C16T A43G T52C C55T C111A T113A G148T C154T	T195C T198C A201T T213C C373T	A456G A482C	C732T G748A G750T G765A A771G G774A C786T C795A T825C A828C

или ином участке PreS1/PreS2/S генов позволил выявить значительное количество замен. В табл.1 приведены замены, выявленные в изолятах, принадлежащих к генотипу D.

Следует отметить, что изолят №4 относится к субгенотипу D2 и серотипу ауw3, тогда как остальные изоляты этой группы принадлежат субгенотипу D3 и серотипу ауw2. Изолят 4, относящийся к субгенотипу D2, в сравнении с изолятами данного субгенотипа (AB090269; AB090270; AB078032; AB078033; AB090268; X72702; X80925) имел шесть нуклеотидных замен. Нуклеотидные последовательности изолятов субгенотипа D3 были сравнены с одиннадцатью изолятами данного субгенотипа, взятыми из GenBank (AB188245; AY373430; DQ315777; AY233296; AY902776; DQ315776; X85254; AY902777; AY233295; AY233291; AJ344117), в результате констатировано, что эти изоляты имели от 8 (изолят

№362) до 35 (изолят Y1) замен. Из приведенных данных видно, что среди изолятов генотипа D большинство замен группируется в пре-S2/S промоторной области, 5'-конце пре-S2 и в 3'-конце S-гена. В табл.2 приведены замены, обнаруженные в изолятах, принадлежащих к генотипам А и С. Нуклеотидные последовательности штаммов генотипа А (субгенотип А2) были сравнены с десятью изолятами данного субгенотипа, взятыми из GenBank (AJ309371; AJ344115; AY152726; M54923; X02763; X70185; Z35717; Z72478; S50225; X51970). В результате констатировано отсутствие замен у изолята №2. В изоляте №39 выявлено 8 замен, №42 - 2, №176 - 7 замен и 1 трехнуклеотидная делеция, №Y2 - 9 замен, №260 - 6 и №Ya1 - 3 замены. Обращает на себя внимание тот факт, что у изолятов генотипа А, по сравнению с генотипом D, замен выявлено существенно меньше и их большая часть сосредоточена в 5'-конце S-гена и участке, соответствующем главному гидрофильному региону (MHR).

Нуклеотидные последовательности изолятов субгенотипа С2 (№55 и 162) оказались идентичными друг другу. Их

Таблица 2

Нуклеотидные замены в участках PreS1/PreS2/S генов ВГВ у изолятов, принадлежащих к генотипам А и С, выделенных в Республике Саха (Якутия)

№№ штаммов	Замены в 5' конце преS1		Замены			
	Замены в сайте, кодирующем вход вируса в клетку	Замены в преS2/S промоторе	в 5' конце пре-S2-гена	в 5' конце S-гена	в MHR S-гена	в 3' конце S-гена
Генотип А, субгенотип А2						
2				T195G		
39				T287G T380C C433A	A514T G553A T580A	T784G
Y2	C2925T C2952T C2964T		G3177A C17A G20A	C354A	A514T	T705C
42				T176C	A514T	
176			делеция 53-55 C150A	T357C G375C	T505C T565C A636T	T784G
260	C2874T	A3066G		T177C A233G C354A A355G	A514T	T784G
Ya1	C2952T					
Генотип С, субгенотип С2						
55 и 162	C2871A	T3162C	C23T A85G T109A A115C T123C C135T	G162A		T705C A753T

сравнение проводили с 15 изолятами субгенотипа С2, взятыми из GenBank (AB074755; AB205123; AB205124; AF068756; AF223960; AF330110; AF473543; AY217376; AF223955; AB074756; AB014360; AB042282; AY641558; D50520; X75665). Изоляты №55 и 162 имели по 11 нуклеотидных замен относительно референтных изолятов. У изолятов генотипа С замены были локализованы, преимущественно, в 5'-конце пре-S2 и в 3'-конце S-гена.

В табл.2 приведены замены, обнаруженные в изолятах, принадлежащих к генотипам А и С. Нуклеотидные последовательности штаммов генотипа А (субгенотип А2) были сравнены с десятью изолятами данного субгенотипа, взятыми из GenBank (AJ309371; AJ344115; AY152726; M54923; X02763; X70185; Z35717; Z72478; S50225; X51970). В результате констатировано отсутствие замен у изолята №2. В изоляте №39 выявлено 8 замен, №42 - 2, №176 - 7 замен и 1 трехнуклеотидная делеция, №Y2 - 9 замен, №260 - 6 и №Ya1 - 3 замены. Обращает на себя внимание тот факт, что у изолятов генотипа А, по сравнению с генотипом D, замен выявлено существенно меньше и их большая часть сосредоточена в 5'-конце S-гена и участке, соответствующем главному гидрофильному региону (MHR).

Нуклеотидные последовательности изолятов субгенотипа С2 (№55 и 162) оказались идентичными друг другу. Их

сравнение проводили с 15 изолятами субгенотипа С2, взятыми из GenBank (AB074755; AB205123; AB205124; AF068756; AF223960; AF330110; AF473543; AY217376; AF223955; AB074756; AB014360; AB042282; AY641558; D50520; X75665). Изоляты №55 и 162 имели по 11 нуклеотидных замен относительно референтных изолятов. У изолятов генотипа С замены были локализованы, преимущественно, в 5'-конце пре-S2 и в 3'-конце S-гена. Обращает на себя внимание отсутствие замен в главном гидрофильном регионе S-гена.

Идентичность изолятов на участке генома ВГВ, который был изучен, по нашему мнению, может быть связана с тем, что эти изоляты были выделены у инфицированных лиц, проживающих в одном и том же селе Усть-Алданского района Республики Саха (Якутия). Представляется возможным считать у этих пациентов наличие общего источника инфекции. Такой подход, по нашему мнению, может быть использован как элемент эпидемиологического анализа при установлении источника инфекции.

Проведенный анализ нуклеотидных замен позволил констатировать, что наибольший удельный вес замен имел место у штаммов ВГВ генотипа D – 111 замен на 7 образцов (15,86 замен на 1 образец). У штаммов, принадлежа-

Таблица 3

**Аминокислотные замены в пре-S1/пре-S2/S белках  
у изолятов вируса гепатита В, выделенных в Республике Саха (Якутия)**

Ге-но-тип	Штамм	Замены					Всего замен
		в N'конце пре-S1	в N'конце пре-S2	в N'конце S-гена	в MHR S-гена	в С' конце S-гена	
D	4			T68I	V118A		53
	11	L74I	P41H L54R				
	12	T40S	P41H	F8L; F80S		S193L; L205M; Y206L; F220L	
	61п	L74I N103D	H9N P41H			S207R L209S	
	81	G55S; F56L; L74I; S90T; N103D	22-делеция P41H	F8L		S193L; P203R; L213I	
	362	Q75H; L77V	P41H				
	Y1	L74I N103D	P41H L42I	V14A; L15S; Q16L; F20S	Q101R; I110L	S193L; M198I; W199L; S204N; Y206C; S207N; P211L; P214Q; V224A; Y225S	
A	2						22
	39			V14G; S45A; C76R; F93L	M133I	S210R	
	42			F8L			
	176		22-делеция; T54K	I68T; W74S		Y161F; S210R	
	Y2		Q10K; A11T	P67Q		V184A	
	260	I84M		F8S; T27A		S210R	
	Ya1			P67Q			
C	55 и 162		I45T; T49I	S3N		V184A; Y200F	5

Примечание. Разными цветами указаны повторяющиеся замены.

щих к генотипу А, выявлено значительно меньше замен – 36 на 7 образцов (5, 14). У двух штаммов ВГВ генотипа С обнаружено по 11 одинаковых замен.

Сравнение полученных аминокислотных последовательностей (табл.3) с референтными штаммами из GenBank в пределах одного генотипа показало, что 111 нуклеотидных замен приводили к 53 аминокислотным заменам у изолятов генотипа D (48%), 36 нуклеотидных замен у генотипа А – к 22 аминокислотным заменам (61%) и у изолятов генотипа С 22 нуклеотидные замены приводили к 5 аминокислотным (22%).

Из выявленных аминокислотных замен следует выделить замену T40S (12), расположенную в участке, взаимодействующем с клеточным рецептором, N103D (61п, 81, Y1) – в матричном домене L белка, участвующем в морфогенезе вирионов. В области цитозольной петли S белка (33-80aa), которая, как полагают [6], участвует в сборке и секреции вирионов и пустых

субвирусных частиц, обнаружены следующие замены – T68I (4); F80S (12); S45A, C76R (39); I68T, W74S (176); P67Q (Y2, Ya1).

В главном гидрофильном регионе (MHR) S белка были выявлены следующие замены – V118A (4); Q101R, I110L (Y1) и M133I (39). Из них замены - Q101R и I110L ранее выявлялись из сывороток крови с негативным тестом на HBsAg [9], а замена M133I была описана в случае получения расходящихся результатов детекции HBsAg разными ИФА-тест-системами [3].

В С-концевом участке S белка обнаружены замены, описанные в комбинации с другими заменами при отрицательном тесте на HBsAg [7], среди них – S207R (61п); P203R (81); M198I, Y206C, S207N (Y1); V184A (Y2, 55, 162).

### Выводы

В Республике Саха (Якутия) имеет место выраженное эпидемиологическое неблагополучие в отношении гепатита В, о чем свидетельствует широта

распространения и неравномерность выявления маркеров гепатита В (HBsAg). Выявлена неравномерность встречаемости HBsAg в различных климато-географических зонах республики: в арктической части территории зарегистрированы наиболее высокие показатели - от 7 до 14% (преимущественно представлены малочисленными народностями), в центральной и вилюйской группах районов - от 2,1 до 9 и от 4,7 до 9,2% случаев соответственно.

Также показано, что на территории Якутии в структуре циркулирующих генотипов ВГВ обнаружены три варианта – А (44%), С (12%) и D (44%). Выявлено значительное генетическое многообразие вирусов гепатита В, особенно изолятов, принадлежащих к генотипам ВГВ А и D. Обнаружены аминокислотные замены, обуславливающие способность ВГВ к «диагностическому» ускользанию.

### Литература

1. Субтипы HBsAg в образцах крови доноров Центрального федерального округа (ЦФО) России / И.Г.Нетесова [и др.] // «Вирусный гепатит В – диагностика, лечение и профилактика (к 40-летию открытия HBsAg)». – Москва, 2004. – С.128-129.
2. Correlation between anti-HBc titers and HBV DNA in blood units without detectable HBsAg / H. Okamoto [et al.] // Vox. Sang. - 1992. - 63. - 107-111.
3. Echevarria J.M. Hepatitis B virus genetic diversity / J.M. Echevarria, A. Avellon // J. Med. Virol. - 2006. - 78. - S36-S42.
4. Effect of variation in the common a' determinant on the antigenicity of hepatitis B surface antigen.// S.Seddigh-Tonekaboni [et al.] // J. Med. Virol. - 2000. - V.60. - P.113-121.
5. Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals // B.Weber [et al.] J. Med. Virol. - 2001. - 64. - 312-319.
6. Hepatitis B virus is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins / H. Loffler-Mary [et al.] // J. Virol. - 2000. - 270. - 358-367.
7. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum / K.M. Weinberger [et al.] // J. General Virol. - 2000. - 81. - 1165-1174.
8. Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. / K.Yamamoto [et al.] // J. Virol. - 1994. - V.68. - p.2671-2676.
9. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus / W.F.Carman [et al.] // Lancet. - 1990. - V.336. - P.325-329.
10. Weber B. The diagnostic and clinical impact of the genetic variability of the S (surface) gene of hepatitis B virus / B. Weber // J. Lab. Med. - 2004. - V.28. - №1. - P.56-69.

Д.С. Ожегова, М.Б. Фрейдин, И.А. Гончарова, В.П. Пузырев  
**УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА  
 IFNG, STAT1 И MCP1 В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ  
 АНТИГЕННОЙ НАГРУЗКИ**

УДК 575.191:616-002.5:616.981.49

Приведены результаты сравнения уровня экспрессии генов *IFNG*, *STAT1*, *MCP1* в культурах мононуклеарных клеток при воздействии стимуляторов различной природы: PHA (фитогемагглютинин), TDM (трехалозе 6,6'-димиколат, корд-фактор *Mycobacterium tuberculosis*), LPS (липополисахарид *Salmonella enterica* serotype enteritidis), IFN- $\gamma$  (интерферон- $\gamma$ ), IL-4 (интерлейкин-4) и их комбинации. Показано, что TDM мало влияет на экспрессию генов иммунного ответа, но в комбинации с IFN- $\gamma$  может усиливать их экспрессию. Повышение уровня экспрессии генов *IFNG*, *STAT1* и *MCP1* отмечено во всех клеточных культурах, стимулированных LPS, IL-4 и их сочетанием.

**Ключевые слова:** экспрессия генов, клеточные культуры, гены иммунного ответа.

In this review, we compared *IFNG*, *STAT1* and *MCP1* expression levels in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated by PHA (phytohemagglutinin), TDM (trehalose 6,6'-dicolate, cord-factor from *Mycobacterium tuberculosis*), LPS (lipopolysaccharide from *Salmonella enterica* serotype enteritidis), IFN- $\gamma$  (interferon gamma), IL-4 (interleukin 4) and their combination. It was shown that inductor TDM had insignificant influence on expression level of innate immunity genes, but the combination TDM and IFN- $\gamma$  increased their expression. Increased gene expression level of *IFNG*, *STAT1*, *MCP1* expression levels were also detected in PBMC exposed with LPS, IL-4 and their combination.

**Keywords:** gene expression, cell cultures, innate immunity genes.

**Сокращения:**

ген *IFNG* (IFG, IFI) – ген интерферон гамма, MIM: 147570

ген *STAT1* (ISGF-3, *STAT91*) – ген сигнального белка – трансдуктора и активатора транскрипции, MIM: 600555

ген *MCP1* (CCL2) – ген моноцитарного хемотаксического протеина, MIM: 158105

стимулятор PHA – фитогемагглютинин  
 стимулятор TDM – трехалозе 6,6'-димиколат, корд-фактор *Mycobacterium tuberculosis*

стимулятор LPS – липополисахарид *Salmonella enterica* serotype enteritidis  
 стимулятор IFN- $\gamma$  – интерферон- $\gamma$   
 стимулятор IL-4 – интерлейкин-4

**Введение**

Одной из проблем современной медицины является изучение этапов возникновения и развития иммунопатологического процесса при инфицировании различного рода бактериями. Для более полного понимания механизмов формирования иммунного ответа требуется изучение функционирования генов, определяющих развитие защитных реакций при внедрении патогена. В связи с этим вызывает интерес исследование экспрессии генов регуляторных молекул, обеспечивающих критические этапы развития иммунного ответа: распознавание патогена, проведение внутриклеточного активационного сигнала, синтез цито-

кинов в условиях воздействия бактериальных компонентов на клетки иммунной системы человека [9].

Компоненты микробной клеточной стенки являются потенциальными стимуляторами экспрессии цитокинов макрофагами, моноцитами, нейтрофилами и другими клетками [3]. Но известно, что по крайней мере два компонента *M. tuberculosis* – 19-кДа липопротеин и пептидогликан клеточной стенки (содержащийся в микопарабиногалактан пептидовом комплексе) – ингибируют ответ макрофагов на IFN- $\gamma$  на транскрипционном уровне. В настоящее время получены противоречивые данные относительно TDM. С одной стороны, для этого компонента микобактериальной клеточной стенки показано, что он индуцирует формирование грануломы и продукцию провоспалительных цитокинов *in vivo* и *in vitro* [9], однако, по данным Perez et al. [10], изменений в уровнях экспрессии гена *IFNG* при действии TDM не обнаружено. Поэтому одна из задач проведенного исследования состояла в изучении действия TDM и LPS на экспрессию генов иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток крови.

Основным активатором макрофагов, клеток, выполняющих главную защитную роль против внутриклеточных инфекций, является IFN- $\gamma$ , который регулирует экспрессию более 500 генов, играет значительную интегративную роль в координации иммунного ответа на множество сигналов от разных типов клеток [4]. Дефект синтеза IFN- $\gamma$ , нарушения во внутриклеточной передаче сигнала, посредством ассоциированной с IFN- $\gamma$  молекулы *STAT1* (Signal transducer and activator of transcription) вызывают иммунологические дефекты, повышающие риск развития хронических бактериальных инфекций [6].

Установлено, что *M. tuberculosis* может блокировать эффекты IFN- $\gamma$  путем нарушения транслокации гомодимера *STAT1* в ядро, где он инициирует экспрессию IFN- $\gamma$ -индуцированных генов провоспалительных цитокинов (*TNF- $\alpha$* , IL-12 и др.). Еще одним важнейшим фактором иммунитета против внутриклеточных бактерий является *MCP-1* (моноцитарный хемотаксический протеин), участвующий в дифференцировке Т-клеток, созревании моноцитов, а также в привлечении Т-хелперных клеток, NK-клеток, базофилов и моноцитов в очаг воспаления.

Учитывая эти обстоятельства, для исследования выбраны гены *IFNG*, *STAT1* и *MCP1*.

**Целью** исследования явилась оценка уровня экспрессии генов иммунного ответа *IFNG*, *STAT1* и *MCP1* в краткосрочных культурах мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров в условиях различной антигенной нагрузки: PHA, TDM, LPS, IFN- $\gamma$ , IL-4 и их комбинации.

**Материалы и методы**

Материалом для исследования служила венозная кровь 98 здоровых жителей г. Томска русской национальности. Уровень экспрессии исследуемых генов в культурах периферических мононуклеарных клеток с индукторами и в не стимулированных культурах определен у 14 здоровых доноров.

Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли путем центрифугирования гепаринизированной венозной крови при 2000 оборотов/мин в течение 30 мин. Клетки, собранные из интерфазы, помещали в культуральные матрасики со средой RPMI-1640 (в количестве 6 мл среды на 1 мл супернатанта), с 1% эмбриональной телячьей сывороткой, глутамином и

**ОЖЕГОВА Диана Сергеевна** – врач-биохимик, аспирант ГУ “Сибирский гос. мед. ун-т Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию”, [diana2005\\_83@mail.ru](mailto:diana2005_83@mail.ru); НИИ медицинской генетики СО РАМН: **ФРЕЙДИН Максим Борисович** – к.б.н., с.н.с., email: [mfreidin@well.ox.ac.uk](mailto:mfreidin@well.ox.ac.uk); **ГОНЧАРОВА Ирина Александровна** – к.б.н., н.с.; **ПУЗЫРЕВ Валерий Павлович** – акад. РАМН, проф., директор НИИ.

аминокислотами. Клетки инкубировали при 37°C в течение 12-16 часов. По истечении этого срока в культуры добавляли стимуляторы (Sigma): PHA (10 мкг/мл), TDM (100 нг/мл), LPS (100 нг/мл), IFN- $\gamma$  (100 нг/мл), IL-4 (20 нг/мл), и их комбинации TDM+IL-4 (120 нг/мл), TDM+IFN- $\gamma$  (200 нг/мл), LPS+IL-4 (120 нг/мл), LPS+IFN- $\gamma$  (200 нг/мл). Для контроля использовали не стимулированные клетки. Время экспозиции клеточных культур с индукторами составило 1 ч для культур с LPS и 3 ч для остальных культур. Измерение концентрации клеток в клеточной суспензии проводили с помощью гематологического анализатора «Micros 60», фирмы ABX Diagnostics.

Выделение суммарной мРНК проводили с использованием набора TRI-Reagent (Mrcgene). Концентрацию мРНК определяли путем измерения оптической плотности на спектрофотометре Nanodrop. Стандартизацию концентрации мРНК проводили на этапе получения кДНК (10 нг/мкл). Реакцию обратной транскрипции проводили в объеме 40 мкл, с использованием обратной транскриптазы фирмы Medigen (Новосибирск). Для количественной оценки экспрессии мРНК в культуре клеток использовали метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (RT-PCR). Для RT-PCR использовали наборы праймеров и TaqMan-зондов фирмы Sintol (Новосибирск). Реакцию проводили в амплификаторе с оптической насадкой iCycler iQ (BIORAD Lab, USA).

Для количественного определения уровня экспрессии исследуемых генов использовали сравнительный Ct метод (Applied Biosystem). Уровень экспрессии специфических генов сначала калибровали относительно экспрессии гена домашнего хозяйства GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), затем уровень экспрессии специфических генов в стимулированных клеточных культурах нормализовали относительно соответствующих показателей для не стимулированных культур (контроль). Все результаты представлены как n-кратные различия между уровнем экспрессии специфического гена в стимулированных и не стимулированных культурах.

Статистическая обработка данных проведена с расчетом среднего арифметического значения n-кратных различий между уровнем экспрессии специфического гена в стимулированных и не стимулированных культурах и ошибки среднего для каждой группы с

использованием программы STATistica for Windows 6.0. (STATSoft, USA). Статистическую значимость различий показателей уровня экспрессии между исследуемыми группами определяли с использованием непараметрического критерия Вилкоксона.

### Результаты и обсуждения

В культурах мононуклеарных клеток человека, стимулированных PHA, TDM, LPS, IFN- $\gamma$ , IL-4 и их комбинациями (TDM+IL-4, TDM+IFN- $\gamma$ , LPS+IL-4, LPS+IFN- $\gamma$ ) изучена экспрессия генов *IFNG*, *STAT1* и *MCP1*.

При стимуляции культур мононуклеарных клеток крови микробными продуктами TDM и LPS, индукторами иммунного ответа IFN- $\gamma$  и IL-4, а также комбинациями LPS+IFN- $\gamma$  и TDM+IFN- $\gamma$  отмечено повышение уровня экспрессии гена *IFNG* по сравнению с контролем (рис.1). Стимуляция TDM и IFN- $\gamma$  приводила к повышению уровня экспрессии гена *IFNG* на 23 и 42%, соответственно, а при введении в культуру сочетания TDM+IFN- $\gamma$  отмечено повышение уровня экспрессии исследуемого гена на 54% по сравнению с контролем. Уровень экспрессии гена *IFNG* при стимуляции LPS, IL-4 или сочетанием LPS+IFN- $\gamma$  повышался в два и более раза по сравнению с не стимулированной культурой (рис.1). Показаны статистически значимые различия в изменении уровня экспрессии гена *IFNG* при введении TDM, IFN- $\gamma$  и TDM+IFN- $\gamma$  по сравнению с культурами, стимулированными LPS, IL-4 и комбинацией LPS+IFN- $\gamma$ . При стимуляции LPS уровень экспрессии исследуемого гена по сравнению с контролем достигал значения  $2,34 \pm 1,54$  и статистически значимо отличался от более низких значений для культур, стимулированных TDM ( $1,23 \pm 1,09$ ,  $p < 0,004$ ) и IFN- $\gamma$  ( $1,42 \pm 1,07$ ,  $p < 0,05$ ).

Уровень экспрессии гена *IFNG* в культурах, стимулированных IL-4, повышался в  $2,42 \pm 1,46$  раза по отношению к

не стимулированной культуре, что значительно выше изменения уровня экспрессии в культуре, индуцированной TDM ( $p < 0,003$ ), IFN- $\gamma$  ( $p < 0,02$ ) и комбинации TDM+ IFN- $\gamma$  ( $1,54 \pm 1,18$ ,  $p < 0,02$ ). Также отмечены статистически значимые отличия ( $p < 0,006$ ) в уровне экспрессии гена *IFNG* между культурами, индуцированными TDM ( $1,23 \pm 1,09$ ) и комбинацией LPS+IFN- $\gamma$  ( $2,19 \pm 1,52$ ).

Таким образом, наиболее выраженное повышение экспрессии гена *IFNG* наблюдали при стимуляции бактериальным продуктом LPS, индуктором иммунного ответа IL-4 и комбинацией LPS+IFN- $\gamma$ . По данным литературы [1], уровень экспрессии гена *IFNG* при стимуляции культур клеток PHA и PPD (purified protein derivative antigen, микобактериальный антиген) у здоровых людей выше по сравнению с экспрессией этого гена в не стимулированных клеточных культурах. В проведенном исследовании также отмечен повышенный уровень экспрессии гена *IFNG* в стимулированных культурах относительно спонтанного уровня. По данным Lang et al. [7], в культуре не стимулированных мононуклеарных клеток экспрессия гена *IFNG* не обнаруживалась или детектировалась очень слабо. После стимуляции LPS уровень экспрессии гена *IFNG* повышался, но не существенно. Стимуляция PHA, напротив, приводила к индукции экспрессии гена *IFNG*. В нашем исследовании, неспецифический индуктор PHA повышал уровень экспрессии гена

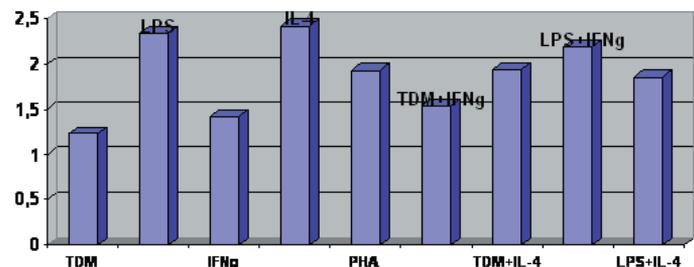


Рис. 1. Уровень экспрессии гена *IFNg* при стимуляции TDM, LPS, IFNg, IL-4, PHA, TDM+IFNg, TDM+IL-4, LPS+IFNg, LPS+IL-4. В рис.1-3 за единицу принят базальный уровень экспрессии исследуемого гена при отсутствии стимуляции

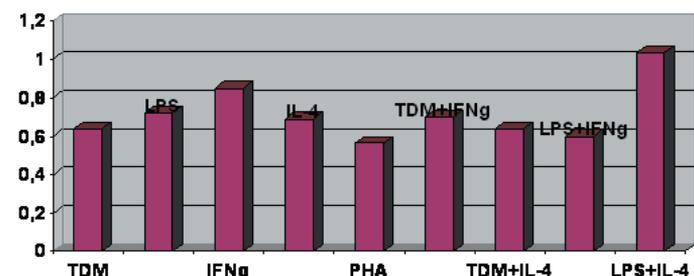


Рис. 2. Уровень экспрессии гена *STAT1* при стимуляции TDM, LPS, IFNg, IL-4, PHA, TDM+IFNg, TDM+IL-4, LPS+IFNg, LPS+IL-4

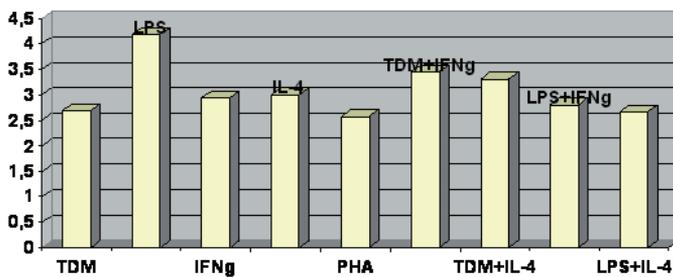


Рис. 3. Уровень экспрессии гена MCP-1 при стимуляции TDM, LPS, IFN $\gamma$ , IL-4, PHA, TDM+IFN $\gamma$ , TDM+IL-4, LPS+IFN $\gamma$ , LPS+IL-4

IFN $\gamma$  в меньшей степени, чем LPS или LPS+IFN $\gamma$ .

Активирующее действие LPS на провоспалительные цитокины, в том числе на ген IFN $\gamma$ , можно объяснить наличием ARE (adenosine-uridine-rich element) – элемента в пределах 3'-UTR мРНК, который играет значительную роль в осуществлении посттранскрипционных механизмов проведения сигнала LPS. LPS-сигнал стабилизирует мРНК, блокируя ее деградацию, что ведет к быстрому накоплению соответствующего белкового продукта [5].

При стимуляции PHA и сочетаниями TDM+IL-4 и LPS+IFN $\gamma$  отмечено снижение уровня экспрессии гена STAT1 в среднем на 40% по сравнению с уровнем экспрессии в не стимулированной культуре (рис. 2). Воздействие на клеточную культуру комбинации LPS+IL-4 способствовало повышению уровня экспрессии гена ядерного фактора STAT1 до значений не отличимых от уровня экспрессии контроля. Показаны статистически значимые различия в изменении уровня экспрессии исследуемого гена между культурами стимулированными PHA ( $0,56 \pm 0,29$ ,  $p < 0,02$ ), TDM+IL-4 ( $0,64 \pm 0,47$ ,  $p < 0,03$ ), LPS+IFN $\gamma$  ( $0,60 \pm 0,46$ ,  $p < 0,04$ ) и культурой, стимулированной комбинацией LPS+IL-4 ( $1,03 \pm 0,64$ ). Анализ экспрессии генов с помощью микрочиповой технологии показал, что примерно 40% IFN $\gamma$ -индуцируемых генов уменьшают свою экспрессию, если клетки инфицированы живыми *M. tuberculosis* или клеточная культура обработана 19-кДа липопро-теином *M. tuberculosis* [11]. Кроме того, многие IFN $\gamma$ -зависимые гены, вовлеченные в контроль развития микобактериальной инфекции, могут быть, как индуцированы, так и супрессированы совместным воздействием продуктов деятельности *M. tuberculosis* и IFN $\gamma$ . В нашей работе отмечено ингибиру-

ющее действие супрессорами SOCS1 или SOCS3 [12]. Инкубация макрофагов с LPS индуцирует SOCS3 через Toll-like рецепторы 2 и 4. Возможно, ингибирующее действие LPS на экспрессию гена STAT1 имеет подобный механизм.

При анализе уровней экспрессии гена MCP1 в исследуемых группах выявлена тенденция к увеличению экспрессии в клеточных культурах, стимулированных LPS, в  $4,18 \pm 2,69$  раза по сравнению с контролем (рис. 3). Кроме того, наблюдались достоверные отличия в уровнях экспрессии в культурах, стимулированных LPS, по сравнению с культурами индуцированными LPS+IL-4 ( $2,67 \pm 2,57$ ,  $p < 0,01$ ) и LPS+IFN $\gamma$  ( $2,81 \pm 2,49$ ,  $p < 0,04$ ). Стимуляция IL-4, TDM+IFN $\gamma$  и TDM+IL-4 повышала уровень экспрессии гена MCP1 в клеточных культурах в три и более раза по сравнению с не стимулированной культурой (рис. 3). Стимулирующее влияние IL-4 на продукцию MCP1 показано в работе по регуляции функций эндотелиальных клеток цитокинами: оценка изменения уровня секреции MCP-1 эндотелиальными клетками E.A.hy926 под влиянием IFN $\gamma$ , IL-4, а также их комбинацией через 24 часа после отмывки от цитокинов показала, что только IL-4 оказывал стимулирующее влияние на секрецию MCP-1 этими клетками [2]. Таким образом, LPS может быть применим для изучения экспрессии гена MCP1, так как из всех опробованных стимуляторов он позволял получить наибольший уровень экспрессии этого гена.

Следовательно, LPS – компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий, индуцирует экспрессию генов иммунного ответа в культурах мононуклеарных клеток крови здоровых доноров. Стимулятор TDM в меньшей степени влияет на экспрессию изучаемых генов, но в комбинации с IFN $\gamma$

он может усиливать их экспрессию. Повышение уровня экспрессии генов IFN $\gamma$ , STAT1 и MCP1 наблюдалось во всех клеточных культурах стимулированных LPS, IL-4 или их сочетанием. Выявлено негативное влияние неспецифического митогена PHA и индукторов микробной природы в сочетании с цитокинами TDM+IL-4 и LPS+IFN $\gamma$  на экспрессию гена STAT1. Для генов IFN $\gamma$  и MCP1 наиболее эффективным стимуляторами экспрессии являются LPS и его комбинации с IFN $\gamma$  и IL-4.

## Литература

1. Пичугина Л.В., Пинегин Б.В.. Применение метода оценки экспрессии мРНК IFN $\gamma$  и комплекса методов для поэтапной оценки пути IFN $\gamma$  и его продукции у больных с микобактериальными инфекциями // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2003. – том 7, №9. – С.159-166
2. Фрейдлин И.С., Старикова Э.А.. Регуляция функций эндотелиальных клеток цитокинами // Сборник по материалам Всероссийского симпозиума «Биология клетки в культуре». – С.808
3. Biswas R., Shyamasree D.. Regulation of Chemokine mRNA Stability by Lipopolysaccharide and IL-10 // The Journal of Immunology. – 2003. – Vol. 170. – P.6202-6208
4. Brewington R.. IFN $\gamma$ -Independent Autocrine Cytokine Regulatory Mechanism in Reprogramming of Macrophage Responses to Bacterial Lipopolysaccharide // The Journal of Immunology. – 2001. – Vol. 167. – P.392-398
5. Grutz G.. New insight into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression // Journal of Leukocyte Biology. – 2005. – Vol. 77. – P.3-15
6. Kincaid E.. Mycobacterium tuberculosis Exerts Gene-Selective Inhibition of Transcriptional Responses to IFN $\gamma$  without Inhibiting STAT1 Function // The Journal of Immunology. – 2003. – Vol. 171. – P.2042-2049
7. Lang R., Heeg K.. Semiquantitative determination of human cytokine mRNA expression using TagMan RT-PCR // Inflammopharmacology. – 1998. – Vol. 6. – P.297-309
8. Lopez-Maderuelo D., Arnalich F.. Interferon- $\gamma$  and Interleukin-10 Gene Polymorphisms in Pulmonary Tuberculosis // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2003. – Vol. 167. – P.970-975
9. Ottenhoff T. H. M., van Crevel R.. Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis // Clinical Microbiology Reviews. – 2002. – Vol. 15, No 2. – P.294-309
10. Perez R.L., Roman J., Roser S.. Cytokine Message and Protein Expression During Lung Granuloma Formation and Resolution Induced by the Mycobacterial Cord Factor Trehalose-6,6'-Dimycolate // Journal of Interferon & Cytokine Research. – 2000. – Vol. 20, No. 9. – P.795-804
11. Schnappinger D., Ehrt S.. Expression profiling of host pathogen interactions: how mycobacterium tuberculosis and the macrophage adapt to one another // Microbes and Infection. – 2006. – Vol. 20. – P.1-9
12. Qiao Y.. Posttranscriptional Inhibition of Gene Expression by Mycobacterium tuberculosis Offsets Transcriptional Synergism with IFN $\gamma$  and Posttranscriptional Up-Regulation by IFN $\gamma$  // The Journal of Immunology. – 2003. – Vol. 171. – P.2042-2049.

И.В. Салтыкова, М.Б. Фрейдин, Е.Ю. Брагина, Л.М. Огородова,  
В.П. Пузырев

## ВОВЛЕЧЕННОСТЬ ГЕНОВ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ ЦИТОКИНОВ В ПАТОГЕНЕЗ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И ОПИСТОРХОЗА

УДК 575.191:616-002.5:616.981.49

**Цель исследования.** Анализ связи полиморфизма генов сигнальных молекул цитокинов с бронхиальной астмой и описторхозом.

**Материалы и методы.** Методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов генотипированы однонуклеотидные замены шести генов: *TBX21*, *STAT2*, *STAT4*, *SOCS7*, *PIAS4*, *PIAS3* у больных бронхиальной астмой (БА), описторхозом и их сочетанием.

**Результаты.** Показана ассоциация полиморфного варианта rs12756687 гена *PIAS3* с функцией внешнего дыхания у больных БА; установлена связь полиморфизма rs2066807 гена *STAT4* с БА, сочетающейся с описторхозом; продемонстрирована ассоциация полиморфизма rs3890580 гена *SOCS7* с уровнем IgE у больных описторхозом, но не у больных БА.

**Заключение.** Полученные данные могут стать основой для более углубленного изучения предрасположенности к гельминтной инвазии и модифицирующего влияния описторхоза на течение БА.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, описторхоз, полиморфизм, JAK-STAT-система.

**Aim.** Analysis of relationship between the gene polymorphisms of cytokine signal molecules with bronchial asthma and opisthorchiasis.

**Materials and methods.** Polymorphisms of *TBX21*, *STAT2*, *STAT4*, *SOCS7*, *PIAS4*, *PIAS3* were analysed by PCR-RELF genotyping in the patients with bronchial asthma (BA), opisthorchiasis and their combination.

**Results.** Association between the polymorphism rs12756687 *PIAS3* with function of lung among the patients with BA was shown, evidence of association was observed between the polymorphism rs2066807 *STAT4* and BA combined with opisthorchiasis, association of the polymorphism rs3890580 *SOCS7* with IgE level of the patients with opisthorchiasis but not with BA.

**Conclusion.** These data can serve a basis for further study of susceptibility to helminth infection and modifying effect of opisthorchiasis on BA course.

**Keywords:** asthma, opisthorchiasis, polymorphism, JAK-STAT-system.

### Введение

Вопрос о «взаимоотношении» аллергических заболеваний и гельминтозов активно обсуждается в научной литературе. Гельминтозы и аллергические заболевания протекают со сходными клиническими проявлениями: повышение концентрации общего IgE в крови пациентов, эозинофилия и поляризация иммунного ответа по Th2-типу, характеризуются сходным цитокиновым профилем [6].

Бронхиальная астма (БА) является мультифакторным заболеванием, в развитии которого существенную роль играет наследственная компонента и факторы окружающей среды. Несмотря на то, что информация о вкладе различных генов в патогенез заболевания достаточно противоречива, существует ряд маркеров, роль которых доказана в развитии БА и атопии во многих работах с использованием разных дизайнов исследования. К ним относятся гены *IL-4*, *IL-13*, *IL-10*, *TNFA*, *IL4RA* и гены *HLA*. Параллельно накапливается все больше информации

о генетической предрасположенности к инфекционным заболеваниям. В частности, получены доказательства важности генетической составляющей в развитии гельминтозов [8]. Выявлены локусы и гены предрасположенности к аскаридозу, шистосомозу, филяриозу. Результаты этих исследований позволяют предположить наличие общих генетических основ реализации клинических фенотипов при аллергических заболеваниях и гельминтозах. Так, выявлены локусы предрасположенности к аскаридозу 13q32-q34 [5], шистосомозу 5q31-q33, которые являются общим и для аллергических заболеваний.

В контексте изучения общих генов предрасположенности аллергических заболеваний и гельминтозов интересными для исследования представляются гены молекул внутриклеточной цепи передачи сигнала в связи с их вовлеченностью в ключевые реакции иммунитета. В Сибирском регионе распространенным гельминтозом является описторхоз, вызываемый *Opisthorchis felinus* [1]. Роль генетических факторов в развитии описторхоза не ясна, поэтому описторхоз является привлекательным в качестве модели гельминтоза. Дизайн исследования предполагал формирование группы изолированной БА, больных описторхозом и группы больных с сочетанием этих заболеваний.

### Материал и методы исследования

Обследовано 86 больных БА (23 мужчины, 63 женщины, средний возраст составил 38,0+12,1 лет), 104 боль-

ных описторхозом (25 мужчины, 79 женщин, средний возраст – 37,0+13,1 лет), 49 больных БА на фоне описторхоза (8 мужчин, 41 женщина, средний возраст – 43,0+12,3 лет) и 120 здоровых индивидов (21 мужчина, 103 женщины, средний возраст – 32,0+11,25 лет). Все обследованные – русские в возрасте от 18 до 60 лет, проживающие на территории г. Томска. У всех пациентов проведено исследование функции внешнего дыхания; оценивали показатели FEV1%, PEF1%, FVC%, проведены кожные аллергопробы, определен уровень IgE. Диагноз БА ставили согласно международным стандартам GINA (2006). Критериями включения были: положительные аллергопробы с одним и более аэроаллергенами, документированные сведения об обратимости обструкции более чем на 15% при проведении пробы с метахолином. Наличие подтвержденной ранее атопии (отягощенный семейный атопический анамнез, уровень IgE сыворотки >100 МЕ/мл).

Критерием включения в исследование больных описторхозом было обнаружение яиц описторхисов в фекалиях и/или дуоденальном содержимом. Также для диагностики описторхоза была использована ПЦР-тест – система, разработанная на базе Сибирского государственного медицинского университета. У больных описторхозом оценивали следующие клинические признаки: наличие лихорадки, диспепсического, интоксикационного, болевого синдромов, уровень общего IgE.

**САЛТЫКОВА Ирина Владимировна** – врач-биохимик, аспирант Сибирского гос. мед. ун-та, Ira.saltikova@mail.ru; **ФРЕЙДИН Максим Борисович** – к.б.н., с.н.с. НИИ МГ СО РАМН, факс: 8(3822) 51-37-44; **БРАГИНА Елена Юрьевна** – к.б.н., н.с. НИИ МГ СО РАМН, e-mail: bragina@ssmu.ru; **ОГОРДОВА Людмила Михайловна** – д.м.н., проф., ректор СибГМУ; **ПУЗЫРЕВ Валерий Павлович** – д.м.н., директор НИИ МГ СО РАМН.

Таблица 1

Локализация исследуемых генов, типы полиморфизмов, структура и температура отжига праймеров

Ген, локализация	Полиморфизм	Структура праймеров	Температура отжига праймеров
<i>STAT2</i> 12q13.2	rs2066807 экзон20	3'-GAGGGATTTCAGTTCAGAGCCA-5' 3'-GCTTTGTGAGTCGGAGCC-5'	64°C
<i>STAT4</i> 2q32.2-q32.3	rs7572482 интрон1	3'-CTGAGTCTTTCGGAGAGCTGAA-5' 3'-CCACCAGCTCACAGACGGT-5'	60°C
<i>PIAS3</i> 1q21	rs12756687 интрон1	3'-TGAACCCCTGACCTGAAAACC-5' 3'-CCTCCTGGGAACAGGATAGG-5'	64°C
<i>PIAS4</i> 19p13.3	rs3760903 интрон1	3'-GGCTGCAGTTTACATACCCC-5' 3'-CAGAAGCCAGGTGTCTCTCGA-5'	64°C
<i>SOCS7</i> 17q12	rs3890580 интрон9	3'-GATCCAGGCATTTGCCATA-5' 3'-CCATTTGTGCAGTATCAGGG-5'	60°C
<i>TBX21</i> 17q21.32	rs11652969 интрон1	3'-TGCCTGTAGTCAAGGAGAGAAT-5' 3'-TGAAGAACTGACGCTCCG-5'	64°C

Лица, включенные в группу с сочетанием обоих заболеваний, удовлетворяли выше описанным критериям включения и имели диагноз БА на фоне описторхоза. Для формирования контрольной группы у здоровых индивидов исключали описторхоз и наличие аллергических заболеваний на момент обследования и в анамнезе.

ДНК выделяли из мононуклеаров периферической крови методом фе-

нол-хлороформной экстракции. Исследованы однонуклеотидные замены шести генов: *TBX21*, *STAT2*, *STAT4*, *SOCS7*, *PIAS4*, *PIAS3*. Генотипирование осуществляли с помощью ПДРФ-анализа. Дизайн праймеров осуществлялся с помощью программы Primer3, с использованием последовательностей генов базы данных Национального центра биотехнологической информации NCBI (табл.1). Амплификат под-

Таблица 2

Частота аллелей и генотипов у здоровых лиц и у больных бронхиальной астмой и описторхозом, %

Ген/поли-морфизм	Группа	Генотипы			р	Ал-лель	р
		A/A	A/T	T/T			
<i>SOCS7</i> rs3890580	БА	72,09	25,58	2,33	0,497	А	0,327
	Опи	82,83	15,15	2,02	0,476	А	0,692
	БА+Опи	80,95	19,05	0,00	0,800	А	0,817
	Контроль	78,38	20,72	0,90		А	88,74
<i>TBX21</i> rs11652969	БА	10,47	47,67	41,86	0,892	А	34,30
	Опи	17,71	46,88	35,42	0,431	А	41,15
	БА+Опи	6,98	55,81	37,21	0,409	А	34,88
	Контроль	12,39	45,13	42,48		А	34,96
<i>PIAS4</i> rs3760903	БА	31,40	50,00	18,60	0,526	А	56,40
	Опи	34,02	47,42	18,56	0,314	А	57,73
	БА+Опи	30,23	51,16	18,60	0,726	А	55,81
	Контроль	24,55	52,73	22,73		А	50,91
<i>PIAS3</i> rs12756687	БА	20,24	36,90	42,86	0,147	С	38,69
	Опи	14,14	48,48	37,37	0,396	С	38,38
	БА+Опи	17,78	37,78	44,44	0,435	С	36,67
	Контроль	10,43	43,48	46,09		С	32,17
<i>STAT2</i> rs2066807	БА	82,14	17,86	0,00	0,238	С	91,07
	Опи	84,04	14,89	1,06	0,649	С	91,49
	БА+Опи	91,11	4,44	4,44	0,226	С	93,33
	Контроль	88,54	10,42	1,04		С	93,75
<i>STAT4</i> rs7572482	БА	7,06	43,53	49,41	0,560	А	28,82
	Опи	3,06	45,92	51,02	0,067	А	26,02
	БА+Опи	2,27	59,09	38,64	0,040	А	31,82
	Контроль	11,40	39,47	49,12		А	31,14

Примечание. р- достигнутый уровень значимости различий между генотипами и аллелями (по точному тесту Фишера).

ваниями и качественными признаками использовали точный тест Фишера. Для анализа количественных признаков данные проверяли на нормальность распределения по критерию Колмогорова-Смирнова. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Для оценки статистической значимости различий показателей, не подчиняющихся закону нормального распределения, использовали непараметрические критерии Манна-Уитни (U-тест) и Краскела-Уоллиса.

### Результаты и обсуждение

Для исследуемых полиморфных вариантов генов *PIAS3*, *PIAS4*, *SOCS7*, *TBX21* частоты генотипов соответствовали ожидаемым при РХВ во всех анализируемых группах. Отклонение от РХВ в группе больных БА на фоне описторхоза показано для *STAT2* за счет избытка гомозигот rs2066807 G/G, также в этой группе частоты генотипов для *STAT4* не соответствовали ожидаемым при РХВ в связи с избытком гетерозигот. В других группах для полиморфизмов *STAT2* и *STAT4* отклонения от РХВ не наблюдали.

Частоты генотипов и аллелей в анализируемых группах представлены в табл.2.

*TBX21* является критическим транскрипционным фактором для продукции IFN-γ и может играть существенную роль в Th1/Th2 балансе. Показана связь варианта -7947 гена *TBX21* с БА у европеоидов [10]. В то же время в финской популяции 15 проанализированных однонуклеотидных замен *TBX21* не ассоциированы с БА и повышенным уровнем IgE [4]. Нами также не обнаружено связи rs11652969 *TBX21* с БА и описторхозом.

Соответствие частот генотипов ожидаемым при равновесии Харди-Вайнберга (РХВ) анализировали с помощью критерия Х<sup>2</sup> с поправкой Йетса на непрерывность. Статистическая обработка материала проведена с использованием программы «STATistica for Windows 6.0» (STATsoft Inc., 1984-2001). При оценке связи аллелей и генотипов с заболе-

активируя их экспрессию. У детей тайваньской популяции, страдающих БА, выявлены различия частот генотипов и аллелей rs2066807 *STAT2* по сравнению со здоровыми индивидами, но не ассоциация полиморфизма с параметрами функции внешнего дыхания FEV1, FEV1/FVC. Это указывает на связь маркера с возможной предрасположенностью БА, но не с тяжестью заболевания [9]. В нашем исследовании для rs2066807 *STAT2* не показано связи с БА и описторхозом, также не выявлены ассоциации с клиническими признаками ни в одной из исследуемых групп.

Ген *STAT4* предложен как ген-кандидат предрасположенности БА по результатам полногеномного исследования. Исследования, проведенные для полиморфизма 90089T/C в 11 интроне гена *STAT4*, показали ассоциацию с БА у китайцев [7], также этот полиморфный вариант связан с повышенным уровнем специфического IgE у корейцев, больных БА [3]. Однако при исследовании больных БА в Финляндии не выявлено связи заболевания с анализируемым полиморфизмом [2].

В исследованной популяции г. Томска установлены различия частот генотипов rs2066807 *STAT4* между больными БА на фоне описторхоза и здоровыми индивидами ( $p=0,04$ ) за счет преобладания в контрольной группе генотипа A/A (11,4%) по сравнению с больными с сочетанием БА и описторхоза (2,27%). Полиморфный вариант *STAT4* в исследуемой группе связан не только с интегральным фенотипом БА, но и с клинически важным признаком: гетерозиготный генотип G/A ассоциирован с низкими значениями FEV1% ( $p=0,03$ ). Анализируемый полиморфный вариант не ассоциирован с клиническими признаками описторхоза и БА в других группах. Ассоциация с полиморфным вариантом *STAT4*, полученная только в группе больных БА на фоне описторхоза доказывает модифицирующее влияние описторхоза на клиническое течение БА.

Накапливается все больше информации о роли генов семейства *STAT* в предрасположенности мультифакторным заболеваниям, в частности БА. Однако гораздо меньше исследований, посвященных анализу вклада суп-

рессоров цитокиновой сигнализации SOCS и PIAS. Эти белки играют роль ингибиторов активированных молекул *STAT*, действующими по механизму обратной связи, показано их участие в дифференцировке и развитии Т-клеток. Их рассматривают как новые возможные мишени для терапии аллергических заболеваний.

В результате проведенного исследования показана ассоциация rs12756687 *PIAS3* с показателем внешнего дыхания FEV1% у больных изолированной БА ( $p=0,0217$ ), также этот полиморфный вариант связан с FVC% у больных БА на фоне описторхоза ( $p=0,0205$ ). В обоих случаях генотип C/C связан с более высокими значениями показателей внешнего дыхания, что является благоприятным прогностическим признаком в отношении БА. Полиморфный вариант гена *PIAS3* не ассоциирован с другими клиническими признаками БА и описторхоза. Роль PIAS-4 в развитии иммунозависимых заболеваний не изучена. В результате проведенного исследования не показано связи rs3760903 гена *PIAS4* с БА, описторхозом и клиническими признаками анализируемых заболеваний.

Ген *SOCS7* rs3890580 ассоциирован с уровнем IgE у больных описторхозом – генотип T/T связан с более низкими значениями признака. У больных БА этой ассоциации не выявлено. Уровень общего IgE является важным количественным показателем, исследуемым при анализе предрасположенности к гельминтной инвазии, он коррелирует с интенсивностью инвазии. Сложно предположить механизм связи *SOCS7* с продукцией IgE, поскольку не совсем понятна роль каждого из ингибиторов транскрипционных факторов *STAT* в реализации иммунного ответа. Однако полученные данные позволяют предполагать различные механизмы повышения уровня IgE при БА и описторхозе.

### Заключение

Проведенное исследование показало ассоциацию полиморфного варианта rs12756687 гена *PIAS3* с функцией внешнего дыхания у больных БА независимо от факта описторхозной инвазии; установлена связь полиморфизма rs2066807 гена *STAT4* с БА на фоне

описторхоза; продемонстрирована ассоциация полиморфизма rs3890580 гена *SOCS7* с уровнем IgE у больных описторхозом, но не у больных БА.

Исследование выполнено при поддержке гранта № 02.512.11.2162 от «01» августа 2007 г в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы». Выражаем благодарность Васильевой М.В., Черевко Н.А., Огородовой Л.М. за помощь в сборе биологического материала.

Исследование выполнено при поддержке гранта № 02.512.11.2162 от «01» августа 2007 г в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы». Выражаем благодарность Васильевой М.В., Черевко Н.А., Огородовой Л.М. за помощь в сборе биологического материала.

### Литература

1. Евдокимова Т.А. Влияние хронической описторхозной инвазии на клиническое течение и иммунный ответ при atopической бронхиальной астме у детей / Т.А. Евдокимова, Л.М. Огородова // Педиатрия. – 2005. - №6. – С. 12-17.
2. Association analysis of common variants of *STAT6*, *GATA3*, and *STAT4* to asthma and high serum IgE phenotypes / M. Pyka.la.inen [et al.] // J Allergy Clin Immunol – 2005. – V. – 115. – P. 80–7.
3. Association analysis of signal transducer and activator of transcription 4 (*STAT4*) polymorphisms with asthma / B. L. Park [et al.] // J Hum Genet. – 2005. – 50. – P. 133–8.
4. Association study of 15 novel single-nucleotide polymorphisms of the T-bet locus among Finnish asthma families / E. Ylikoski [et al.] // Clin Exp Allergy. – 2004. –V. 34. – P. 1049-55.
5. Genes on chromosomes 1 and 13 have significant effects on Ascaris infection / S. Williams-Blangero [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2002. – V. 99. – P. 5533-5538.
6. Genetic haplotypes of Th-2 immune signalling link allergy to enhanced protection to parasitic worms / M. Moller [et al.] // Hum Mol Genet. - 2007 – V. 16. – P.1828-36.
7. Polymorphisms of *STAT-6*, *STAT-4* and IFN-gamma genes and the risk of asthma in Chinese population / Y. Li [et al.] // Respir Med. – 2007. – V. 101. – P. 1977-81.
8. Quinnell R.J. Genetics of susceptibility to human helminth infection // Int J Parasitol. - 2003 - V. 33. – P. 1219-31.
9. *STAT2*C related genotypes and allele but not TLR4 and CD40 gene polymorphisms are associated with higher susceptibility for asthma / H. Yao-Yuan [et al.] // Int. J. Biol. Sci. – 2009. – V. 5. – P. 74-81.
10. T-bet polymorphisms are associated with asthma and airway hyperresponsiveness / B.A. Raby [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. – 2006. – V. 173. – P. 64-70.

О. Ю. Бычкова, О. А. Макеева, И. В. Цимбалюк, К. В. Пузырев,  
Е. Н. Павлюкова, В. П. Пузырев

## СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА G-308A ГЕНА TNF С КЛИНИЧЕСКИ ВАЖНЫМИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЭНДОФЕНОТИПАМИ И ДОЛГОЖИТЕЛЬНОСТЬЮ

УДК 575.17:575.174.015.3:616.1

Изучена ассоциация полиморфного варианта G-308A гена фактора некроза опухолей альфа (TNF) с клинически важными эндофенотипами, такими как уровень артериального давления и эхокардиографические параметры у больных с артериальной гипертензией (АГ). Проведено сравнение частот аллелей и генотипов у больных с АГ (n=231), в популяционной выборке (n=331) и у долгожителей (средний возраст 92 года, n=131). Не выявлено отличий по частотам аллелей и генотипов между изученными группами.

У больных, имеющих сочетание АГ с сахарным диабетом 2-го типа (СД2), аллель А встречался чаще в подгруппе с гипертрофией левого желудочка (ГЛЖ), чем в подгруппе без ГЛЖ: 18% vs 8% (p=0,033). Для носителей генотипа AA были характерны более высокие значения индекса ремоделирования, по сравнению с носителями генотипов GA и GG: 0,552±0,057 против 0,433±0,008 и 0,429±0,018, соответственно (p=0,013). У больных с АГ без СД2 получена ассоциация полиморфизма G-308A TNF с показателями суточного мониторинга артериального давления. Таким образом, выявлена связь полиморфного варианта G-308A TNF с клинически важными сердечно-сосудистыми показателями при АГ, однако не показана его ассоциация с долгожительством.

**Ключевые слова:** мультифакториальные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, долгожительство, ген фактора некроза опухолей альфа, полиморфизм.

Association of the G-308A TNF gene polymorphism with several clinically important cardiovascular endophenotypes such as arterial blood pressure measurements and cardiac parameters had been studied. Allele and genotype frequencies were compared between patients with arterial hypertension (n=231), healthy controls (n=331) and nonagenarians (mean age=92, n=131). No significant differences among those groups were revealed. In patients' group with arterial hypertension combined with diabetes type 2 A-308 allele frequency was higher in left ventriculi hypertrophy (LVH) subgroup than in patients without LVH: 18% vs 8% (p=0,033). Left ventricular remodeling index was significantly higher in AA genotype carriers as compared to GA and GG genotypes: 0,552±0,057 vs 0,433±0,008 and 0,429±0,018, appropriately (p=0,013). An association of G-308A TNF gene polymorphism with twenty-four-hour monitoring blood pressure measurements was revealed in hypertensive patients without diabetes. Thus G-308A TNF polymorphism was associated with several important cardiovascular endophenotypes but not with longevity.

**Keywords:** multifactor diseases, cardiovascular diseases, longevity, tumor necrosis factor - α gene, polymorphism.

### Введение

Одним из подходов к изучению генетической компоненты долголетия является анализ генов предрасположенности к возраст-зависимым заболеваниям. В основе данного подхода лежит гипотеза об элиминации из популяции с возрастом «неблагоприятных», с точки зрения выживаемости, аллелей и накоплению «благоприятных». Среди возраст-зависимых заболеваний главной причиной смертности остаются болезни сердечно-сосудистой системы.

Ген TNF, картированный на хромосоме 6p21.1-6p21.3 внутри главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса III [3], относится к хорошо известным генам-кандидатам сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и характеризуется широким спектром

разнонаправленных эффектов. Так, продукт гена - фактор некроза опухолей альфа (ФНО) - играет фундаментальную физиологическую роль в иммунорегуляции, принимая участие в развитии и прогрессировании воспаления, микрососудистой гиперкоагуляции, гемодинамических нарушений при различных заболеваниях человека, как инфекционной, так и неинфекционной природы [2, 10]. Доказано, что продукция ФНО регулируется на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях [4, 13]. Было показано, что аллель -308A имеет рецессивный биологический эффект и его наличие связано с 6-7 кратным увеличением уровня транскрипции TNF [5, 15]. В клетках, экспрессирующих рецепторы к ФНО, данный цитокин способен индуцировать апоптоз, который играет существенную роль в развитии, тканевом гомеостазе и старении [14]. Роль апоптоза в процессе старения неоднозначна: с одной стороны, посредством апоптоза устраняются поврежденные стареющие клетки (фибробласты, гепатоциты), которые впоследствии могут быть возмещены путем клеточной пролиферации, что способствует сохранению тканевого гомеостаза; с другой стороны, путем апоптоза элиминируются и постмитотические клетки (нейроны, кардиомиоциты), которые не могут быть восстановлены, что приводит к патологии. Так, апоптоз кардиомиоцитов, вызван-

ный фактором некроза опухолей альфа, может иметь место при развитии патологических изменений миокарда, приводящих к необратимому нарушению его сократительной способности, сердечной недостаточности [8] и как следствие - ограничению продолжительности жизни.

Согласно наблюдениям некоторых исследователей, с возрастом повышается уровень таких циркулирующих в крови цитокинов, как ФНО, интерлейкина-6 и др. [11], антагонистов цитокинов и белков острой фазы. Такие изменения приводят к преобладанию «провоспалительных» факторов над противовоспалительными и развитию у пожилых людей некоторых патологических процессов, в частности, атеросклероза [6], а также - к старению [9].

Цель настоящего исследования - изучение ассоциации промоторного полиморфизма гена TNF (G-308A) с клинически важными эндофенотипами, такими как эхокардиографические параметры сердца и уровень артериального давления у больных с артериальной гипертензией (АГ), а также - оценкой значимости исследуемого полиморфного варианта в отношении продолжительности жизни.

### Материалы и методы

Исследование включало анализ нескольких групп: больные с АГ (n=231, из которых 114 мужчин и 117 женщин в возрасте 50±0,4 лет); популяцион-

Сотрудники НИИ МГ СО РАМН (г. Томск): **БЫЧКОВА Ольга Юрьевна** - м.н.с., olga.bychkova@medgenetics.ru, **МАКЕЕВА Оксана Алексеевна** - к.м.н., руководитель группы организации научных исследований, oksana.makeeva@medgenetics.ru; **ПУЗЫРЕВ Валерий Павлович** - акад. РАМН, проф., директор НИИ; сотрудники НИИ кардиологии СО РАМН (г. Томск): **ПУЗЫРЕВ Константин Валерьевич** - к.м.н., н.с., constp@cardio.tsu.ru, **ПАВЛЮКОВА Елена Николаевна** - д.м.н., вед.н.с., проф., pavluk@cardio.tsu.ru; **ЦИМБАЛЮК Игорь Владимирович** - к.м.н., ассистент Сибирского Государственного мед. ун-та (г. Томск), doktor\_ivts@mail.ru.

ная выборка ( $n=331$ , 159 мужчин и 172 женщины, средний возраст =  $44,0 \pm 0,4$  лет); и выборка долгожителей ( $n=131$ , из которых 27 мужчин и 104 женщины в возрасте от 88 до 100 лет, средний возраст составил 92 года). Все анализируемые группы включали славян по происхождению. Выборка больных обследована в НИИ кардиологии СО РАМН, до проведения клинического обследования пациенты не принимали кардиотропных препаратов более 1 месяца. Массу миокарда левого желудочка (ММЛЖ) определяли по критериям PENN и формуле Devereux с соавторами [7], индекс массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ,  $г/м^2$ ) рассчитывали как отношение ММЛЖ к площади тела. Факт наличия ГЛЖ фиксировали на основании показателя ИММЛЖ более  $134 г/м^2$  у мужчин и  $110 г/м^2$  у женщин. Среди пациентов с АГ 41% имели сахарный диабет 2-го типа (СД2), у 59% была диагностирована гипертрофия левого желудочка (ГЛЖ).

Контрольная группа была сформирована в ходе эпидемиологического исследования факторов риска ИБС, проводимого кафедрой факультетской терапии Сибирского государственного медицинского университета. Критерием включения индивидуумов в данное исследование являлась этническая принадлежность и возраст от 28 до 55 лет.

Выборку долгожителей формировали сотрудники НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, были использованы данные о возрасте, полученные при анализе электронных медицинских карт нескольких поликлинических отделений г. Томска, последующего телефонного опроса и выезда к пациентам на дом для обследования и забора образцов крови. На все манипуляции было получено разрешение этического комитета НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, у пациентов брались информированные согласия на участие в исследовании.

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции [1]. Генотипирование проводилось согласно описанной ранее методике [12].

### Результаты и обсуждение

В табл.1 представлены данные о наблюдаемых частотах генотипов в трех исследуемых выборках: у больных АГ (которые были разделены на две подгруппы - имеющих и не имеющих СД2), в контрольной группе и у долгожителей. Приведены ожидаемые частоты, исходя из равновесия Харди-Вайнберга (ХВ), и уровень значимости отличий по точному тесту Фишера. Откло-

нения от ХВ были зафиксированы в группе больных с ССЗ за счет некоторого недостатка гетерозигот и избытка гомозигот класса АА, а также в контрольной группе, где наблюдался избыток гомозигот АА (9 против ожидаемой частоты 5) и недостаток гетерозигот. Ошибки генотипирования были исключены посредством использования двух альтернативных методов определения генотипов (рестрикционный анализ и генотипирование с помощью TaqMan-проб): все гомозиготы по редкому аллелю были повторно проанализированы другим методом.

Частоты аллелей во всех изученных выборках (и подгруппах больных, выделенных в зависимости от наличия СД2) представлены на рисунке. Различия частот аллелей между больными

Таблица 1

Частоты генотипов по полиморфному варианту G-308A гена TNF в трех выборках: у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, в контрольной группе и у долгожителей

Генетический маркер / Выборка	Контроль	Долгожители	Больные АГ
G-308A TNF	$n_{AA}=9$ (4,65)	$n_{AA}=3$ (2,73)	$n_{AA}=11$ (4,31)
	$n_{GA}=60$ (68,70)	$n_{GA}=32$ (32,53)	$n_{GA}=41$ (54,37)
	$n_{GG}=258$ (253,65)	$n_{GG}=97$ (96,73)	$n_{GG}=178$ (171,31)
	$p=0,031$	$p=0,731$	$p=0,001$

Примечание: n – наблюдаемые и ожидаемые (исходя из равновесия Харди-Вайнберга (ХВ)) частоты соответствующих генотипов (последние приведены в скобках); p – уровень значимости отклонения от ХВ по точному тесту Фишера.

Таблица 2

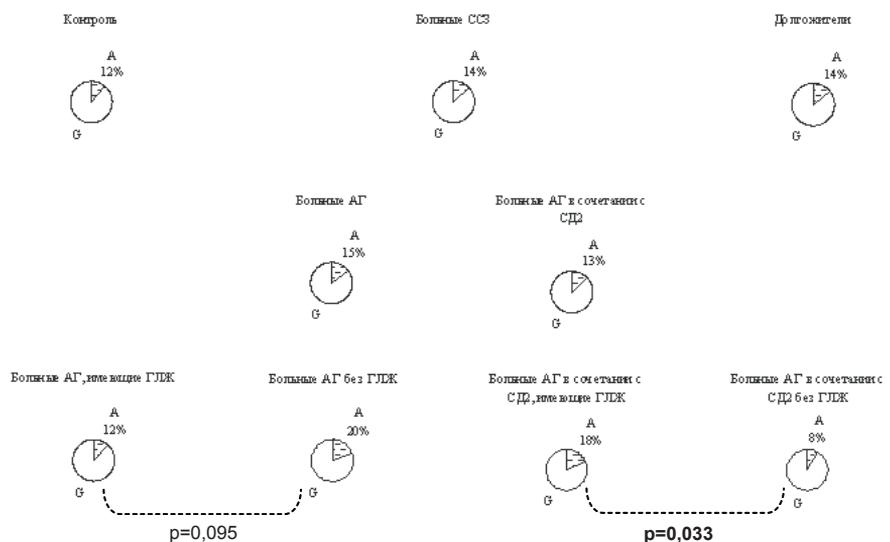
Сравнение частот генотипов и аллелей внутри групп больных АГ и АГ+СД2 в зависимости от наличия / отсутствия ГЛЖ

Выборка / полиморфизм	Больные с АГ				Больные с АГ в сочетании с СД2					
	Генотипы		Аллели		Генотипы		Аллели			
TNF/G-308A	AA	GA	GG	A	G	AA	GA	GG	A	G
Есть ГЛЖ	4	12	68	20	148	3	12	34	18	80
Нет ГЛЖ	4	10	32	18	74	0	7	38	7	83
p	0,331		0,095		0,127		0,033			

Примечание. Приведены абсолютные и относительные (%) численности генотипов и аллелей, p – уровень значимости отличий по точному критерию  $\chi^2$  или точному тесту Фишера (в случае, когда численности генотипов меньше 5).

АГ, группой контроля и долгожителями составили не более 2%.

Было также проведено сравнение частот аллелей и генотипов между подгруппами больных с АГ, имеющими



Частоты аллелей по полиморфизму G-308A гена TNF у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (АГ в сочетании с СД2 и АГ без СД2), в контрольной выборке и у долгожителей.

Примечание. Больные с сердечно-сосудистыми заболеваниями проанализированы как общая группа (все пациенты имеют АГ), а также в зависимости от наличия/отсутствия СД2 и ГЛЖ (в каждой из подгрупп). Проводили следующие сравнения: объединенную выборку больных ССЗ (также как и подвыборки с наличием и без СД2) сравнивали с контролем и долгожителями; частоты у долгожителей сравнивали с частотами, зафиксированными в контроле; ассоциацию исследуемых полиморфных вариантов с ГЛЖ оценивали, сравнивая частоты в подгруппах больных имеющих и не имеющих этот фенотип. Уровень значимости отличий по частотам аллелей между группами показан только для случаев, где  $p < 0,1$ ; достоверно значимые различия (при  $p < 0,05$ ) выделены жирным шрифтом

Таблица 3

Эхокардиографические параметры у больных с аАГ и АГ + СД2, в зависимости от генотипа по полиморфному локусу *G-308A* гена *TNF*

Генотип	ЗСЛЖ, мм	МЖП, мм	КДР, мм	ММЛЖ, г	ИММЛЖ, г/м <sup>2</sup>	ИР
Больные АГ						
GG, n=100	11,40±0,30	12,34±0,41	51,73±0,55	310,43±11,88	155,53±5,95	0,456±0,014
GA, n=22	10,55±0,44	10,68±0,56	52,60±1,22	269,36±16,46	132,25±6,83	0,401±0,020
AA, n=8	10,58±1,16	11,05±1,12	51,41±1,21	268,96±27,33	136,85±13,13	0,421±0,031
p	0,417	0,154	0,770	0,323	0,257	0,175
Больные АГ в сочетании с СД2						
GG, n=72	10,28±0,18	11,42±0,28	52,25±0,50	278,22±9,94	135,57±4,71	0,433±0,008
GA, n=19	10,55±0,34	11,06±0,36	52,56±1,04	273,40±11,33	131,58±5,32	0,429±0,018
AA, n=3	12,39±1,27	13,47±0,43	47,95±1,66	300,58±23,34	146,21±4,27	0,552±0,057
p	0,086	0,222	0,217	0,772	0,745	0,013

Примечание. ЗСЛЖ – толщина задней стенки ЛЖ, МЖП – толщина межжелудочковой перегородки, КДР – конечный диастолический размер, ММЛЖ – масса миокарда ЛЖ, ИММЛЖ – индекс массы миокарда ЛЖ, ИР – индекс ремоделирования ЛЖ, p – уровень значимости для однофакторного дисперсионного анализа.

Таблица 4

Ассоциация полиморфного варианта *G-308A* гена *TNF* с показателями суточного мониторинга артериального давления у больных с артериальной гипертензией

Полиморфизм / Показатель АД		ССАДд	СДАДд	ССАДс	СДАДс	МСАДс	МДАДс
<i>TNF</i> / <i>G-308A</i>	AA	148,5±5,7 (6)	97,2±7,8 (6)	146,6±7,7 (4)	94,0±3,2 (4)	186,6±3,0 (7)	114,0±4,8 (7)
	GA	140,1±3,5 (20)	87,3±2,4 (20)	126,0±10,1 (14)	85,3±3,6 (14)	170,6±4,1 (21)	111,2±2,6 (21)
	GG	151,7±2,0 (85)	97,0±1,3 (85)	149,8±1,9 (79)	94,2±1,3 (79)	189,1±2,6 (93)	121,6±1,6 (93)
	p	0,031	0,007	0,001	0,038	0,007	0,011

Примечание: Данные приведены как среднее значение ± стандартная ошибка, в скобках указаны численности генотипов. ССАДд – среднее систолическое АД дневное, СДАДд – среднее диастолическое АД дневное, ССАДс – среднее систолическое АД суточное, СДАДс – среднее диастолическое АД суточное, МСАДс – максимальное систолическое АД суточное, МДАДс – максимальное диастолическое АД суточное; p – уровень значимости.

и не имеющими СД2, по сравнению с контрольной выборкой и должителями (рисунок). Несмотря на то, что в литературе есть указания на преобладание генотипа *-308GG* у должителей [9], в настоящем исследовании статистически значимых различий по частотам аллелей и генотипов между должителями, контролем и больными зафиксировано не было. Предположение о том, что «неблагоприятные» аллели и генотипы, ассоциированные с сердечно-сосудистыми заболеваниями, будут реже встречаться у должителей в отношении исследованного нами полиморфизма *G-308A* гена *TNF* не нашло подтверждения. Одной из многих причин может быть многообразие функций продукта гена – ФНО – на разных этапах индивидуального развития.

Поскольку продукт гена *TNF* является мощным гипертрофическим стимулом, влияет на сократимость сердечной мышцы и участвует в регуляции сосудистого тонуса, на следующем этапе исследования был проведен

анализ ассоциаций полиморфного варианта *G-308A* гена *TNF* с наличием гипертрофии левого желудочка, а также – эхокардиографическими параметрами и показателями суточного мониторинга артериального давления (СМАД) в подгруппах больных с АГ, имеющих и не имеющих СД2. Выявлено, что аллель А (и генотипы АА и GA) по варианту *G-308A* гена *TNF* чаще встречается у больных с ГЛЖ, чем без ГЛЖ при сочетании АГ с СД2, соответственно: 18 и 8% для частоты аллеля А (p=0,033). Для больных с АГ без СД2 была характерна иная закономерность: у пациентов без ГЛЖ наблюдалась более высокая частота аллеля А, однако значимость различий не достигала заданного уровня (p=0,095).

Анализ средних значений эхокардиографических показателей у пациентов с разными генотипами показал, что в подгруппе больных АГ в сочетании с СД2 индекс ремоделирования, рассчитанный как отношение суммарной величины ЗСЛЖ и МЖП к конечно-

му диастолическому размеру, который характеризует тип ремоделирования (позволяет зафиксировать его неблагоприятные формы), достигал наибольших значений у носителей генотипа АА (p=0,013) (табл. 3).

При анализе связи изученных генетических вариантов с показателями СМАД была выявлена ассоциация полиморфизма *G-308A* гена *TNF* с уровнем среднего систолического и диастолического артериального давления за периоды «день» и «сутки», а также с максимальными значениями среднего систолического и диастолического артериального давления (САД и ДАД), при этом гетерозиготные носители имели самые низкие значения вышеперечисленных параметров, а гомозиготы GG чуть более высокие, чем гомозиготы второго класса (табл. 4).

### Заключение

Таким образом, выявлены ассоциации изученного полиморфного варианта с рядом клинически важных сердечно-сосудистых показателей при АГ, однако не показана его связь с долгожительством.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект №07-04-01613-а «Оценка адаптивной роли генетического полиморфизма на пре- и постнатальных этапах развития человека».

### Литература

1. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Самбрук. – М.: Мир, 1984. – 480с.
2. Насонов Е.Л. Новые аспекты патогенеза сердечной недостаточности: роль фактора некроза опухоли / Е.Л. Насонов, М.Ю. Самсонов // Сердечная недостаточность. – 2000. – Т. 1, № 4. – С. 1-6.
3. Azzawi M. Tumour necrosis factor alpha and the cardiovascular system: its role in cardiac allograft rejection and heart disease / M. Azzawi, P. Hasleton // Cardiovasc. Res., 1999. – V. 43 – P. 850–859.
4. Beutler B. The biology of cachectin/*TNF* – a primary mediator of the host response / B. Beutler, A. Cerami // Annu. Rev. Immunol., 1989. – V. 7 – P. 625-655.
5. Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (*TNF*-alpha) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of *TNF*-alpha production / Braun N. [et al.] // Neurosci. Lett., 1996. – V. 215 – P. 75-78.
6. A high plasma concentration of *TNF*-alpha is associated with dementia in centenarians / Bruunsgaard H. [et al.] // J Gerontol Med Sci., 1999. – V. 54A – P. M357–M364.
7. Devereux R.B. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man: anatomic validation of the method / R.B. Devereux, N. Richec // Circulation, 1977. – V. 55 – P. 613-618.
8. Infusion of tumor necrosis factor/cachectin produces muscle catabolism in the rat: synergistic effect with interleukin-1 / Flores E.A. [et al.] // J Clin Invest., 1989. – V. 83 – P. 1614-622.
9. Inflammation, genetics, and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10-1082

promoter SNP and its interaction with *TNF-α*-308 promoter SNP / Lio D. [et al.] // *J Med Genet*, 2003. - V.40 - P. 296-299.

10. TWEAK Attenuates the Transition from Innate to Adaptive Immunity / Maecker H. [et al.] // *Cell*, 2005. - P. 931-944.

11. Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor-α / Paolisso G. [et al.] // *Am J Physiol Endocrin Metab.*, 1998. - V. 38 - P. E294-E299.

12. Variants of trophic factors and expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy / Patel R. [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2000. - V. 32 - P. 2369-77.

13. Transcriptional and posttranscriptional regulation of tumor necrosis factor gene expression in human monocytes / Sariban E., Imamura K.,

Leubbers R., Kufe D. // *J. Clin. Invest.*, 1988. - V. 81 - P. 1506-1510.

14. Vaux D.L. The molecular biology of apoptosis / D.L. Vaux, A. Strasser // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996. - V.93 - N6. - P. 2239-2244.

15. Effects of a polymorph $H$ ism in the human tumour necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation / Wilson A.G. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997. - V. 94 - P. 3195-9.

Г.О. Дугарова, М.В. Голубенко, Е.Р. Еремина, Л.И. Минайчева, С.В. Фадюшина

## ПОЛИМОРФИЗМ G-308A ГЕНА *TNF-α* У БУРЯТ

УДК 577.21, 575.17

В настоящем исследовании определены частоты аллелей полиморфизма *G-308A* гена *TNF* у бурят по результатам изучения 16 субпопуляций из 5 районов Республики Бурятия (N=865). Показано, что частота аллеля А изучаемого полиморфизма у бурят составляет 11,5%. При сравнении с другими сибирскими популяциями найдены статистически значимые отличия от якутов. В нескольких субпопуляциях выявлено отклонение частот генотипов от закона Харди-Вайнберга. Расчет коэффициентов генной дифференциации для всех населенных пунктов ( $Gst=0,0167$ ) и для 5 изучаемых районов ( $Gst=0,0053$ ) показал, что значительной дифференциации генофонда бурят по данному полиморфизму не наблюдается. Полученные результаты дают характеристику распространенности у бурят функционально значимого полиморфизма, для которого известны ассоциации с различными мультифакториальными заболеваниями.

**Ключевые слова:** полиморфизм, ген фактора некроза опухоли, буряты.

*G-308A* polymorphism in the tumor necrosis factor-α (*TNF*) gene has been studied in the Buryat population by genotyping samples from 16 subpopulations from 5 areas of Republic Buryatiya (N=865). The *TNF*-α *G-308A* polymorphism was assessed by the PCR and restriction analysis. It has been shown that frequency of the A allele in Buryats was 11.5 %. At comparison with other Siberian populations, statistically significant differences with Yakuts were found. In several subpopulations the deviation of genotype frequencies from Hardy-Weinberg equilibrium was revealed. Calculation of genetic differentiation measure for all settlements ( $Gst=0.0167$ ) and for 5 investigated areas ( $Gst=0.0053$ ) did not demonstrate significant differentiation of a gene pool of Buryats by the given polymorphism. The results give for Buryat population the characteristics of prevalence of functionally significant polymorphism for which associations with various multifactorial diseases are known.

**Keywords:** polymorphism, the tumor necrosis factor-α gene, Buryats.

### Введение

Известно, что риск развития так называемых мультифакториальных заболеваний определяется как факторами внешней среды, так и индивидуальным генотипом человека. Этническая составляющая генетической компоненты подверженности к мультифакториальным заболеваниям проявляется в разной частоте хронических болезней в популяциях, в различиях в составе наследственного компонента подверженности представителей разных рас и народов. В настоящее время идеология генетики распространенных заболеваний смещается от разрозненных исследований ассоциаций генов, их полиморфных вариантов и заболеваний к поиску общей генетической компоненты подверженности к определенному спектру патологии в конкретных популяциях и этнических группах [5].

Буряты как народность в процессе своего сложного и длительного формирования сложились из различных этнических компонентов. 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 [4]. Прибайкалье, территория современного расселения бурят, ещё с древности стала зоной активных контактов и взаимодействий различных по происхождению племен и народов. Для населения Республики Бурятия было проведено генетико-эпидемиологическое изучение распространенности и структуры наследственной патологии у населения Республики Бурятия [3], касающееся наследственных заболеваний менделевского типа наследования. В то же время практически нет данных о распространенности полиморфных вариантов генов-кандидатов предрасположенности к широко распространенным, или мультифакториальным заболеваниям (МФЗ). Такие исследования представляют интерес для изучения этнических особенностей структуры наследственной предрасположенности к МФЗ. Учитывая генетическую гетерогенность бурят, важно также оценить внутриэтническую структуру бурятского генофонда по распространенности отдельных полиморфизмов.

Фактор некроза опухоли – альфа (*TNF-α*) мультифункциональный провоспалительный цитокин, который индуцирует некроз опухолевых клеток. Этот цитокин через специфические рецепторы клеточной поверхности вызывает лизис клеток лимфомы, некроз саркомы, активирует полиморфноядерные лейкоциты, проявляет антивирусную активность [6]. Широкий спектр биологического действия *TNF-α* обуславливает его участие в формировании различных патологических состояний, таких как аутоиммунные, инфекционные, сердечно-сосудистые и другие заболевания [8,15,17].

Ген фактора некроза опухоли (*TNF*) расположен на 6-й хромосоме (бр21.3) в главном комплексе гистосовместимости. В промоторной зоне гена расположены несколько полиморфных вариантов, определяющих экспрессию *TNF-α*. [13]. Однонуклеотидная замена гуанина на аденин в положении -308 промотора (*G-308A*) приводит к увеличению продукции *TNF-α*. [7]. Частота аллеля А в разных популяциях мира варьирует от 0,03 до 0,27 [9,11,16].

Цель настоящего исследования – изучение полиморфизма *G-308A* гена *TNF-α* в различных популяциях бурят и оценка дифференциации бурятского генофонда по этому функционально значимому полиморфизму.

### Материалы и методы

В настоящее исследование были включены 865 лиц бурятской нацио-

**ДУГАРОВА Галина Октябрьевна** – зав. МГК Детской республиканской клинической больницы, г. Улан-Удэ, neoscr@mail.ru; **ГОЛУБЕНКО Мария Владимировна** – к.б.н., с.н.с. НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск, maria.golubenko@medgenetics.ru; **ЕРЕМИНА Елена Робертовна** – к.м.н., директор Бурятского филиала НИИ МГ СО РАМН, г.Улан-Удэ, ereelrob@mail.ru; **МИНАЙЧЕВА Лариса Ивановна** – к.м.н., н.с. НИИ МГ СО РАМН, г. Томск, larisa.minaycheva@medgenetics.ru; **ФАДЮШИНА Светлана Валерьевна** – м.н.с. НИИ МГ СО РАМН, svetlana.fadyushina@medgenetics.ru.

Частоты аллелей и генотипов полиморфизма G-308A гена TNF- $\alpha$  у бурят

Район	Населенный пункт	GG	GA	AA	G	A
Джидинский (n=90)	Петропавловка (n=57)	0,70	0,25	0,05	0,8246	0,1754
	Верхний Торей (n=33)	0,82	0,18	0,00	0,9091	0,0909
	Всего по району	0,75	0,22	0,03	0,8556	0,1444
Кяхтинский (n=97)	Кяхта (n=17)	0,76	0,24	0,00	0,8824	0,1176
	Энхе-Толой (n=47)	0,83	0,15	0,02	0,9043	0,0957
	Кудара-Сомон (n=33)	0,91	0,09	0,00	0,9545	0,0455
	Всего по району	0,85	0,14	0,01	0,9175	0,0825
Кижингинский (n=270)	Кижинга* (n=75)	0,75	0,19	0,06	0,8400	0,1600
	Могсохон (n=96)	0,80	0,20	0,00	0,9010	0,0990
	Усть-Орот (n=99)	0,83	0,16	0,01	0,9091	0,0909
	Всего по району	0,80	0,18	0,02	0,8870	0,1130
Еравнинский (n=188)	Сосновоозерское (n=104)	0,81	0,18	0,01	0,8990	0,1010
	Можайка (n=54)	0,89	0,11	0,00	0,9444	0,0556
	Усть-Эгита* (n=30)	0,80	0,13	0,07	0,8667	0,1333
	Всего по району	0,83	0,15	0,02	0,9069	0,0931
Окинский (n=219)	Сорок (n=31)	0,74	0,26	0,00	0,8710	0,1290
	Орлик* (n=84)	0,82	0,14	0,04	0,8929	0,1071
	Саяны (n=40)	0,73	0,25	0,03	0,8500	0,1500
	Хужир (n=44)	0,73	0,27	0,00	0,8636	0,1364
	Хурга* (n=20)	0,70	0,15	0,15	0,7750	0,2250
	Всего по району	0,76	0,21	0,03	0,8653	0,1347
	Итого*	0,80	0,18	0,02	0,8860	0,1140

\* Выборки с отклонениями от равновесия Харди-Вайнберга, при  $P < 0,05$ ; n – количество обследованных.

нальности, проживающих в 16 населенных пунктах, расположенных в 5 районах Республики Бурятия. Джидинский и Кяхтинский районы находятся на юге Бурятии и граничат с Монголией. Еравнинский и Кижингинский районы расположены на востоке республики и имеют общую границу с Читинской областью. Перечисленные районы находятся в степной и лесостепной зонах, и доля бурят в национальном составе составляет 42-52%. В Окинском районе, сопредельном с Республикой Тыва и расположенном в горной местности (Восточные Саяны) на западе Бурятии, проживает 90% бурят. Все районы имеют автотранспортное сообщение со столицей Бурятии - городом Улан-Удэ. Образцы цельной венозной крови для исследования были собраны в ходе экспедиционных работ в 2004-2006 гг.

Материалом для исследования послужила ДНК, выделенная из крови по стандартной методике [10]. Генотипирование аллельных вариантов гена TNF- $\alpha$  осуществляли методом рестриционного анализа продуктов амплификации специфических участков генома (ПДРФ-анализ). Участок промоторного региона гена TNF- $\alpha$  амплифицировали с использованием пары специфических праймеров [18], затем продукты амплификации подвергались гидролизу эндонуклеазой рестрикции *Vsp* 19 I («Сибэнзим», г. Новосибирск), с последующей разгонкой в 8% полиакриламидном геле. Работа по выделению ДНК и генотипированию проведена на базе НИИ медицинской генетики СО РАМН.

Распределение генотипов исследо-

ванного полиморфного варианта проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга (РХВ) с помощью критерия  $\chi^2$  Пирсона [1,2]. При сравнении частот генотипов и аллелей использовали критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность. Оценку степени генетической подразделенности популяции проводили с помощью коэффициента генной дифференциации  $Gst$  [14].

### Результаты и обсуждение

Частоты генов и генотипов полиморфизма G-308A гена TNF- $\alpha$  у бурят представлены в таблице. В различных субпопуляциях бурят частота аллеля A гена TNF- $\alpha$  варьирует в интервале от 0,0455 (Кудара-Сомон, Кяхтинский район) до 0,2250 (Хурга, Окинский район). В суммарной выборке частота аллеля A составила 0,1150. Сравнение частот аллеля A, между исследованными районами Бурятии (между объединенными по районам выборками) не выявило статистически значимых отличий не в одном из случаев.

При проверке частот генотипов на соответствие равновесию Харди-Вайнберга (РХВ) в 4 населенных пунктах (Усть-Эгита (Еравнинский район), Кижинга (Кижингинский район), Орлик и Хурга (Окинский район) было выявлено значимое отличие соотношения генотипов от ожидаемого ( $p < 0,05$ ). Перечисленные населенные пункты относятся к восточным Кижингинскому и Еравнинскому и горному западному Окинскому районам, и отклонения связаны во всех случаях с недостатком гетерозигот, а также избытком гомозигот AA. Причиной отклонения может быть

небольшая численность населения и, как результат, более высокий уровень инбридинга в данных населенных пунктах. Кроме того, в некоторых случаях несоответствие РХВ может быть связано со слишком малой численностью генотипированной выборки. Для Джидинского и Кяхтинского районов, распределение генотипов во всех субпопуляционных выборках соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга. Для объединенных по районам выборок, распределение частот генотипов в каждом из 5 районов подчинялось РХВ. В то же время распределение генотипов полиморфизма G-308A гена TNF- $\alpha$  в объединенной выборке бурят (5 районов) не соответствовало РХВ ( $\chi^2 = 8,16$ ,  $P < 0,05$ ). Однако после исключения из общей группы тех выборок, в которых наблюдалось отклонение от РХВ, распределение генотипов соответствовало ожидаемому ( $\chi^2 = 0,49$ ,  $P > 0,05$ ). Подсчет коэффициентов генной дифференциации [14] для всех населенных пунктов ( $Gst = 0,0167$ ) и для 5 изучаемых районов ( $Gst = 0,0053$ ) показал, что значительной генетической подразделенности по данному полиморфизму не наблюдается. Значение показателя  $Gst$  для отдельных популяций бурят практически не отличается от полученного ранее при изучении 6 этнически различных сибирских популяций по этому полиморфизму (0,0127) [5].

Известно, что частота аллеля A полиморфизма G-308A в азиатских популяциях ниже, чем в европейских, и колеблется на уровне 2-6%, тогда как у европейцев она может достигать более 20%, согласно международной базе данных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP database) на сайте Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI) ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1800629](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1800629)). Эти исследования были выполнены в основном на выборках японцев и китайцев. В то же время, согласно данным по распространенности полиморфизма G-308A в других популяциях Сибири (Голубенко М.В., неопубликованные данные) частота аллеля A полиморфизма G-308A гена TNF- $\alpha$  у русских составляет 0,1458, у тувинцев - 0,0833, у якутов - 0,1719 (численность выборок – 96 человек для каждой этнической группы). Частота аллеля A у томских татар варьирует от 0,1 до 0,12, у алтайцев составляет 0,12, а в еще одной субпопуляции бурят достигает 0,19 [5]. В таком образом, на территории Сибири этот полиморфизм является, по-видимому, более распространенным, чем

в Восточной Азии. Сравнение частоты аллеля А у бурят с русскими и тувинцами статистически значимых различий не выявило, но было получено достоверное различие частот данного полиморфизма между бурятами и якутами ( $p < 0,05$ ). Эти результаты указывают на межэтнические различия в распространенности данного полиморфизма на территории Сибири.

#### Заключение

В настоящем исследовании дана характеристика распространенности и внутриэтнической дифференциации полиморфизма G-308A гена TNF у бурят по результатам изучения 16 субпопуляций из 5 районов Республики Бурятия. Данный полиморфизм является функционально значимым, так как для него показана ассоциация с уровнем TNF- $\alpha$ , и участвует в формировании подверженности к широкому спектру мультифакториальных заболеваний. Значительная частота аллеля А у бурят (11,5%) согласуется с данными по другим сибирским популяциям и в то же время значительно выше, чем в более южных районах Восточной Азии (Китай, Япония). Таким образом, можно предположить, что полиморфизм этого локуса вносит значимый вклад в формирование наследственной предрасположенности к различным мультифакториальным заболеваниям у бурят.

Авторы выражают благодарность сотрудникам НИИ медицинской генетики СО РАМН Л.П. Назаренко, С.В. Буйкину, Н.А. Андрейченко, В.Н. Харьков, главному врачу Детской республиканской клинической больницы Республики Бурятия А.Б.-Ж. Бимбаеву, сотрудникам Бурятского филиала НИИ медицинской генетики СО РАМН В.Б. Цыреновой, Л.Д. Мункуевой, В.Б. Аюшиной за организацию экспедиций и участие в сборе материала, а также А.Н. Кучер за помощь в статистической обработке данных.

#### Литература

1. Вейр Б. Анализ генетических данных / Б. Вейр. - М.: Мир, 1995. 400с.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин. - М.: Высшая школа, 1990. - 352 с.
3. Эпидемиологическое изучение наследственных заболеваний у сельского населения Республики Бурятия / Л.И. Минайчева [и др.] // Вестник Бурятского государственного университета. - Улан-Удэ, 2007. С. 14-16.
4. Нимаев Д.Д. Буряты: этногенез и этническая история / Д.Д. Нимаев. - Улан-Удэ: Издательско-полиграфический комплекс ВСГАКИ, 2000. - 190с.
5. Пузырев В.П. Генетическое разнообразие народонаселения и болезни человека / В.П. Пузырев, М.Б. Фрейдин, А.Н. Кучер. - Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2007. - 320 с.
6. Bazzoni F. The tumor necrosis factor ligand and receptor families / F. Bazzoni, B. Beutler // N Engl.J.Med. 1996. V. 334. P. 1717-1725.
7. Secretion of tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation topolymorphisms in the inflammatory bowel disease / Bouma G. [et al.] //Scand. J. Immunol. 1996. V. 43(4). P. 456-463.
8. Gupta V. [et al.] Association of G-308A TNF-alpha polymorphisms with bronchial asthma in a North Indian population / V. Gupta [et al.] // J Asthma. - 2005. V. 12. P. 839 - 841.
9. Polymorphisms of the tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 genes in Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy / Ito M. [et al.] // Jpn. Heart J. 2000.V.41.P. 183-191.
10. Johns M. Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place of phenol / M. Johns, J. Paulus-Thomas // Anal. Biochem. 1989. V. 180. № 2. P. 276-278.
11. Keatings V.M. A Polymorphisms in the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene promoter region may predispose to a poor prognosis in COPD / V.M. Keatings [et al.] // Chest. - 2000.V. 118.P. 971-975.
12. Mangia A. IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection / A. Mangia [et al.] // Cytokine. - 2004. V. 3.P. 103-109.
13. Nedwin G. E. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization / G. E. Nedwin [et al.] // Nucleic Acids Res. - 1985. V.13. P 6361 - 6373.
14. Nei M. Molecular population genetics and evolution / M. Nei. - Amsterdam: North Holland publishing company; New York: Oxford American Elsevier publishing company, 1975. 288 p.
15. Ramasawmy R. Association of polymorphisms within the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha with clinical outcomes of rheumatic fever / R. Ramasawmy [et al.] // J. Mol Immunol. - 2007. V. 44. P. 1873-1878.
16. Rosmond R. G-308A Polymorphisms of the tumor necrosis factor alpha gene promoter and salivary cortical secretion / R. Rosmond [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2001. V. 86.P.2178-2180.
17. Shiau M.Y. [et al.] Cytokine promoter polymorphisms in Taiwanese patients with Graves' disease / M.Y. Shiau [et al.] // J.Clin Biochem. 2007. V. 40. P. 213-217.
18. Wilson A.G. Single base polymorphisms in the human tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) gene detectable by NcoI restriction of PCR product / A.G. Wilson [et al.] // Hum. Mol. Genet. - 1992. - V.1. - P.400 c.

С.И. Семенов, М.В. Терехова, Л.Д. Индеева, Н.Н. Павлов, С.Н. Кузин, М.М. Писарева, М.П. Грудинин, Л.А. Балахонцева, Т.П. Серкина

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГЕПАТИТА С В ЯКУТИИ

УДК 578.891(571.56)

**Цель исследования.** Выявить циркуляцию генотипов вируса гепатита С у больных гепатитом С в якутской популяции.

**Материал и методы исследований.** Исследована сыворотка крови 126 больных хроническим гепатитом С, из них 42 больных с ВИЧ-инфекцией. Генотипирование вируса проводилось с применением ПЦР-тест-систем, позволяющих определить генотипы ВГС: 1a, 1b, 2, 3a.

**Результаты.** В Республике Саха заболеваемость гепатитом С не превышала среднероссийский уровень. Вирусносительство понизилось от 188,4 до 59,2 на 100 тыс.населения. Гепатит 1b вируса гепатита С выявлен у 67,4 - 76,4%, генотип 3a у 10,9 - 18,8% больных хроническим моногепатитом С. Среди больных хроническим гепатитом С с ВИЧ-инфекцией у 43% выявлен генотип 1b и у 35,7% - генотип 3a. Обнаружено сочетание различных комбинаций генотипов вируса С - 1b+3a, 1b+2a, 1b+1a, 1a+2a.

**Выводы.** Заболеваемость гепатитом С в Якутии ниже российской. Установлено, что в Якутии основными генотипами вируса С, вызывающими хронический вирусный гепатит С у населения, являются 1b (68,8-76,4%) и значительно меньше 3a (13,4-18,8%)

**Ключевые слова:** гепатит С, ОГС, хронический гепатит С, ХГС, генотип 1b, генотип 3a.

**The purpose of research.** To reveal circulation of hepatitis C virus genotypes in patients with hepatitis C in the Yakut population.

**Material and methods of research.** Blood serum of 126 patients with chronic hepatitis C, from them 42 patients with HIV-infection is investigated. Virus genotyping was held with application of PCR-test-system, allowing determining VHC genotypes: 1a, 1b, 2, 3a.

**Results.** In Republic Sakha hepatitis C morbidity did not exceed mean Russia's level. Virus carrying decreased from 188, 4 up to 59, 2 on 100 thousand population. The virus of hepatitis C is revealed in 67, 4-76, 4 %, the genotype 3a in 10,9-18,8 % of patients with chronic monohepatitis C. Among patients with chronic hepatitis C with HIV-infection in 43 % - genotype 1b is revealed and in 35,7 % - a genotype 3a. The combination of various combinations of genotypes of virus C - 1b + 3a, 1b + 2a, 1b + 1a, 1a + 2a is revealed.

**Conclusions.** Hepatitis C morbidity in Yakutia is below Russian one. It is established, that in Yakutia the basic genotypes of a virus C, causing a chronic virus hepatitis C in the population, are 1b (68, 8-76, 4 %) and much less 3a (13, 4-18, 8 %).

**Keywords:** hepatitis C, AHC, chronic hepatitis C, CHC, genotype 1b, genotype 3a.

**СЕМЕНОВ Сергей Иннокентьевич** - д.м.н., зав. группой генетич. исслед-й ФГНУ «Институт здоровья»; **ТЕРЕХОВА Маргарита Валерьевна** - врач-инфекционист, зав. поликлиникой ГУ Якутский респ. Центр по профилактике и борьбе со СПИД, terekhova\_mv@mail.ru; **ИНДЕЕВА Любовь Дмитриевна** - врач-ординатор ПИТ Якутской городской клинич. больницы, vaks@sakha.ru; **ПАВЛОВ Николай Николаевич** - к.м.н., директор ОАО «Центр иммунопрофилактики»; **КУЗИН Станислав Николаевич** - д.м.н., зав. лаб. ФГУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, Москва, drkuzin@mail.ru; **ГРУДИНИН Борис Павлович** - к.б.н., зав. НИИ гриппа РАМН, СПб.; **ПИСАРЕВА Мария Михайловна** - к.б.н., с.н.с. НИИ гриппа РАМН, Санкт-Петербург; **СЕРКИНА Тамара Павловна** - зав. лаб. Центра по профилактике и борьбе со СПИД; **БАЛАХОНЦЕВА Людмила Анатольевна** - руковод. Дальневосточного окружного Центра СПИД.

### Введение

Несмотря на то, что вирусный гепатит С (ВГС) стал доступен для изучения сравнительно недавно, его исследование можно назвать успешным. Однако по-прежнему не существует вакцины против гепатита С, а его распространенность бьет все мировые рекорды. Характерные особенности инфекции ВГС – циркуляция вируса в минимальных концентрациях и не имеющая прецедентов гетерогенность ВГС, которая является причиной его слабой иммуногенности, не приводящей к выработке полноценного протективного иммунитета. В связи с этим не исключается возможность повторного инфицирования.

По различным классификациям определяется 6, 11 и более генотипов ВГС и более 90 субтипов [9,10]. Установлены существенные различия в распространении генотипов. Так, например, в Японии, Тайване и Китае регистрируют преимущественно генотип 1b, который даже называется «японским». В США преобладает генотип 1a – «американский» [8]. На Африканском континенте встречаются все генотипы, но чаще 4-й и 5а [10]. Доминирующим в России генотипом является 1b, фиксируется повсеместно от 50-56% в Центральной России до 80-83% на Дальнем Востоке [1,3,7]. Давно показано, что наиболее тяжелое течение, высокий процент хронизации с неблагоприятным исходом в цирроз и гепатокарциному, плохой ответ на противовирусную терапию имеют больные с генотипом 1b.

Это обстоятельство определило **цель исследования** – изучить распространенность вирусного гепатита С и выявить генотипы вируса С в Якутии. Для реализации этой цели были поставлены следующие задачи: а) анализ заболеваемости вирусными гепатитами С на территории республики; б) изучение генотипов вируса гепатита С у больных хроническим гепатитом С (ХГС).

### Материалы и методы

Использованы официальные данные регистрации вирусных гепатитов в РС(Я) и статистические данные отделения вирусных гепатитов ЯГКБ. Генотипирование вируса гепатита С проводилось в лаборатории молекулярной вирусологии и геномной инженерии НИИ гриппа РАМН г. Санкт-Петербурга с применением ПЦР-тест-систем, позволяющих определять 4 генотипа ВГС: 1a, 1b, 2, 3a. В 2006 г. генотипированы 16 образцов РНК вируса у больных хроническим гепатитом С из Якутии,

выделенных посредством ПЦР. В 2008 г. у 112 больных хроническим гепатитом С, из них у 42 с ВИЧ-инфекцией, определены генотипы вируса гепатита С в ФГУН Хабаровской НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора.

### Результаты и обсуждения

Показатели заболеваемости острыми, хроническими формами гепатита С и носительства вируса гепатита С демонстрированы на рис.1. За годы наблюдения (1999-2007) заболеваемость острым гепатитом С (ОГС) в Республике Саха (Якутия) не превышала общероссийские показатели. В 1999г. на территории республики зафиксирован максимальный показатель заболеваемости ОГС - 4,8 на 100 тыс. населения. С 2000 по 2007 г. в регионе отмечаются лишь незначительные колебания показателей – 2,3-1,6-2,4 на 100 тыс. населения. По России показатели заболеваемости ОГС в 1999, 2000 и 2001 гг. в 6-7 раз были выше показателей по Якутии. Начиная с 2001г. в РФ зафиксировано общее снижение заболеваемости ОГС (16,7 на 100 тыс. населения), в 2007 г. показатель достиг минимальных значений (3,6 на 100 тыс.).

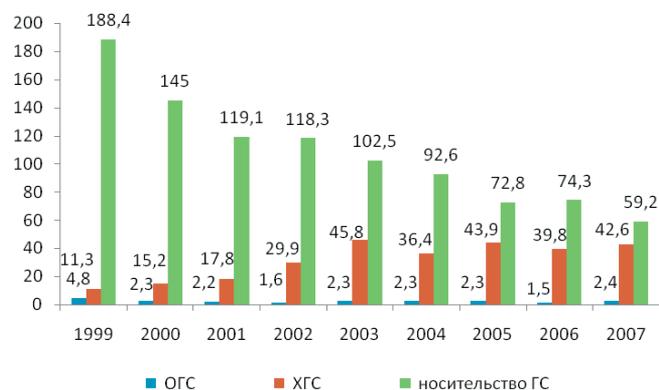
Многолетняя динамика заболеваемости хроническим гепатитом С в Якутии характеризуется разной интенсивностью эпидемиологического процесса. С 1999 г. заболеваемость ХГС постоянно росла от 11,3 на 100 тыс. населения и достигла максимального уровня 45,8 в 2003 г. С 2004 по 2007 г. сохраняется высокий уровень заболеваемости ХГС от 36,4 до 42,6. Следует также отметить, что если уровень заболеваемости ХГС в Якутии до 2002 г. не превышал уровня заболеваемости по РФ, то начиная с 2003 по 2007 г. общий уровень этого показателя был выше российского в 1,2-2 раза. Такая ситуация свидетельствует о высокой склонности к хронизации HCV-инфекции.

Об уровне носительства ВГС судят по частоте обнаружения анти-ВГС, и эпидемический процесс ВГС в регионе в основном поддерживается за счет хронических форм

заболевания. Показатели вирусоносительства в 1999 г. достигли 188,4 на 100 тыс. населения, что было в 2 раза выше среднероссийского (95,5). В последующем в Якутии отмечено значительное снижение вирусоносительства - до 59,2 на 100 тыс. в 2007 г. В РФ имела место обратная тенденция – рост показателей вирусоносительства до 2001 г. (127,0 на 100 тыс.) с последующей тенденцией к незначительному снижению (106,2 и 105,4 в 2006 и 2007 гг. соответственно). Важно отметить, что суммарный показатель заболеваемости гепатитом С в Якутии в последние годы стабильно ниже, чем среднероссийский. Так, в 2004 и 2005 гг. суммарный показатель в Якутии составлял 130,9 и 121,7 на 100 тыс. соответственно, тогда как среднероссийские показатели в эти годы составляли 173,8 и 157,1.

По данным отделения вирусных гепатитов ЯГКБ, удельный вес острого гепатита С в 2008 г. составил всего 26% (40% - острый гепатит D (ОГД) и 22% - острый гепатит В (ОГВ)). Причем в 2002 г. среди других острых вирусных гепатитов ОГС занимал последнее место и его удельный вес составлял 13,9%, после ОГВ (67,1%) и ОГД (16,4%). В дальнейшем наблюдается волнообразное повышение заболеваемости острым гепатитом С в 2 раза (13,9% - в 2002г., 26% - в 2008г.), в столько же раз снизился удельный вес ОГВ - от 67,1 до 22%.

Подобная обстановка отмечается при хронических вирусных гепатитах. Удельный вес вируса гепатита С в этиологической структуре хронических вирусных гепатитов в Республике Саха (Якутия) незначителен, всего 18,2±0,9%, тогда как наибольший удельный вес пришелся на вирусный гепатит В, чья доля составляла 32,4%, и на гепатит D (24,5%).



**Рис.1.** Многолетняя динамика показателей заболеваемости острыми и хроническими формами гепатита С и носительства гепатита С в показателях на 100 тыс. населения

По сравнению с 2002 г. в 2008 г. в этиологической структуре других хронических вирусных гепатитов удельный вес ХГС повысился в 1,6 раза, ХГВ - в полтора раза. При этом за рассматриваемый период более чем в 2 раза упал удельный вес ХГВ. Результаты исследования весьма близки к значениям, полученным на многих других территориях России и стран СНГ [2,4-6].

В РС(Я) была проведена этиологическая расшифровка на уровне генотипа вируса С у разных групп больных хроническим гепатитом С. В 2006 г. у 16 больных моноинфекцией ХГС были определены генотипы вируса гепатита С. С наибольшей частотой обнаружен генотип ВГС 1b – у 11 больных (68,7%). Еще у 3 больных тестирован генотип ВГС 3a (18,8%) и у 2 – 2a (12,5%). Каких-либо особенностей клинического течения заболевания у пациентов с различными генотипами ВГС обнаружено не было. В 2008г. Тереховой М.В с коллегами исследованы 112 сывороток крови больных хроническим гепатитом С, среди которых 42 больных были инфицированы ВИЧ-инфекцией. По результатам двух исследований в разные годы установлено, что этиологическими агентами гепатита С у больных из Якутии были генотипы 1b, 3a, 2a и разное сочетание этих генотипов. Причем генотип 1b значительно преобладал другие генотипы.

В якутской популяции с наибольшей частотой встречаются генотипы 1b и 3a у больных хроническим гепатитом С. В 68,7-76,4% образцов этиологическим фактором выступал генотип 1b вируса С, реже генотип 3a (10,9-18,8%). Генотипы 1a, 2a среди больных ХГС якутской популяции не были определены, однако у них в отличие от больных из других регионов России, зафиксировано наличие этих генотипов в разных комбинациях с другими генотипами. Важно отметить, что генотипы 3a, 2a и 2b, которые обнаруживаются в Якутии самостоятельно или в комбинации с другими генотипами, относят к редко выявляемым генотипам вируса С – 3a встречается от 5,6 до 18,9% случаев, 2a и 2b – от 4,7 до 0,5% случаев [3]. Отечественными и зарубежными авторами подтверждено, что имеется взаимосвязь между путем передачи вируса гепатита С и его генотипом. Итак, генотипы 3a (в Якутии встречаются в 13,4-18,8%) и 1a значительно чаще определяются у лиц, принимающих наркотики внутривенно, тогда как генотип 1b (в РС(Я) до 76,4%) чаще выявляется у больных хроническим гепатитом

С, заразившихся в результате медицинских парентеральных манипуляций [11-13]. Комбинация генотипа 1b с другими генотипами у пациентов хроническим гепатитом С в Якутии (1b+3a, 1b+2a, 1b+1a, 1a+2a) свидетельствует о разнообразии этиологической структуры заболеваемости, о степени тяжести клинического течения болезни и о резистентности противовирусной терапии (рис.2).

Среди хронических гепатитов С ВИЧ-инфицированные пациенты составили 42 (37,5%) чел. У них выявлены те же генотипы, что и у больных хроническим гепатитом С без ВИЧ-инфекции. Если в группе больных моноинфекцией гепатита С существенно преобладал генотип 1b – 76,4% против 13,4% генотипа 3a, то у больных хроническим гепатитом С с ВИЧ-инфекцией генетический спектр вируса С резко отличался – 43% случаев - генотип 1b и 35,7 – генотип 3a, т.е. значительно чаще и почти в равном количестве встречались данные генотипы при микст HCV- и ВИЧ-инфекции (рис.3).

Превалирование генотипа 1b можно объяснить тем, что вирус гепатита С генотипа 1b имеет более высокую вирусную нагрузку по сравнению с другими генотипами, в связи с чем труднее поддается противовирусной терапии. Поэтому, как правило, пациенты с выявленным во время беременности хроническим гепатитом С, обусловленным генотипом 1b, имеют относительно высокий уровень вируса в крови, вследствие чего возрастает риск перинатального инфицирования детей.

В настоящее время для лечения гепатита С в медицинской практике просто необходимы данные о генотипах вируса гепатита С. Практические

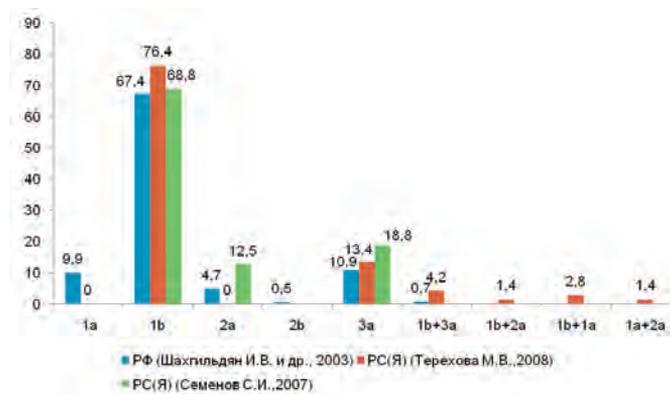


Рис.2. Структура генотипов вируса гепатита С, циркулирующих на территории Республики Саха (Якутия) и в Российской Федерации

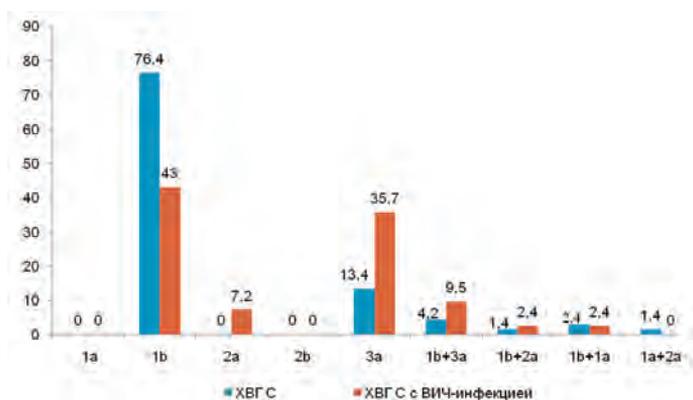


Рис.3. Генотипы вируса гепатита С у больных хроническим гепатитом С и хроническим гепатитом С с ВИЧ-инфекцией в Республике Саха (Якутия)

врачи активно используют современные методы определения генотипов вируса С и генотипирование является высокоинформативным как для терапевтического прогноза, так и для проведения эпидемиологических исследований.

Из-за разницы в объемах выборки двух исследований мы не проводили статистический анализ распределения. Эти данные требуют дальнейшей проверки на большей группе обследуемых больных из Республики Саха (Якутия). Кроме того, для подробного молекулярно-эпидемиологического анализа полученных результатов необходимо учитывать пути передачи и способы заражения вирусом гепатита С, а также возрастные особенности пациентов.

### Выводы

В результате исследований важно отметить: а) суммарный показатель заболеваемости гепатитом С в Республике Саха (Якутия) в последние годы стабильно ниже, чем среднероссийский, но сохраняется высокий уровень источников инфекции (хронических форм – 42,6 и вирусносительства

– 59,2 на 100 тыс. населения), что не снимает актуальность проблемы; б) наибольший удельный вес в этиологической структуре острых и хронических вирусных гепатитов, по данным отделения вирусных гепатитов ЯГКБ, приходится на гепатит С и D, чьи доли составили 26 и 41,2% соответственно; в) установлено, что в Якутии, также как и по всей России, основными генотипами вируса С, вызывающими хронический гепатит у населения, являются 1b (68,8-76,4%) и, значительно, меньше 3a (13,4-18,8%), но именно с генотипом 1b связаны наиболее тяжелое течение болезни, высокий процент хронизации с неблагоприятным исходом в цирроз и гепатокарциному, плохой ответ на противовирусную терапию; г) в группе больных с ВИЧ-инфекцией существенно чаще выявлялись генотипы 1b и 3a.

### Литература

1. Бахлыкова Н.Ю. Широта распространения маркеров гепатитов В и С среди населения и от-

дельных «групп риска» в среднем Приобье: автореф. дисс. ... канд. мед. наук / Н.Ю. Бахлыкова. – 1998. – 29 с.

2. Богач В.В. Вирусные гепатиты В, С и Вич-инфекция в Дальневосточном Федеральном округе / В.В. Богач, О.Е. Троценко, И.С. Старостина // Гепатит В, С и D – проблемы диагностики, лечения и профилактики: Тез. Докл. IV Российской научно-практической конференции. – М., 2001. – С.37-40.

3. Генетическое разнообразие вирусов гепатита В, С и D в различных регионах Российской Федерации / М.М. Писарева [и др.] // Актуальные вирусные инфекции – теоретические и практические аспекты. Микробиоциды для здоровья и репродукции человека. Медико-социальные проблемы сексуально-передаваемых инфекций. – СПб., 2004. – №1. – С.18-22.

4. Ершова О.Н. Современные проявления эпидемического процесса гепатита С, активность естественных путей передачи и совершенствование профилактики этой инфекции: автореф. дисс. докт. мед. наук / О.Н. Ершова. – М., 2006. – 47 с.

5. Кузин С.Н. Сравнительная эпидемиологическая характеристика гепатитов с парентеральным механизмом передачи возбудителей в России и других странах СНГ: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук / С.Н. Кузин. – М., 1998. – 52с.

6. Лисицина Е.В. Распространение HС-вирусной инфекции и отдельных генотипов вируса гепатита С в регионах с умеренной активностью эпидемического процесса: автореф. дисс. ... канд. мед. наук / Е.В. Лисицина. – М., 1998. – 31с.

7. Шахгильдян И.В. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика) / И.В. Шахгильдян, М.И. Михайлов, Г.Г. Онищенко // Москва. – ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ. – 2003. – 384с.

8. Determination of hepatitis C virus genotypes in the United States by cleavage fragment length polymorphism analyses / D.J. Marshall [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol.35, №12. – P.3156-3162.

9. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy / B. Robertson [et al.] // Arch. Virol. – 1998. – Vol.143, №12. P.2493-2503.

10. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region / P. Sammonds [et al.] // J. Gen. Virol. – 1993. – Vol.74, Pt.11. – P.2391-2399.

11. Hepatitis C virus genotypes in France: relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. The GEMHER / M. Martinot-Peignoux [et al.] // J. Virol. Hepat. – 1999. – Vol.6, №6. – P.435-443.

12. Simmonds P. SGM 2000 Fleming Lecture. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans / P. Simmonds // J. Gen. Virol. – 2001. – Vol.82. – P.693-712.

13. Trepo C. Hepatitis C virus infection in Western Europe / Trepo C., P. Pradat // J. Hepatol. – 1999. – Vol.31 (Suppl.1). – P.80-83.

И.И.Черкашина, С.Ю.Никулина, Н.И.Логвиненко, В.Н.Максимов, М.И.Воевода, Е.Д.Либердорвская

## ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ХЕМОКИНОВОГО РЕЦЕПТОРА CCR5 У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И ИХ РОДСТВЕННИКОВ

УДК: 616.248-056.7

Проведено семейное обследование 70 пробандов, у которых диагностирована бронхиальная астма (БА) и 162 их родственника I, II, III степени родства (основная группа). В контрольную группу были включены здоровые люди (n=263). В работе использован общепринятый комплекс обследования лиц, страдающих БА, молекулярно-генетические методы исследования, а также методы статистической обработки данных. Представлены результаты исследования полиморфизма гена хемокинового рецептора CCR5 в кодирующей области у больных БА и их родственников в сравнении с группой контроля. Установлено, что полиморфизм гена хемокинового рецептора CCR5 в кодирующей области ассоциирован с БА и является важной компонентой наследственной предрасположенности БА.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, генетические предикторы, метод Вайнберга, собственные исследования.

Family inspection of 70 probands with diagnosis bronchial asthma (BA) and 162 their relatives of I, II, III degrees of relationship (the basic group) is held. Healthy people have been included in control group (n=263). In work the standard complex of inspection of the persons with BA, molecular-genetic methods of research, and also methods of STATistical data processing are used. Results of research of hemokine receptor CCR5 gene polymorphism in coding area in BA patients and their relatives in comparison with control group are presented. It is established, that polymorphism of a hemokine receptor CCR5 gene in coding area is associated with BA and is important component of hereditary predisposition to BA.

**Keywords:** bronchial asthma, genetic predictors, Vainberg's method, own investigations.

Бронхиальная астма (БА) по-прежнему остается одной из актуальных

проблем пульмонологии в настоящее время. Постоянный прирост заболеваемости БА во всем мире делает актуальными исследования по изучению факторов, способствующих формированию этого заболевания. Молекулярно-генетические исследования четко показали вовлечение генетических факторов в патогенез БА [1,2,3]. Проведены сотни исследований, позволившие установить ассоциацию полиморфизма различных генов с БА [4,5,6,7].

В последнее время из генов-кандидатов БА внимание исследователей привлечено к гену хемокинового рецептора CCR5.

Белок CCR5 является членом семейства G-белок-сцепленных рецепторов с 7 трансмембранными доме-

нами [8]. Ген CCR5 локализован на 3-й хромосоме в регионе p21.3. CCR5 представляет собой трансмембранный белок с молекулярной массой 40600 Да, состоящий из 352 аминокислотных остатков. CCR5 представлен преимущественно на поверхности активированных моноцитов (макрофагов), дендритных клеток и Т-лимфоцитов памяти (CD 26<sup>high</sup>, CD 45RA<sup>+</sup>, CD 45RO<sup>+</sup>, CD 69<sup>+</sup>, CD 95<sup>+</sup>) [9].

В норме рецептор CCR5 связывает хемокиновые лиганды MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , моноцит хемотаксических белков (MCP) 2, 4, RANTES и посредством этого участвует в активации иммунокомпетентных клеток и их миграции в очаг воспаления [10].

В гене CCR5 в настоящее время

**ЧЕРКАШИНА Ирина Ивановна** – к.м.н., доцент ГОУ ВПО Красноярского ГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясеницкого, Cherkashina@list.ru; **НИКУЛИНА Светлана Юрьевна** – д.м.н., проф., проректор по учебной работе ГОУ ВПО КрасГМУ, Nikulina@mail.ru; **ЛОГВИНЕНКО Надежда Ивановна** – д.м.н., проф. ФПК ППВ ГОУ ВПО НГМУ, Новосибирск, Nadejda-Logvinenko@yandex.ru; **МАКСИМОВ Владимир Николаевич** – д.м.н., с.н.с. ГУ НИИ терапии СО РАМН, Новосибирск, Medik11@mail.ru; **ВОЕВОДА Михаил Иванович** – д.м.н., проф., директор ГУ НИИ терапии СО РАМН; **ЛИБЕРДОРВСКАЯ Евгения Дмитриевна** – врач-пульмонолог МУЗ «ГКБ №20 им. И.С. Берзона», г. Красноярск, gkb20@mail.ru.

известно более 20 мутаций и полиморфизмов.

Ген хемокинового рецептора CCR5 хорошо изучен в связи с генетически обусловленными различиями в динамике развития ВИЧ-инфекции. Клетки, имеющие рецептор CCR5, инфицируются M - тропным (Macrophage – tropic HIV - 1 strains) вариантом ВИЧ - 1, который передаётся половым путем и доминирует на ранних стадиях инфекции. Делеция 32 п.н. в позиции 794 - 825 открытой рамки считывания приводит к выпадению десяти аминокислотных остатков в области связывания поверхностных белков ВИЧ - 1 с белком CCR5 и сдвигу рамки считывания. В результате транслируется функционально неактивный рецептор, который ВИЧ-1 не может использовать в качестве корецептора для проникновения в клетку и тем самым определяет устойчивость к инфекции. В этом случае люди, гомозиготные по этой делеции, не могут заболеть СПИДом, связанным с инфекцией ВИЧ - 1, даже если они входят в группу высокого риска. [11].

Ряд авторов утверждают, что гетерозиготы обладают частичной устойчивостью к инфекции, хотя другие исследования предполагают, что чувствительность к инфекции у гетерозигот не изменена, но что развитие СПИДа у них отсрочено на 2-4 года по сравнению с гомозиготами по нормальному аллелю [11,12].

Популяционные исследования оценивали аллельную частоту CCR5d32 примерно в 10% у людей европейского генного пула (США), но не выявили каких-либо ее следов в популяциях негроидов (Центральная Африка) и монголоидов (Япония, Венесуэла), за исключением афро-американцев [11], в которых значительно примесь генов европейского происхождения. Масштабные исследования распространенности полиморфизма CCR5d32 показали наивысшую представленность (11-15%) редкого варианта аллеля с делецией на севере Европы и умеренную его частоту (2-8%) в остальной части Европы, на Ближнем Востоке и Индии. Делеция отсутствует у народов Африки, Южной и Северной Америки и в большей части Азии вне территории России [13]. Однако нахождение CCR5d32 не ограничивается населением Центральной Европы, а также обнаруживается с частотой 2-5% повсюду в Европе, на Ближнем Востоке и Индийском полуострове. Отдельные находки делеции наблюдались повсеместно в мире, но, наиболее вероятно,

что они представляют недавний поток генов европеоидов в местные популяции [13]. У коренного населения континентальной Азии делеция наблюдалась значительно реже, чем в Европе, её частота менее 5%, а в большинстве случаев отсутствовала вовсе [14].

Ряд авторов показали протективную роль делеционного аллеля гена CCR5 в отношении гипертонической болезни и ИБС [15,16,17]. Исследование в Греции не выявило ассоциации полиморфизма CCR5d32 с коронарографически подтвержденной ИБС [18].

В литературе имеются данные об ассоциации полиморфизма гена CCR5 с рассеянным склерозом [19]. Показано участие гена CCR5 в метастазировании опухолей. CCR5 функционально вовлечен в процессы естественного и специфического противоопухолевого иммунитета. Есть сведения об ассоциации делеционного аллеля CCR5del32, кодирующего функционально неактивный белок-рецептор, с прогрессированием рака молочной железы и раком легкого [20].

Изучен полиморфизм гена CCR5 и возможность его ассоциации с внебольничными пневмониями [21,22]. Авторы утверждают, что у якутов, как в популяционной выборке (0,65%), так и больных с тяжелой внебольничной пневмонией (1,45%), отмечено снижение частоты более редкого аллеля D гена CCR5 по сравнению с русскими (4,4%) в 3 раза [22].

Изучение связи гена рецептора хемокинового рецептора CCR5 с БА началось недавно. В литературе есть сведения о наличии ассоциаций полиморфизма гена CCR5 с астмой [23,24].

БА характеризуется развитием хронического воспаления, в формировании и поддержании которого вовлекаются участники воспалительного каскада, включая цитокины, ростовые факторы, ферменты, рецепторы, адгезионные молекулы и хемокины.

Известно, что инфильтрация тканей легких эозинофилами у больных астмой ассоциирована с повышенной экспрессией хемокинов CC семейства: MCP-3, MCP-4 и RANTES. Дефицит экспрессии CCR5 на клетках может снижать хемотаксический потенциал указанных хемокинов. Установлено, что нейтрализация RANTES у мышей уменьшает гиперреактивность бронхов, а у мышей с удалением гена CCR5, кодирующего белок-рецептор для RANTES, понижен уровень воспалительных клеток и их медиаторов в респираторном тракте. Эти данные подтверждают, что наличие дефектно-

го аллеля CCR5del32 может снижать риск заболевания БА [23].

Имеются сведения о более низкой частоте встречаемости делеционного аллеля гена хемокинового рецептора CCR5 у больных БА по сравнению с популяционным контролем в Западно-Сибирском регионе РФ и об ассоциации CCR5del32 с низким риском формирования БА atopического генеза [23]. Есть указания на различия распределения вариантных аллелей гена хемокинового рецептора CCR5 у больных БА atopического и смешанного генеза и разных возрастных групп [23].

В целом полиморфизм гена хемокинового рецептора CCR5 у больных БА и их родственников изучен недостаточно, его роль в патогенезе заболевания еще окончательно не определена.

**Цель** настоящего исследования - оценить частоту распределения генотипов и аллелей полиморфизма гена del32 хемокинового рецептора CCR5 у больных бронхиальной астмой и их родственников

#### Материалы и методы

Исследование проведено на материале 70 семей больных БА (всего 232 чел.) жителей г. Красноярска. В каждой семье выделялся пробанд с верифицированной БА. В основную группу вошли 70 больных с БА и 162 их родственника I, II, III степени родства, в т.ч. 81 мужчина (34,9%) и 151 женщина (65,1%). Средний возраст пробандов составил 45,65±16,34 лет; родственников 49,15±15,23 лет. Набор пробандов производился за период их стационарного лечения в пульмонологическом отделении МУЗ ГКБ №20.

Среди всех родственников были выделены лица с БА, с другими различными аллергическими заболеваниями (аллергический ринит, atopический дерматит и др.) и здоровые. В дальнейшем, для решения поставленной цели, родственники с БА (20 чел) были отнесены в группу пробандов.

Диагноз БА устанавливался в соответствии с Глобальной стратегией лечения и профилактики БА (GINA 2002 и 2006) [25,26] на основании жалоб на приступы затрудненного дыхания или приступообразный кашель, купирующиеся ингаляцией β<sub>2</sub> - агонистов, наличия обратимой бронхиальной обструкции, подтвержденной объективными методами обследования (суточный разброс ПСВ>20%, прирост ОФВ<sub>1</sub>>15%).

Среди наблюдавшихся больных диагностированы следующие формы БА (в соответствии с МКБ - 10): ал-

Таблица 1

Частоты генотипов и аллелей I/D полиморфизма гена CCR5 в популяции мужчин г. Новосибирска

Генотипы	Популяция	
	n	%
II	206	78,3
ID	56	21,3
DD	1	0,4
Аллели		
I	89,0	
D	11,0	
Соответствие ХВ	X <sup>2</sup> = 1.908, chi-sq <sub>05</sub> = 3.841	

лергическая - 60 чел. (66,7%), неаллергическая - 17 (18,9%) и смешанная - 13 (14,4%). По степени тяжести БА у 28 больных (31,1%) была легкой интермиттирующей, у 12 (13,3%) легкой персистирующей, у 34 (37,8%) среднетяжелой и у 16 пациентов (17,8%) тяжелой. Среди обследованных с легким обострением БА было 12 (13,3%), среднетяжелым - 49 (54,4%), тяжелым - 9 (10,0%) и не было обострения у 20 (22,2%) чел. Средний стаж болезни составил 12,3±6,1 лет.

Комплексное обследование включало: клиническое динамическое наблюдение; изучение клинических анализов крови, мокроты; рентгенологическое исследование органов грудной клетки и придаточных пазух носа (по клиническим показаниям); оценку параметров ФВД посредством компьютерной спирографии.

При оценке полиморфизма гена хемокинового рецептора CCR5 в кодирующей области у больных БА и их родственников в качестве контроля использовали популяционную выборку мужчин, жителей Октябрьского района г. Новосибирска (средний возраст 32,7±7,36, n=263). Данные предоставлены НИИ терапии СО РАМН (Новосибирск).

Молекулярно - генетические исследования проведены также на базе НИИ терапии СО РАМН. Для проведения молекулярно-генетического анализа были взяты образцы венозной крови в количестве 5 – 10 мл. Выделение ДНК проводили стандартным методом с фенол - хлороформной очисткой. Генотипирование осуществляли с помощью ПЦР по опубликованной методике [27].

Статистическая обработка материала проводилась с использованием пакета прикладных программ "SPSS-13" и Exsel 2002. Различия в распределении частот аллелей и генотипов гена CCR5 между группами оценивали посредством критерия  $\chi^2$ . В случае четырехпольных таблиц сравнение

Таблица 2

Распределение частоты генотипов и аллелей I/D полиморфизма гена CCR5 в исследуемых группах

Генотипы	Пробанды % (n=90)	Родственники с аллергией % (n=55)	Здоровые родственники % (n=87)	Контроль % (n=263)
II	86,7(78)	74,5(41)	85,1(74)	78,3(206)
ID	13,3(12)	23,6(13)	13,8(12)	21,3(56)
DD	0	1,8(1)	1,1(1)	0,4(1)
p	0,209	0,429	0,230	
Аллели				
I	93,3(168)	86,4 (95)	92,0(160)	89,0(468)
D	6,7 (12)	13,6(15)	8,0 (14)	11,0(58)
Двустор.тест Фишера	0,111	0,415	0,314	
Отношение шансов	0,576	0,785	0,706	
95% ДИ ОШ	0,302-1,100	0,427-1,443	0,383-1,30	

Примечание. p - уровень значимости при сравнении распределения генотипов с показателями группы контроля

выборки по частотам генотипов и аллелей применяли точный двусторонний критерий Фишера. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

Частоты генотипов I/D полиморфизма гена CCR5 в популяции мужчин г. Новосибирска находились в равновесии Харди-Вайнберга (табл.1).

Результаты анализа полиморфизма гена хемокинового рецептора CCR5 в кодирующей области среди пробандов, их родственников и контрольной группы представлены в табл.2.

Как видно из табл.2, статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей гена CCR5 между контрольной группой, выборкой пробандов и их родственниками I, II и III степени родства не получено ( $p > 0,05$ ). Частоты генотипов в группе пробандов составили 86,7% (n=78), 13,3% (n=12) и 0% для генотипов II, ID и DD. В контрольной группе частоты генотипов составили 78,3% (n=206), 21,3% (n=56) и 0,4% (n=1). По результатам исследования нами установлено, что частота носителей гомозиготного генотипа II среди пробандов была несколько выше по сравнению с контрольной выборкой.

Также отмечена явная тенденция к снижению носителей гетерозиготного генотипа ID в сравнении с группой контроля ( $p = 0,085$ ). Частота генотипов ID и DD была ниже у пробандов, чем в группе контроля ( $p = 0,09$ ).

Распределение частот генотипов гена хемокинового рецептора CCR5 в кодирующей области между выборками здоровых родственников и контрольной группы было аналогичным ( $p = 0,23$ ). Частоты генотипов гена хемокинового рецептора CCR5 в группах контроля и родственников с различными аллергическими заболеваниями не различались ( $p = 0,54$ ).

Анализ частот встречаемости аллелей в изучаемых группах позволил выявить отличие частоты аллелей в выборке пробандов от контрольной группы. Среди пробандов носители аллеля D гена CCR5 встречались в 1,6 раз реже, чем в группе контроля: 12 (6,7 %) и 58 (11,0%) соответственно ( $p = 0,091$ ; 95% ДИ 0,302-1,100).

#### Заключение

При исследовании распространенности генотипов и аллелей гена хемокинового рецептора CCR5 в кодирующей области у пробандов обнаружено снижение частоты гетерозиготного генотипа ID и редкое носительство аллеля D в сравнении с группой контроля. Носители гомозиготного генотипа DD встречались чаще среди родственников, чем в контрольной группе. Полученные данные о более низкой частоте встречаемости делеционного аллеля гена хемокинового рецептора CCR5 у больных БА по сравнению с популяционным контролем совпадают с литературными данными [23]. Они позволяют сделать вывод о том, что аллель D гена хемокинового рецептора CCR5 можно рассматривать протективным фактором в отношении развития БА.

В целом анализ литературных данных и приведенных нами собственных данных показывает, что возникновение БА во многих случаях может способствовать наследственная предрасположенность. Несомненно, что дальнейшие поиски генов-кандидатов БА остаются актуальными. Полученные данные об ассоциации аллеля D с низким риском формирования БА указывают на актуальность дальнейшего исследования связи полиморфизма CCR5 с предрасположенностью к БА.

#### Литература

1. Пузырев В.П. Молекулярные основы распространенных мультифакториальных заболева-

ний / В.П. Пузырев, В.А. Степанов, М.Б. Фрейдин // Геномика – медицине / Под ред. Иванова В.И., Киселева Л.Л. - М.: ИКЦ «Академкнига», 2005.

2. Пузырев В.П. Геномная медицина: подходы и достижения / В.П. Пузырев, С.А. Назаренко, О.Н. Одинокова, В.А. Степанов // Бюл. СО РАМН. - 2000. - 2: 107 - 112.

3. Петрова И.В. Ассоциация полиморфизма промоторной области генов NO-синтаз с развитием бронхиальной астмы / И.В. Петрова [и др.]. Пульмонология. - 2006. - 4: 52-55.

4. Пузырев В.П. Геномные исследования наследственной патологии и генетического разнообразия сибирских популяций / В.П. Пузырев, В.А. Степанов, С.А. Назаренко // Мол. биол. - 2004. - 38 (1): 129 - 138.

5. Дубаков А.В. Ассоциация полиморфизма генов IL-4 и IL-4RA с показателями вентиляционной функции легких и патогенетическими признаками atopической бронхиальной астмы в семьях / А.В. Дубаков [и др.] // Пульмонология. - 2004. - 4: 10-15.

6. Огородова Л.М. Генетические маркеры бронхиальной астмы у детей, больных atopическим дерматитом / Л.М. Огородова [и др.] // Пульмонология. - 2006. - 4: 37-40.

7. Cookson W.O.C. Genetics of asthma and allergic disease / W.O.C. Cookson, M.F. Moffatt // Hum. Mol. Genet. - 2000. - 9(16):2359-2364.

8. Combadiere C. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES / C. Combadiere [et al.] // J Leukoc Biol. - 1996. - 60(1): 147-52.

9. Samson M. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene / M. Samson [et al.] // Biochemistry. - 1996 19; 35(11): 3362-7.

10. Alkhatib G. [et al.] CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor

for macrophage-tropic HIV-1 / G. Alkhatib [et al.] // Science. - 1996 28;272(5270): 1955-8.

11. Dean M. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene M. Dean / [et al.] // Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. Science. - 1996 27;273(5283): 1856-62.

12. Samson M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene / M. Samson [et al.] // Nature. - 1996 22; 382(6593): 722-5.

13. Martinson J.J. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion / J.J. Martinson [et al.] // Nat Genet. - 1997. - 16(1): 100-3.

14. Лимборская С.А. Этногеомика и геногеография народов Восточной Европы / С.А. Лимборская, Э.К. Хуснутдинова, Е.В. Балановская. - М.: Наука. - 2002.

15. Максимов В.Н. Связь наследственной отягощенности и полиморфизма некоторых генов-кандидатов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и их факторами риска в городской популяции Западной Сибири: Дис. ...д. мед. наук / В.Н. Максимов. - Новосибирск. - 2007.

16. Gonzalez P. Genetic variation at the chemokine receptors CCR5/CCR2 in myocardial infarction / P. Gonzalez // Genes Immun. - 2001;2(4):191-5.

17. Szalai C. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients / C. Szalai // Atherosclerosis. - 2001. - 158(1): 233-9.

18. Apostolakis S. Effects of polymorphisms in chemokine ligands and receptors on susceptibility to coronary artery disease / S. Apostolakis // Thromb Res. - 2006;8.

19. Орлова Ю.Ю. Полиморфизм гена хемоки-

нового рецептора CCR5 у больных рассеянным склерозом в Сибирском регионе / Ю.Ю. Орлова // Бюллетень сибирской медицины. - 2006. - 3: 98-104.

20. Севастьянова Н.В. Полиморфизм гена хемокинового рецептора CCR5 и его взаимосвязь с опухолевыми маркерами у больных раком легкого / Н.В. Севастьянова // Российский биотерапевтический журнал: Теоретический и научно-практический журнал. - 2004;2:39.

21. Логвиненко Н.И. Некоторые особенности этиологии, клиники, влияние генетических факторов на формирование воспаления (на модели современных пневмоний в Новосибирске): Дис. ...д-ра мед. наук / Н.И. Логвиненко. - Новосибирск, 2003.

22. Егорова Н.Е. Особенности полиморфизма некоторых макрофаг специфических генов у больных с тяжелой пневмонией в условиях Севера / Н.Е. Егорова, Н.И. Логвиненко, В.Н. Максимов // 17-й Национальный конгресс по болезням органов дыхания. - СПб., 2007.

23. Васильева М.В. Генетические и иммунологические параллели у больных раком легкого и бронхиальной астмой: автореф. дис. ...канд. мед. наук / М.В. Васильева. - Томск, 2006.

24. Пузырев В.Н. Наследственность и болезни легких: учебное пособие / В.Н. Пузырев. Томск, 2007.

25. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA). Пер. с англ. - М.: Атмосфера, 2002.

26. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA). Пер. с англ. - М.: Атмосфера, 2006.

27. Yudin N.S. Distribution of CCR5-delta 32 gene deletion across the Russian part of Eurasia / N.S. Yudin [et al.] // Human Genetics. - 1998. - 102 (6): 695-698.

Н.В. Тарасенко, Е.И. Кондратьева

## АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ КАНДИДАТОВ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ КЛЕТЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

УДК: 616.379-008.64-571.27

В статье приведены результаты поиска генов кандидатов сахарного диабета 1 типа и их взаимосвязи с показателями клеточного и гуморального иммунитета. Показано, что гены *NOS1* (C3392T), *NOS3* (C-691T, VNTR, C774T, G894T), *IL1B* (+3953), *IL1RA* (VNTR), *IL4RA* (A148G) ассоциированы с заболеванием, и его осложнениями. Найденные ассоциации генов кандидатов сахарного диабета 1 типа с показателями клеточного и гуморального иммунитета доказывают вовлеченность данных систем в развитие заболевания и его осложнений.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 1 типа, гены-кандидаты, клеточный иммунитет, гуморальный иммунитет, дети и подростки.

The results of candidate genes of type 1 diabetes search and their interaction with cellular and humoral immunity parameters are shown in this article. It is revealed, that *NOS1* (C3392T), *NOS3* (C-691T, VNTR, C774T, G894T), *IL1B* (+3953), *IL1RA* (VNTR), *IL4RA* (A148G) genes are associated with disease and its complications. These associations of candidate genes type 1 diabetes with parameters cellular and humoral immunity prove an involvement of the given systems into development of type 1 diabetes and its complications.

**Keywords:** type 1 diabetes, genes-candidates, cellular immunity, humoral immunity, children and teenagers.

### Введение

В структуре эндокринных заболеваний сахарный диабет (СД) занимает лидирующее положение. Сахарный диабет 1 типа (СД1) – это аутоиммунное заболевание у генетически предрасположенных лиц, при котором длительно текущий хронический лимфоцитарный

инсулит приводит к деструкции инсулинпродуцирующих  $\beta$ -клеток островков Лангерганса с последующим развитием абсолютной инсулиновой недостаточности, приводящей к нарушению гомеостаза глюкозы и появлению клинических симптомов. Селективная органоспецифическая деструкция существенно не влияет на другие виды клеток островков Лангерганса (альфа, дельта и PP) [12]. Исследования в области эпидемиологических характеристик СД1 среди детей, проводившиеся в течение двух последних десятилетий, значительно расширили наше представление о данной проблеме. По данным International Diabetes Federation

в настоящее время в мире зарегистрировано 430.000 детей, больных диабетом. Прирост заболеваемости составляет 3% в год, ежегодно регистрируется около 65.000 новых случаев заболеваемости СД1 [8]. СД1 является многофакторным, полигенным заболеванием. Причиной СД1 не являются мутации отдельных генов, как в случае моногенных синдромов. Генетическая предрасположенность к СД1 определяется наследованием определенных аллелей обычных «здоровых» генов, которые называют этиологическими мутациями [7]. Обычно этиологические мутации широко распространены в популяции, однако каждая из мутаций

**ТАРАСЕНКО** Наталья Викторовна – к.м.н., м.н.с. НИИ медицинской генетики СО РАМН, e-mail: nataly.tarasenko@medgenetics.ru, natvt2003@mail.ru; **КОНДРАТЬЕВА** Елена Ивановна – д.м.н., зав. кафедрой ФПК и ППС ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, e-mail: elenafpk2003@mail.ru.

не приводит к развитию заболевания. Для возникновения заболевания необходимо взаимодействие, между до конца не изученными генетическими факторами и не известными факторами окружающей среды [7]. Одним из подходов изучения наследственной предрасположенности к СД1 является изучение ассоциации полиморфных маркеров генов кандидатов, продукт экспрессии которых (фермент, гормон, рецептор, структурный или транспортный белок) может прямо или косвенно участвовать в развитии патологии [7]. Установление ассоциации генов с заболеванием необходимо для понимания природы процессов, приводящих к развитию заболевания, и для оценки его индивидуального и популяционного генетического риска.

В литературе достаточно широко представлены исследования о состоянии клеточного и гуморального иммунитета при СД1. В большинстве случаев на всех этапах заболевания выявляется дисбаланс субпопуляции Т-лимфоцитов, а так же изменение их функциональной активности [5, 14, 16, 17]. На всех стадиях диабета имеет место специфическое нарушение Т-клеток и В-лимфоцитов. Многие исследователи отмечают изменение соотношения CD4 и CD8, особенно при манифестации СД1 [4, 5]. По мнению И.И. Дедова и соавт., наряду с общими иммунологическими феноменами для СД 1 типа характерна иммунологическая гетерогенность [9]. Во многих работах отмечено увеличение абсолютного и относительного количества В-лимфоцитов и их корреляция с антителами к островковым клеткам (ICA) поджелудочной железы [4, 5, 9]. В научных исследованиях описаны достаточно противоречивые сведения о состоянии гуморального иммунитета при СД1. В большинстве работ авторы описывают увеличение IgA и ЦИК. Отмечается их связь с ангиопатиями и инфекционно-воспалительными заболеваниями.

**Целью** данной работы являлся поиск полиморфных маркеров, ассоциированных с генетической предрасположенностью к СД1, на хромосомах 12q24.2-q24.3, 7q35-q36, 6p21.3, 2q14, 2q14.2, 5q31.1, 16p11.2-12.1, а также изучение показателей клеточного и гуморального иммунитета и их взаимосвязей с генами кандидатами СД1.

#### Материалы и методы

Клиническое обследование 102 детей и подростков больных СД1 (46 девочек и 56 мальчиков) проводилось на базе эндокринологического отделения Детской больницы № 1 г. Томска

(гл. врач – Карташев В.А.). Диагноз СД1 устанавливали после детального клинико-инструментального обследования в условиях специализированного стационара на основании Федеральной целевой программы «Сахарный диабет» (2002). Критерием диагностики нефропатии у детей служила классификация С. Mongesen и соавт., 1983 [цит. по 9]. Стадию микроальбуминурии диагностировали при уровне альбуминурии от 30 до 300 мг в сутки, стадию протеинурии - при уровне альбуминурии более 300 мг в сутки [цит. по 9]. Для диагностики диабетической ретинопатии использовали критерии Е. Kohnег и М. Porta, 1992 [цит. по 9]. Диагностика диабетической нейропатии основывалась на классификации D. Nathan, 1993 [цит. по 9].

Исследование клеточного и гуморального иммунитета проводилось на базе иммунологической лаборатории (зав. лабораторией – д.м.н. Петровский Ф.И.) ЦНИЛ СибГМУ и включало определение популяций и субпопуляций лимфоцитов цитотоксическим методом. Определение иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови проводили по методу G. Manchini (1965) [13]. Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов в крови больных определяли методом Гриневич, Алферова (1981) [2]. Контрольную группу составили 30 здоровых детей и подростков (средний возраст 13,2±0,6).

ДНК выделяли по стандартной неэнзиматической методике из лимфоцитов периферической крови, взятой из кубитальной вены [6]. Выделенную ДНК замораживали и хранили при -20°C до проведения генотипирования.

Всего было изучено 10 полиморфных маркеров 7 генов кандидатов СД1. Анализ полиморфных вариантов исследуемых генов проводили с помощью амплификации соответствующих участков генома методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в геномной базе данных (GDB) и литературе (табл.1).

Смесь для ПЦР содержала 0,5–1,5 мкл специфической пары праймеров концентрацией 1 о.е./мл, 1–

1,5 мкл 10х буфера для амплификации с концентрацией MgCl<sub>2</sub> 0.5-2.0 mM 0,5-2,0 е.а. Таq ДНК-полимеразы («Сибэнзим», «Медиген», Новосибирск) и 100-200 нг геномной ДНК. Смесь помещали в 0,5 мл пробирки типа «Эппендорф», наслаивали сверху минеральное масло для предотвращения испарения и амплифицировали в автоматических минициклерах «MJ Research» (США), «БИС 108» и «Терцик» (Россия). Программа амплификации включала предварительную денатурацию при 94°C в течение 5 минут, с последующими 30-35 циклами, состоящими из отжига при специфической для каждой пары праймеров температуре (1 мин), элонгации цепи ДНК при 72°C (45 с) и ее денатурации при 94°C (45 с). Программу завершала финальная элонгация при 72°C в течение 3 минут. При ПДРФ-анализе продукты амплификации обрабатывали соответствующими рестриктазами при оптимальной для фермента температуре в течение 16-24 часов. Рестрикционная смесь включала 5-10 мкл амплификата, 1,0-1,4 мкл x10 буфера для рестрикции («Сибэнзим», Новосибирск) и 1-8 единиц активности фермента (в зависимости от эффективности его работы). Продукты рестрикции фракционировали в 3% агарозном геле при напряжении 90-120В в течение 35-70 минут или при напряжении 90-120В в течение 35-100 минут в 8-10% полиакриламидном геле. Фрагменты ДНК визуализировали в УФ-свете с применением компьютерной видеосъемки на приборе «Biorad» (США).

В качестве популяционного контроля использовали группу неродственных индивидов, составивших банк ДНК ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН. Общая численность контрольной выборки составила 243 человека русской национальности, проживающих в г. Томске (средний возраст 44,3±0,7 лет).

Распределение генотипов исследованных полиморфных локусов про-

Таблица 1

Характеристика исследуемых полиморфизмов

Ген	Полиморфизм	Локализация в гене	Фермент рестрикции	Литература
<i>NOS1</i>	<i>C3392T</i>	Экзон 18	<i>Dra III</i>	Leveqque et al., 2003
<i>NOS3</i>	<i>C(-691)T</i>	Промотор	<i>Fsp4H I</i>	Novoradovsky et al., 1999
	<i>C774T</i>	Экзон 6	<i>Fok I</i>	
	<i>G894T</i>	Экзон 7	<i>FriO I</i>	
	<i>VNTR4A/B</i>	Инtron 4	-	
<i>IL1B</i>	<i>(+3953) A1/A2</i>	Экзон 5	<i>TaqI</i>	Wilkinson et al., 1999
<i>IL1RN</i>	<i>VNTR</i>	Инtron 2	-	Tarlow et al., 1993
<i>IL4</i>	<i>G717C</i>	3'-UTR	<i>Vne I (ApaL I)</i>	Пузырев и др., 2002
<i>IL4RA</i>	<i>A148G</i>	Экзон 3	<i>Rsa I</i>	Noguchi, 1999
<i>TNFA</i>	<i>G(-308)A</i>	Промотор	<i>Bsp19I</i>	Patel et al., 2000

веряли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера [1]. Для оценки ассоциаций полиморфных вариантов генов с патологическим фенотипом рассчитывали показатель отношение шансов (OR) [15]. Для поиска ассоциации патологии с генетическими маркерами был использован критерий, оценивающий отклонения передачи исследуемого аллеля от гетерозиготных родителей потомкам – Transmission/Disequilibrium Test (TDT) [11]. Для оценки связи количественных, патогенетически значимых для СД 1 типа признаков с исследуемыми генетическими маркерами использовали сравнение средних значений метрических показателей у носителей разных генотипов с помощью непараметрических тестов Манна-Уитни (при сравнении двух групп) и Краскела-Уоллиса (при сравнении трех групп). Статистически значимыми считали различия при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и обсуждение**

Для большинства полиморфных вариантов генов *NOS1*, *NOS3*, *TNFA*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4* и *IL4RA* распределение генотипов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга за исключением полиморфного маркера *C3392T* гена *NOS1* ( $X^2=4,210$ ;  $p<0,05$ ) за счет избытка гетерозигот и полиморфного маркера *VNTR4A/B* ( $X^2=3,106$ ;  $p<0,05$ ) гена *NOS3* за счет недостатка гетерозигот. Получены ассоциации с СД1 для следующих генетических маркеров: аллель С полиморфизма *C3392T* гена *NOS1* (OR=1,47; 95%CI: 1,05-2,04;  $p=0,02$ ), аллель С полиморфизма С(-691)Т (OR=1,72; 95%CI: 1,09-2,73;  $p=0,02$ ), аллель С полиморфизма *C774T* (OR=1,75; 95%CI: 1,05-2,91;  $p=0,03$ ), аллель G полиморфизма *G894T* гена *NOS3* (OR=1,49; 95%CI: 1,09-2,05;  $p=0,01$ ), аллель А2 полиморфизма +3953 А1/А2 гена *IL1B* (OR=1,52; 95%CI: 1,02-2,26;  $p=0,04$ ), аллель А2 *VNTR* полиморфизма гена *IL1RA* (OR=1,78; 95%CI: 1,07-2,97;  $p=0,02$ ). С помощью TDT-теста установлены ассоциации аллеля В *VNTR4A/B* полиморфизма (3,84;  $p=0,05$ ), аллеля С полиморфизма *C774T* (4,22;  $p=0,03$ ), аллеля G полиморфизма *G894T* (3,88;  $p=0,05$ ) гена *NOS3*, аллеля А полиморфизма *A148G* гена *IL4RA* (5,56;  $p=0,02$ ) с заболеванием. Для сосудистых осложнений с помощью TDT-теста получены следующие ассоциации: аллель В полиморфизма *VNTR4A/B* (4,50;  $p=0,03$ ) и аллель G варианта *G894T* (4,32;  $p=0,04$ ) гена *NOS3* ассоциированы с диабетической нефропатией;

аллель С полиморфизма *C3392T* гена *NOS1* (4,69;  $p=0,03$ ) и аллель В полиморфизма *VNTR4A/B* гена *NOS3* (4,50;  $p=0,03$ ) ассоциированы с диабетической полинейропатией; аллель А полиморфного маркера *A148G* гена *IL4RA* ассоциируется с диабетической ретинопатией (4,22;  $p=0,04$ ), диабетической нефропатией (4,97;  $p=0,03$ ), диабетической полинейропатией (3,84;  $p=0,05$ ) и с сочетанием трех осложнений (4,27;  $p=0,04$ ).

В связи с аутоиммунным характером заболевания изучение особенностей иммунного статуса у больных с СД1 привлекает внимание исследователей на всех стадиях болезни. Нами проведено комплексное исследование иммунного статуса у 102 детей и подростков больных СД1, включающее характеристику клеточного и гуморального иммунитета. Характеристика показателей иммунного статуса у детей с СД1 представлена в табл.2. Результаты проведенного исследования показали, что у детей и подростков с СД1 зарегистрировано низкое количество Т-лимфоцитов (CD3,  $p<0,05$  и CD4,  $p<0,01$ ), тенденция к увеличению содержания CD72 и повышение их функциональной активности за счет избыточного образования циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) ( $p<0,01$ ).

У мальчиков отмечены более высокие показатели содержания CD72 и уровня IgA, IgG и ЦИК, чем у девочек с диабетом, но без достоверно значимой разницы. В дальнейшем все дети с СД1 были объединены в одну группу (табл. 2).

Анализ иммунологических индексов у детей с диабетом выявил следующие особенности (табл. 3). Отмечалось снижение соотношения CD4/CD8 ( $p<0,05$ ), за

счет уменьшения CD4. Лейко-Т-лимфоцитарный индекс у детей с диабетом был достоверно повышен ( $p<0,05$  - для мальчиков и  $p<0,01$  - для девочек), что указывало на наличие Т-клеточного дефицита. Лейко-В-клеточный индекс у больных детей достоверно не отличался от показателей контрольных групп. Соотношение содержания иммуноглобулинов к количеству CD72 у детей с СД1 было также повышено, но достоверно значимые различия зарегистрированы только для индексов IgA/CD72 и IgM/CD72.

Показатели иммунного статуса у детей с СД1 были изучены в зависимости от давности диабета, фазы заболевания и наличия осложнений. Анализ иммунного статуса у больных с СД1 в зависимости от давности заболевания выявил следующие особенности (табл.4). На первом году заболевания было понижено общее количество лейкоцитов, лимфоцитов, Т- и В-лимфоцитов. Вследствие этого повышались иммунологические индексы, что свидетельствовало о напряженной работе этих клеток в данный период. Других особенностей изучаемых показателей в зависимости от давности патологического процесса не выявлено.

Зависимости показателей иммунного статуса от степени компенсации

**Таблица 2**

**Иммунологические показатели у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа (X±m)**

Показатель	Сахарный диабет 1 типа			Контроль
	Все дети и подростки	Девочки	Мальчики	
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	5,85±0,24	5,69±0,36	5,97±0,31	5,78±0,46
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	2,22±0,11	2,18±0,18	2,89±0,20	2,54±0,32
CD <sub>3</sub> <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	1,02±0,09*	0,82±0,09*	1,10±0,10	1,36±0,14
CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	0,35±0,03**	0,35±0,04**	0,35±0,03**	0,89±0,13
CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	0,45±0,04	0,46±0,08	0,43±0,05	0,41±0,08
CD <sub>72</sub> <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	0,61±0,05	0,56±0,08	0,64±0,07	0,50±0,14
ЦИК, о.е.	52,70±3,17**	48,79±4,17**	55,69±4,63**	26,37±5,47
Ig A, г/л	2,03±0,11*	1,97±0,12	2,08±0,16**	1,46±0,24
Ig M, г/л	1,56±0,07	1,61±0,10	1,52±0,09	1,11±0,28
Ig G, г/л	12,30±0,43	11,64±1,47	12,82±0,59*	10,07±1,55

Примечание. В табл. 2-3 \* -  $p<0,05$ , достоверность различия по сравнению с контролем, \*\* -  $p<0,01$ , достоверность различия по сравнению с контролем.

**Таблица 3**

**Характеристика иммунологических индексов у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа (X±m)**

Показатель	Сахарный диабет 1 типа			Контроль
	Все дети и подростки	Девочки	Мальчики	
CD4/CD8	0,97±0,11*	1,04±0,21*	0,92±0,12*	2,26±0,19
L/CD3	8,17±0,54**	7,41±0,50*	8,70±0,88**	4,26±0,97
L/CD72	12,25±0,83	14,40±1,36	10,71±1,01	11,58±0,72
IgA/CD72	4,18±0,40**	4,71±0,68**	3,80±0,48	2,92±0,91
IgM/CD72	3,37±0,30**	4,27±0,55**	2,75±0,30	2,22±0,42
IgG/CD72	24,90±2,15	28,89±3,79	22,44±2,54	20,17±2,42

Таблица 4

Состояние иммунного статуса у детей с сахарным диабетом в зависимости от давности заболевания ( $X \pm m$ )

Показатель	Продолжительность заболевания			
	До 1 года	От 1 до 3 лет	От 3 до 5 лет	Более 5 лет
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	3,95±0,26	6,46±0,71	5,96±0,42	6,30±0,70
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	1,30±0,36 p1-3<0,05	2,36±0,28	2,37±0,16	2,16±0,17
CD72, %	13,50±0,50 p1-2<0,05 p1-3<0,05 p1-4<0,05	25,11±2,94	26,93±2,32	25,18±1,82
CD72, $10^9/\text{л}$	0,18±0,05	0,64±0,14	0,67±0,10	0,60±0,08
CD3, %	32,75±1,18	30,16±2,89 p2-3<0,05	39,48±2,87 p3-4<0,05	33,06±1,73
CD3, $10^9/\text{л}$	0,42±0,11 p1-2<0,05 p1-3<0,01 p1-4<0,05	0,74±0,13	1,00±0,12	0,74±0,09
CD4, %	19,00±6,00	13,41±2,18	16,41±1,72	15,73±1,33
CD4, $10^9/\text{л}$	0,27±0,04	0,29±0,04	0,41±0,05	0,34±0,04
CD8, %	13,00±2,80	17,42±2,60	21,69±2,62	18,43±1,39
CD8, $10^9/\text{л}$	0,19±0,08	0,46±0,12	0,53±0,08	0,42±0,06
CD4/CD8	1,22±1,00	2,03±1,16	1,18±0,24	1,00±0,14
Лейкоциты/CD3	10,58±1,72	11,90±1,82 p2-3<0,05	8,11±0,94	11,03±0,95
Лейкоциты/CD72	26,17±4,95 p1-3<0,001 p1-4<0,05	15,79±2,46	12,15±1,23	14,65±1,47
IgA/CD72	8,60±1,95 p1-3<0,001	5,00±1,01	3,80±0,41	6,12±0,84
IgM/CD72	6,41±1,30 p1-2<0,05 p1-3<0,05 p1-4<0,05	3,66±0,69	3,71±0,52	4,49±0,54
IgG/CD72	48,24±10,01	35,70±6,70	26,76±4,30	31,60±4,08
ЦИК, ед	43,75±7,47	48,37±6,71	54,35±6,99	54,20±4,51
IgA, г/л	1,39±0,30	1,96±0,28	1,94±0,18	2,17±0,16
IgM, г/л	1,04±0,21 p1-3<0,05	1,41±0,16	1,70±0,14	1,58±0,09
IgG, г/л	12,70±2,45	12,67±1,09	11,88±0,79	12,39±0,67

Примечание: p – достоверность различия показателей между группами; p1-2 – достоверность различия показателей между группами с длительностью СД 1 до 1 года и от 1 до 3 лет; p1-3 – достоверность различия показателей от 3 до 5 лет; p1-4 – достоверность различия показателей до 1 года и более 5 лет; p2-3 – достоверность различия показателей от 1 до 3 лет и более 5 лет; p3-4 – достоверность различия показателей между группами с длительностью СД 1 от 3 до 5 лет и более 5 лет.

СД1 не установлено и, в связи с этим, статистические данные нами не приводятся. Характеристика иммунологических показателей детей и подростков с сахарным диабетом в зависимости от наличия неспецифических (бактериальных) и специфических осложнений (диабетическая нефро- и ретинопатии) представлена в табл.5. Иммунный статус у детей с неспецифическими осложнениями характеризовался достоверно низким соотношением CD4/CD8, увеличением индексов L/CD3, IgM/CD72 и IgG/CD72 ( $p < 0,05$  для всех по-

казателей), повышением содержания ЦИК ( $p < 0,05$ ) и IgM ( $p < 0,001$ ) по сравнению с показателями больных без осложнений. Развитие специфических осложнений ассоциировалось со снижением соотношения CD4/CD8 и уровня ЦИК. Снижение уровня последних, вероятно, связано с их осаждением на сосудистой стенке.

Таким образом, для СД1 у детей характерны выраженная депрессия Т-клеточного иммунитета и повышение активности гуморального звена иммунной системы. Наиболее выраженные изменения со стороны иммунитета имели место на первом году заболевания, прогрессировали при развитии осложнений.

Дети и подростки с СД1 носители

Таблица 5

Состояние иммунного статуса у детей с сахарным диабетом 1 типа в зависимости от осложнений ( $X \pm m$ )

Показатель	Без осложнений	Микроангиопатии	Неспецифические осложнения
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	6,27±0,62	5,78±0,39	6,54±0,77
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	2,29±0,15	2,09±0,21	2,19±0,25
CD72, %	25,86±1,48	22,40±2,38	29,40±5,04
CD72, $10^9/\text{л}$	0,64±0,07	0,52±0,11	0,69±0,16
CD3, %	34,90±1,64	33,39±2,28	32,70±5,75
CD3, $10^9/\text{л}$	0,84±0,08	0,73±0,12	0,80±0,21
CD4, %	15,72±1,27	15,89±1,57	13,67±2,73
CD4, $10^9/\text{л}$	0,35±0,03	0,37±0,06	0,34±0,09
CD8, %	18,95±1,56	17,81±1,52	21,67±4,04
CD8, $10^9/\text{л}$	0,49±0,06	0,35±0,05	0,48±0,12
CD4/CD8	1,45±0,21 p1-2<0,05; p1-3<0,01	1,09±0,13 p2-3<0,05	0,58±0,16
Лейкоциты/CD3	9,58±0,80 p1-3<0,05	10,61±0,84	14,39±3,54
Лейкоциты/CD72	13,55±1,15	16,81±2,00	14,92±3,48
IgA/CD72	4,94±0,54	6,16±0,98	5,55±2,23
IgM/CD72	3,69±0,37 p1-3<0,05	4,63±0,62	5,89±1,58
IgG/CD72	29,57±3,09	33,07±4,55	36,18±13,66
ЦИК, ед	53,60±4,24 p1-3<0,05	44,94±4,41 p2-3<0,05	71,50±13,23
IgA, г/л	2,01±0,15	2,03±0,18	2,18±0,32
IgM, г/л	1,45±0,09 p1-3<0,001	1,54±0,11 p2-3<0,001	2,27±0,13
IgG, г/л	12,59±0,61	11,80±0,81	12,24±1,24

Примечание: p1-2 – достоверность различия показателей между группами без осложнений и с микроангиопатиями; p1-3 – достоверность различия показателей между группами без осложнений и неспецифическими осложнениями; p2-3 – достоверность различия показателей между группами с микроангиопатиями и неспецифическими осложнениями.

казателей), повышенным содержанием ЦИК ( $p < 0,05$ ) и IgM ( $p < 0,001$ ) по сравнению с показателями больных без осложнений. Развитие специфических осложнений ассоциировалось со снижением соотношения CD4/CD8 и уровня ЦИК. Снижение уровня последних, вероятно, связано с их осаждением на сосудистой стенке.

генотипа AA полиморфизма G(-308)A гена *TNFA* имели низкие показатели лейкоцитов по сравнению с носителями генотипов GG и GA ( $p = 0,032$ ) и контрольной группой ( $p < 0,05$ ), что отражает снижение активности клеточного звена иммунитета при диабете (табл.6). Больные СД1 носители генотипа AA полиморфизма A148G гена *IL4RA* имели повышенное содержание IgG в сыворотке крови по сравнению с носителями генотипов AG и GG (табл.6). Известно, что антитела IgG играют значительную роль в развитии сахарного диабета 1 типа [4]. В нашем исследовании аллель A полиморфизма A148G гена *IL4RA* ассоциирован с развитием СД1, его сосудистыми осложнениями (ДР, ДН, ДНП) и их сочетанием. Для полиморфизма +3953 A1/A2 гена *IL1B* получено две ассоциации: носители генотипа A2A2 имели повышенное содержание IgA ( $p = 0,017$ ) и показатель иммунологического индекса IgA/CD72 ( $p = 0,005$ ) (табл. 6). Нами

Таблица 6

Средний уровень показателей клеточного и гуморального иммунитета больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от генотипов полиморфизмов исследуемых генов кандидатов ( $X \pm m$ )

Ген/Полиморфизм	TNFA (G(-308)A)				
	Генотипы	GG+GA	AA	p	
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л		5,32±0,27	3,98±0,09	0,032	
Ген/Полиморфизм	IL4RA (A148G)				
	Генотипы	AA	AG+GG	p	
IgG, г/л		15,22±0,30	12,70±0,05	0,050	
Ген/Полиморфизм	IL1B (+3953 A1/A2)				
	Генотипы	A1A1	A1A2	A2A2	p*
IgA, г/л		1,22±0,01	1,58±0,06	3,06±0,12	0,017
IgA/CD72		2,51±0,03	5,17±0,10	6,53±0,23	0,005

Примечание: p – достигнутый уровень значимости для теста Манна-Уитни; p\* – достигнутый уровень значимости для теста Краскелла-Уолиса.

установлено что аллель A2 ассоциирован с СД 1 типа (p=0,040). Влияние полиморфизма +3953 A1/A2 гена *IL1B* (генотип A2A2) может, вероятно, приводить к изменению функции клеточного иммунитета, что, в свою очередь, сказывается на клинической картине СД 1 типа [3].

#### Выводы

1. Изученные полиморфные маркеры генов синтаз оксида азота (*NOS1*, *NOS3*) и цитокинов (*IL1B*, *IL1RN*, *IL4RA*) ассоциированы с развитием СД1 и его осложнений.

2. Иммунный статус детей и подростков с СД1 характеризовался повышением активности гуморального звена иммунитета, выраженной депрессией Т-клеточного звена иммунитета, на-

рушении м соотношения субпопуляций Т-лимфоцитов CD4/CD8, что имеет значение для формирования микроангиопатий.

3. Найденные ассоциации генов кандидатов СД1 с показателями клеточного и гуморального иммунитета доказывают вовлеченность данных систем в развитие заболевания и его осложнений.

#### Литература

1. Вейр Б. Анализ генетических данных / Б. Вейр. – М.: Мир, 1995. – 400 с.
2. Гриневиц Ю.А. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных / Ю.А. Гриневиц, А.Н. Алферов // Лабораторное дело. 1981. № 8. С. 493-496.
3. Громова А.Ю. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека / А.Ю. Громова, А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4. – № 2. – С. 3-12.
4. Иммуногенетика сахарного диабета 1-го типа / Р.М. Хаитов [и др.] // Иммунология. – 2008. – №4. – С. 233-237.
5. Крюкова Е.В. Особенности иммунитета у детей и подростков с разной продолжительностью сахарного диабета 1 типа / Е.В. Крюкова [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2000. – Т. 46. – №3. – С.7-10.
6. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. / Т.

Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.

7. Носиков В.В. Генетика сахарного диабета типа 1 / В.В. Носиков // Геномика – медицине. Научное издание / Под ред. академика РАМН В.И. Иванова и академика РАН Л.Л. Киселева. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. – С. 281-311.

8. Сахарный диабет 1-го типа у детей Российской Федерации: распространенность, заболеваемость, смертность / Л.Н. Щербачева [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2007. – Т. 53. – № 2. – С. 24-29.

9. Сахарный диабет у детей и подростков / И.И. Дедов [и др.]. – М., 2002. – 391 с.

10. Хаитов Р.М. Динамика нарушений показателей клеточного и гуморального иммунитета у больных инсулинозависимым сахарным диабетом / Р.М. Хаитов, И.И. Дедов, С.В. Брыкова // Проблемы эндокринологии. – 1992. – Т. 38. – №2. – С.8-12.

11. Allison D.P. Transmission/Disequilibrium Test for quantitative traits / D.P. Allison // Am.J.Hum. Genet. – 1997. – V. 60. – P. 676-690.

12. Jasinski J.M. Insulin as primary auto-antigen for type 1A diabetes / J.M. Jasinski, G.S. Eisenbarth // Clin. Dev. Immunol. – 2005. – V. 12. – P. 181-186.

13. Mancini G. Immunochemical quantitation of antigens by single radial diffusion / G. Mancini // Immunochem. – 1965. – V. 2 – № 3. – P. 235-236.

14. Pakala S.V. T helper 2 (Th2) T cells induce acute pancreatitis and diabetes in immunocompromised nonobese diabetic (NOD) mice / S.V. Pakala, M.O. Kurrer, J.D. Katz // J. Exp. Med. – 1997. – V. 186. – № 2. – P. 299-306.

15. Pearce N. What does the odds ratio estimate in a case-control study? / N. Pearce // Int. J. Epidemiol. – 1993. – V. 26. – P. 1189-1192.

16. Rabinovitch A. Immunoregulation by cytokines in autoimmune diabetes / A. Rabinovitch // Adv. Exp. Med. Biol. – 2003. – V. 520. – P. 159-193.

17. Rabinovitch A. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus / A. Rabinovitch, W.L. Suarez-Pinzon // Biochem. Pharmacol. – 1998. – V. 55. – № 8. – P. 1139-1149.

18. Roep B.O. Animal models have little to teach us about type 1 diabetes: 1. In support of *tHIS* proposal / B.O. Roep, M. Atkinson // Diabetologia. – 2004. – V. 47. – № 10. – P. 1650-1656.

## Н.А. Соловьева, Л.Е. Николаева, Н.Р. Максимова СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-5, α- И β-ЦЕПИ ЕГО РЕЦЕПТОРА С АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ У ДЕТЕЙ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК: 575.577.2.616.2

Представлены результаты анализа ассоциации полиморфных вариантов генов интерлейкина-5 (*IL5*), α- и β-цепи его рецептора (*IL5RA*, *IL5RB*) с бронхиальной астмой (БА). Исследование проведено в группе из 103 неродственных больных atopической БА, якутов по этнической принадлежности, и 223 здоровых неродственных якутов. В группе больных БА выявлено преобладание аллеля *IL5Rβ* \*G1972 полиморфного варианта G1972A гена *IL5Rβ* и генотипа *IL5Rβ* \*G/\*G. Статистически значимые величины по повышенному риску развития БА были отмечены для генотипа *IL5Rα* \*G/\*A полиморфного варианта G-80A гена *IL5Rα*. Полиморфный вариант C-703T гена *IL5* с риском развития atopической БА в якутской популяции ассоциирован не был.

**Ключевые слова:** гены, интерлейкины, atopическая бронхиальная астма, якуты.

Results of the analysis of association of polymorphic variants of genes interleukine-5 (*IL5*), α- and β – linkage of its receptor (*IL5RA*, *IL5RB*) with bronchial asthma (BA) are presented. Research is spent in group of 103 unrelated patients with atopical BA, Yakuts on ethnicity and 223 healthy unrelated Yakuts. In group of BA patients prevalence of allele *IL5Rβ* \*G1972 polymorphic variant G1972A of gene *IL5Rβ* and genotype *IL5Rβ* \*G/\*G is revealed. Statistically significant values on the raised risk of BA development have been noted for genotype *IL5Rα* \*G/\*A polymorphic variant G-80A of gene *IL5Rα*. Polymorphic variant C-703T of gene *IL5* with risk of atopical BA development in the Yakut population was not associated.

**Keywords:** genes, interleukines, atopical bronchial asthma, Yakuts.

**СОЛОВЬЕВА Наталья Алексеевна** – м.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, sonata608@yandex.ru; **НИКОЛАЕВА Лена Егоровна** – зав.пульмонологическим отд. РБ №1 НЦМ РС(Я), тел./факс: (4112) 39-55-96; **МАКСИМОВА Надежда Романовна** – к.м.н., гл.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН.

#### Введение

Бронхиальная астма (БА) – хроническое заболевание дыхательных путей с участием таких клеток, как эозинофилы, Т-лимфоциты, тучные клетки, а также медиаторы аллергии и воспа-

ления, сопровождающееся гиперреактивностью и вариабельной активной обструкцией бронхов [1].

БА у детей принадлежит к числу распространенных аллергических болезней. За последние годы в мире, в

том числе и в России, отмечается тенденция к увеличению заболеваемости БА среди детей и ее более тяжелому течению. Эпидемиологические исследования последних лет свидетельствуют, что от 4 до 8% населения страдают данным заболеванием. Во взрослой популяции этот процент колеблется в пределах 5, тогда как в детской он повышается до 10. Распространенность БА у детей варьирует в различных странах и популяциях, однако среди хронических патологий она, безусловно, является одной из самых частых [2].

Факторы, определяющие развитие БА, отличаются многообразием и подразделяются на 2 большие группы – генетические и средовые. Их взаимодействие определяет начало манифестации болезни и особенности ее клинического проявления [8].

Решающая роль в развитии воспалительной реакции бронхов принадлежит цитокиновой системе. Известно, что цитокины участвуют в передаче сигналов между клетками иммунной системы и клетками других органов и тканей. Состояние стабильности системы цитокинов в организме легко нарушается такими факторами, как инфекция, радиация, УФ-облучение, гипертермия, токсины, гормоны и др. [5].

**Целью** данной работы было изучение ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов: интерлейкина-5 *IL5* (*C703T*),  $\alpha$ -цепи рецептора интерлейкина-5 *IL5RA* (*G80A*) и  $\beta$ -цепи рецептора интерлейкина-5 *IL5RB* (*G1972A*) с atopической БА у детей в якутской популяции.

#### Материалы и методы

Клиническая часть исследования и сбор материала осуществлены на базе пульмонологического отделения Республиканской больницы №1 Национального центра медицины (г. Якутск) в период с 2004 по 2007 гг. Под наблюдением находились 103 пациента в возрасте от 6 до 15 лет ( $\pm SD=9,83\pm 3,284$ ) с диагнозом atopическая БА, якуты по этнической принадлежности, проживающие в разных районах Республики Саха (Якутия). Пациентам проведено комплексное клинико-функциональное обследование. Диагноз БА установлен на основании критериев, изложенных в национальных согласительных документах [3]. В контрольную выборку были включены практически здоровые дети (223 чел.), сопоставимые по возрасту ( $\pm SD=17,83\pm 9,106$ ), этнической принадлежности и месту рождения с

группой пациентов. Протокол исследования утвержден локальным комитетом по биомедицинской этике при ЯНЦ КМП СО РАМН.

Молекулярно-генетическое исследование проведено на базе отдела молекулярной генетики ЯНЦ КМП СО РАМН. Молекулярно-генетический анализ включал исследование полиморфизмов гена *IL5* (*C703T*),  $\alpha$ -цепи рецептора *IL5RA* (*G80A*) и  $\beta$ -цепи рецептора *IL5RB* (*G1972A*). Генотипирование индивидов осуществляли путем анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) продуктов ПЦР-амплификации специфических участков генома. Для генотипирования использовали образцы ДНК, выделенные из цельной венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции [11]. Для ПЦР использовали последовательности праймеров, описанные в литературе [4]. Смесь для ПЦР содержала 2,5 пмоль специфических праймеров; 1,2-2,0 мкл 10x буфера для амплификации; смесь dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP по 200 мкМ каждого); 0,5 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск) и 100-200 нг геномной ДНК. Программа амплификации включала денатурацию при 94°C в течение 5 мин. с последующими 30 циклами отжига при специфической для каждой пары праймеров температуре (1 мин.), элонгации цепи при 72°C (45 с) и денатурации при 94°C (45 с). Программу завершала элонгация при 72°C в течение 3 мин. Амплификат подвергали гидролизу соответствующей эндонуклеазой [4] при оптимальной для фермента температуре в течение 12-24 ч. Продукты рестрикции фракционировали в 2% агарозном геле с бромистым этидием при напряжении 120 В в течение 30-45 мин. и визуализировали в ультрафиолетовом свете с применением компьютерной видеосъемки на приборе Vilber Lourmat. Статистическую обработку данных проводили при помощи программы Statistica 6.0 for Windows. Данные представлены в виде  $m\pm SD$ , где  $m$  – средний возраст,  $SD$  – стандартное отклонение. Сравнение частот аллелей и генотипов проводили с помощью двустороннего точного критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при  $p<0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

В настоящее время известна только одна мутация для гена *IL5*, тесно связанная с atopической БА, – транзигция *C-703T* в его промоторной области [4].

Спорным остается вопрос о патологической роли замены А-80G в промоторной области гена *IL5RA*, данный полиморфизм встречался с частотой 36% у англичан [7], тогда как другие исследования [9,12] не смогли подтвердить его значимость. Что же касается гена *IL5RB*, то не так давно группой ученых была обнаружена точечная замена в данном гене приводящая к легочному альвеолярному протеинозу [6,10].

Для большинства изученных полиморфных вариантов в группе здоровых якутов наблюдаемое распределение генотипов соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга (PXB) (табл. 1). Отклонение показано лишь для варианта *G-80A* гена *IL5RA* ( $\chi^2=3,963$ ,  $p<0,01$ ) за счет недостатка гетерозигот – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность составили 0,408 и 0,472 соответственно. Так же по результатам проведенного исследования у якутов наблюдается низкая частота встречаемости аллеля *C-703* гена *IL5* по сравнению с популяциями русских, таджиков и татар, данные о которых опубликованы в литературе [4], приближаясь по частотам к популяциям бурятов и тувинцев. Для полиморфных вариантов *G-80A* гена *IL5RA* и *G1972A* гена *IL5RB* на уровне аллельных частот в пределах сравниваемых популяций отмечалась низкая генетическая дифференциация (табл. 1).

По результатам проведенного нами исследования были выявлены статистически значимые отличия при анализе распределения генотипов для полиморфного варианта *G1972A* гена *IL5RB*. Так, у больных БА отмечалось преобладание носителей гомозиготного генотипа *1972\*G/\*G* (94,2%; OR=6,37;  $p=0,000$ ), низкая (5,8%) по сравнению с группой здоровых (24,2%) частота гетерозиготного генотипа *\*G/\*A* и полностью отсутствовали носители генотипа *\*A/\*A* (0%), тогда как в контрольной группе они встречались в 4,1% случаев. Анализ частот аллелей по данному маркеру так же выявил статистически значимые отличия, у больных БА по сравнению со здоровыми отмечалась повышенная частота аллеля *IL5RB \*G1972* (OR=6,42; CI: 2,63-16,68;  $p=0,000$ ).

Анализ частот генотипов полиморфного варианта *G-80A* гена *IL5RA* показал, что у больных БА в сравнении со здоровыми лицами гетерозиготный генотип *\*G/\*A* встречался в 55,3% случаев (OR=1,8;  $p=0,019$ ), а в группе здоровых лишь в 40,8%. А так же в группе больных наблюдалась более низкая

Таблица 1

## Полиморфизм генов интерлейкинов и их рецепторов в популяциях

Ген	Популяции	N	Генотипы No, %			Частота аллеля	$\chi^2$	Ho	He	D
			CC	CT	TT					
IL-5 C-703T	Русские*	65	52,3	38,5	9,2	0,715	0,107	0,385	0,407	0,055
	Таджики*	33	51,5	36,4	12,1	0,697				
	Буряты*	59	8,5	55,9	35,6	0,364				
	Тувинцы*	59	20,0	47,5	30,5	0,458				
	Якуты	223	7,6	49,3	43,1	0,323				
IL-5RA G-80A	Русские*	66	GG	GA	AA	G	0,090	0,379	0,359	-0,054
	Таджики*	33	60,6	30,3	9,1	0,758				
	Буряты*	60	55,0	38,3	6,7	0,742				
	Тувинцы*	59	81,4	16,9	1,7	0,898				
	Якуты	223	41,3	40,8	17,9	0,617				
IL-5RB G1972A	Русские*	66	GG	GA	AA	G	0,076	0,154	0,142	-0,083
	Таджики*	33	84,6	15,4	0,0	0,923				
	Буряты*	60	90,9	9,1	0,0	0,955				
	Тувинцы*	59	95,0	5,0	0,0	0,975				
	Якуты	223	86,4	13,6	0,0	0,932				
			71,7	24,2	4,1	0,839	2,162	0,242	0,270	0,106

Примечание. n – численность выборок; Ho – наблюдаемая численность генотипов; критерий  $\chi^2$  использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга; Ho, He наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность соответственно; D – относительное отклонение наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой;  $p < 0,05$ . \*Фрейдлин М.Б. -2002 г.

Таблица 2

## Распределение генотипов и частот аллелей в исследуемых группах по маркерам C-703T гена IL5, G-80A гена IL5RA и G1972A гена IL5RB

Полиморфизм	Генотипы	БА, абс.(%) (n=103)	Здоровые, абс.(%) (n=223)	p
IL5 C-703T	CC	8 (7,8)	17 (7,6)	p* 0,927 p**0,829
	CT	53 (51,5)	110 (49,3)	
	TT	42 (40,7)	96 (43,1)	
	C-703	0,335	0,323	
IL5RA G-80A	GG	37 (36,0)	92 (41,3)	p* 0,021 p**0,699
	GA	57 (55,3)	91 (40,8)	
	AA	9 (8,7)	40 (17,9)	
	G-80	0,636	0,617	
IL5RB G1972A	GG	97 (94,2)	160 (71,7)	p* 0,000 p**0,000
	GA	6 (5,8)	54 (24,2)	
	AA	0 (0)	9 (4,1)	
	G1972	0,971	0,839	

\*Достигнутый уровень значимости при сравнении распределения генотипов с показателями группы контроля (двусторонний точный тест Фишера).

\*\*Достигнутый уровень значимости при сравнении частоты аллелей с показателями группы контроля (двусторонний точный тест Фишера).

частота гомозиготных генотипов \*G/\*G (36%) и \*A/\*A (8,7%) по данному полиморфному варианту в сравнении с группой здоровых (41,3%; 17,9%) соответственно. Анализ распределения частот аллелей полиморфного варианта G-80A гена IL5RA выявил, что аллель IL5RA \*A80 относится к маркера пониженного риска (OR=0,59;  $p=0,003$ ).

При анализе распределения частот

генотипов и аллелей по маркеру C-703T гена IL5 в группе больных и здоровых достоверных отличий обнаружено не было тогда, как для европеоидных популяций данный полиморфизм показал статистически значимую ассоциацию с атопической БА [4] (табл. 2).

## Заключение

Таким образом, по результатам проведенного нами исследования было

выявлено, что аллель IL5RB \*G1972 и генотип IL5RB \*G/\*G полиморфного варианта G1972A гена IL5RB являются маркерами повышенного риска развития атопической БА у якутов. Так же статистически значимые величины по повышенному риску развития БА были показаны для генотипа IL5RA \*G/\*A полиморфного варианта G-80A гена IL5RA. К маркером пониженного риска в популяции якутов по результатам нашего исследования можно отнести генотип IL5RB \*A/\*A и аллель IL5RB \*A1972 полиморфного варианта G1972A гена IL5RB, а так же генотип IL5RA \*A/\*A и аллель IL5RA \*A80 полиморфного варианта G-80A гена IL5RA. Полиморфный вариант C-703T гена IL5 с риском развития атопической БА в якутской популяции не ассоциирован.

## Литература

1. Балаболкин И.И. Бронхиальная астма у детей / И.И. Балаболкин. – М.: Медицина, 2003. – С. 5-7.
2. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA). Национальный институт сердца, легких и крови. Пересмотр 2006 г.
3. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Диагностика, лечение и профилактика». – М.; 2004.
4. Полиморфизм генов интерлейкинов и их рецепторов: популяционная распространенность и связь с атопической бронхиальной астмой/ Фрейдлин М.Б., Пузырев В.П., Огородова Л.М. // Генетика. – 2002. – Т.38, №12. С.1710-1718.
5. Цитокины в иммунореабилитации инфекционных больных / Ю.Е. Серебрянский [и др.] // Воен.-мед. журнал. – 1999. – Т.320, №3. – С.41-50.
6. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alpha chain and beta chain shared with the receptor for GM-CSF / J. Tavernier [et al.] // Cell. 1991. V.66. P. 1175-1184.
7. A new polymorphism in the promoter of the interleukin 5 receptor alpha subunit (IL-5RA) gene / A. Kollintza [et al.] // Immunogenet. – 1998. – V. 48. – P. 65-66.
8. Cookson W. O. C. M. The alliance of genes and environment in asthma and allergy / W. O. C. M. Cookson // Nature – 1999. – V. 402 Suppl. – B5-11.
9. Familial eosinophilia maps to the cytokine gene cluster on human chromosomal region 5q31-q33 / J.D. Rioux [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 1998. – V. 63. – P. 1086-1094.
10. Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL3/IL5 receptor common beta chain expression / Dirksen U. [et al.] // J.Clin.Invest. 1997. V.100. P.2211-2217.
11. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // Methods in Molecular Biology / Ed. Walker J.M.Y.L.: Human Press.-1984.-V.2.-P.31-34
12. Mutation analysis of interleukin-5 in an asthmatic cohort / E. Pereira [et al.] // Hum. Mutation – 1998. – V. 11. – P. 51-54.

Е.Ю. Брагина, С.В. Буйкин

## ВЛИЯНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ КОНТРОЛЬНОЙ ВЫБОРКИ НА ЗНАЧИМОСТЬ АССОЦИАЦИЙ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ С РАЗВИТИЕМ МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

УДК 575.174.015.3:599.9

В настоящем исследовании оценено влияние увеличения численности контрольной выборки на значимость ранее полученных ассоциаций полиморфных вариантов генов *IL12B* (rs3212227), *IL4RA* (rs1805010) и *GSTM1* (del) с развитием вторичного туберкулеза, рассеянного склероза, атопической бронхиальной астмы и сахарного диабета 1-го типа у русских жителей г. Томска. Установлено, что для увеличения доказательности исследования генетической предрасположенности к различным мультифакториальным заболеваниям возможно увеличение численности контрольной выборки за счет популяционного контроля.

**Ключевые слова:** мультифакториальные заболевания, дизайн исследования случай-контроль, полиморфные варианты, ассоциации.

For association study results for SNP *IL12B* (rs3212227), *IL4RA* (rs1805010) and *GSTM1* (del) with secondary tuberculosis, atrophy bronchial asthma, 1 type diabetes, we estimated effect of sample size on association significance. We have shown that it is possible to increase significance level of association with some common diseases by increasing number of controls.

**Keywords:** common diseases, case-control design, SNP, association.

### Введение

Дизайн исследования случай-контроль для определения роли генетических вариантов в развитии мультифакториальных заболеваний (МФЗ) является общепринятым и предполагает высокую мощность полученных ассоциаций [18]. Для исследований случай-контроль используется сравнение распределения вариантов аллелей и генотипов между группами больных и здоровых индивидов. Данный подход наряду с другими алгоритмами исследований генетических ассоциаций (когортное, семейное) имеет свои недостатки и преимущества, и в большей степени различные подходы дополняют друг друга. Распространенной проблемой дизайна случай-контроль является слабая воспроизводимость результатов, полученных в различных исследованиях. Лишь незначительная часть полученных ассоциаций находит свое подтверждение [8]. Одной из возможных причин таких результатов могут быть немногочисленные группы для исследования. Если частота «редкого» аллеля превышает 5%, а численность исследуемых групп невелика, то могут быть пропущены многие ассоциации МФЗ с генетическими вариантами [15]. Другой причиной может быть неоднородность этнического состава исследуемых групп больных и здоровых индивидов, а также принадлежность их к определенной популяции [5]. Сбор материала с учетом вышеперечисленных критериев несколько затрудняет работу исследователей, но тем не менее в эру популяризации полногеномных ис-

следований, требующих большой численности исследуемых групп, дизайн случай-контроль остается наиболее эксплуатируемым.

**Цель исследования.** Анализ воспроизводимости ранее полученных ассоциаций для ряда заболеваний с увеличением численности контрольной группы.

### Материал и методы исследования

В работе были использованы ранее полученные и опубликованные данные о распределении генотипов и аллелей в контрольных выборках [1, 2, 4, 6]. Исследуемые были объединены в 3 группы: I - популяционная выборка г. Томска (n=96): 38 мужчин и 52 женщин; II - контрольная выборка для исследования генетических причин атопического дерматита; русские, проживающие на территории г.Томска (n=150): 70 мужчин и 80 женщин; III - контрольная выборка для исследования генетических причин бронхолегочных заболеваний, включая хронический обструктивный бронхит, бронхиальную астму, туберкулез; русские, проживающие на территории г. Томска (n=140) - 60 мужчин и 80 женщин.

Для анализа были выбраны несинонимичные полиморфизмы генов *IL12B* (rs3212227), *IL4RA* (rs1805010) и протяженная делеция в гене *GSTM1* (порядка 10 т.п.о.), приводящая к отсутствию соответствующего белкового продукта. В качестве модели заболеваний для сравнения с контрольными группами использовали группу больных вторичным туберкулезом, рассеянным склерозом, атопической бронхиальной астмой и сахарным диабетом 1-го типа, индивиды во всех исследуемых группах - русские жители г. Томска. Возраст больных и здоровых индивидов в данном контексте исследования не

принимался во внимание. Распределение генотипов для рассматриваемых генетических вариантов проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера [3]. Оценку значимости различий между группами проводили с помощью критерия  $\chi^2$  и двустороннего точного теста Фишера и значимыми считали отличия при  $p \leq 0,05$ . Расчеты проводили с использованием программ «STATISTICA 6.0» и «Microsoft Excel».

### Результаты и обсуждение

Во всех исследованных выборках для гена *IL12B* (rs3212227) наблюдаемое распределение генотипов соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга (табл.1). Наблюдаемая гетерозиготность составила 32-33% и во всех группах отмечалась однонаправленная тенденция к незначительному избытку гетерозигот. При сравнении частот аллелей и генотипов между контрольными выборками значимых различий не выявлено ( $p=0,587-0,967$ ), вследствие чего они были объединены и численность суммарной контрольной выборки составила 374 индивида. В суммарной контрольной выборке сохранялось равновесие Харди-Вайнберга, наблюдаемая гетерозиготность составила 32,9% и соответствовала предыдущим группам.

Далее проводилась проверка воспроизводимости ассоциации с заболеванием, с использованием суммарного контроля. Ранее для локуса *IL12B* (rs3212227) была получена ассоциация с вторичным туберкулезом [4]. Первоначально численность контрольной выборки составила 129, а больных вторичным туберкулезом - 237 индивидов, и при сравнении распределения генотипов и аллелей меж-

ду этими группами были найдены различия с уровнем значимости  $p=0,0340$  и  $p=0,0410$  для частот генотипов и аллелей соответственно. С использованием суммарной контрольной выборки ( $n=374$ ) ассоциация сохранилась, и уровень значимости различий между группой больных и суммарной контрольной выборкой значительно вырос ( $0,0179$  и  $0,0150$  для генотипов и аллелей соответственно).

Подобные результаты были получены в исследовании наследственной предрасположенности рассеянного склероза [1]: ген *IL12B* (rs3212227) ассоциирован с развитием заболевания ( $0,00006$  и  $0,0003$  для генотипов и аллелей соответственно). Численность группы больных составила 90, а контрольной - 129 индивидов. При использовании суммарной контрольной выборки ( $n=374$ ) ассоциация сохраняется, а уровень значимости различий возрастает ( $0,00004$  и  $0,00003$  для генотипов и аллелей соответственно).

Несколько иная картина наблюдалась для гена *GSTM1* (del). Распространенность делеции в контрольных выборках варьирует от 55,2% до 64,6%, однако в распределении генотипов группы не различаются между собой ( $p=0,241-1,000$ ). В суммарной контрольной выборке частота делеции составила 60,5%. Ранее для данного варианта была получена ассоциация с развитием атопической бронхиальной астмы, частота делеции преобладала у больных индивидов (71,0%) по сравнению со здоровыми (55,2%), уровень значимости различий составил  $0,0108$  [2]. При использовании суммарной контрольной выборки ( $n=347$ ) ассоциация сохраняется, однако уровень значимости достигнутых различий снизился и составил  $0,0429$ . Возможно, данный факт является смещением, за счет значительного увеличения контрольной выборки (374 по сравнению с 134) и гораздо меньшей численностью группой больных ( $n=131$ ).

Увеличение численности групп больных и контроля оправдано, особенно в случае исследования SNPs, с частотой «редкого» аллеля менее 5%. По данным проектов HarMap, Encode для 40-60% SNPs в геноме человека частота «редкого» аллеля составляет менее 5%, в этом случае, чем ниже риск и частота «редкого» аллеля, тем больший размер выборки необходим для исследования (табл. 2).

В случае если частота «редкого» аллеля превышает 5% при небольшой численности исследуемых групп отно-

сительный риск развития заболевания будет невысоким, порядка 1,2-1,6 для большинства из найденных ассоциаций [15].

Основным недостатком исследований случай-контроль является необходимость стратификации исследуемого

населения по ряду параметров [9, 13, 14]. Исследования с использованием семейного материала позволяют избежать этой проблемы, более того, их несомненным плюсом является гомогенность всех членов семьи в отношении воздействия факторов окружающей среды. Однако сбор хорошо охарактеризованного семейного материала достаточно сложен и требует длительного времени, поэтому при изучении генетических ассоциаций с МФЗ гораздо реже используется именно этот дизайн исследования. В 2006 г. были опубликованы результаты сравнения ассоциаций, полученных с использованием дизайна случай-контроль и семейного исследования [11]. Работа представляла мета-анализ данных по генам-канди-

датам широко распространенных заболеваний человека, включая астму, сахарный диабет, туберкулез и другие. Анализируя порядка 93 исследования, авторам удалось показать, что, несмотря на возможные отклонения и необходимость стратификация населения, ассоциации, полученные путем сравнения случай-контроль в основном подтверждают результаты исследований семейного материала [10, 21]. В большинстве случаев оба дизайна являются взаимодополняющими, и совмещение их результатов повышает мощность исследования [7, 12, 16, 17, 22].

Для оценки влияния численности контрольной группы на значимость ассоциаций с заболеванием для двух дизайнов (случай-контроль и семейный анализ) были использованы результаты ранее проведенного исследования сахарного диабета 1 типа [6]. В этой работе была получена ассоциация

Таблица 1

## Уровни гетерозиготности в контрольных выборках

Ген/SNP	Группа	Гетерозиготность	$\chi^2$
<i>IL12B</i> rs3212227	I	ho=0,3368±0,0485 he=0,3071±0,0352	0,8880
	II	ho=0,3200±0,0381 he=0,3036±0,0281	0,4352
	III	ho=0,3333±0,0415 he=0,2880±0,0307	3,1973
	Суммарная контрольная выборка n=374	ho=0,3289±0,0243 he=0,2992±0,0179	3,6744
<i>IL4RA</i> rs1805010	II	ho=0,4932±0,0414 he=0,4886±0,0090	0,0124
	III	ho=0,5246±0,0452 he=0,4837±0,0116	0,8700
	Суммарная контрольная выборка n=276	ho=0,5075±0,0305 he=0,4865±0,0071	0,4965

Примечание. n- численность индивидов в группе; ho и he – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность  $\pm S.D.$

Таблица 2

## Оптимальная численность групп для выявления вариантов рисковой значимости аллеля [составлена по: [19]]

Относительный риск	Частота «редкого» аллеля	Количество исследуемых образцов		
		Кол-во «случаев», n	Кол-во «контроля», n	Суммарно, n
1,5	5%	931	931	1.862
2,0	5%	290	290	580
1,5	2,5%	1.710	1.710	3.420
2,0	2,5%	525	525	1.050
1,5	1%	4.060	4.060	8.120
2,0	1%	1.225	1.225	2.450

Примечание. n – численность индивидов в группе.

гена *IL4RA* (rs1805010) с развитием сахарного диабета 1 типа ( $p=0,0183$ ) с помощью Transmission Disequilibrium Test, показывающего насколько чаще передается «патологический» аллель больному ребенку от его родителей. В то же время, используя сравнение между группой больных и контрольной выборкой, значимых различий автором не обнаружено ( $p=0,3880$  и  $p=0,792$  при сравнении генотипов и аллелей соответственно). Причиной отсутствия ассоциации при сравнении случай-контроль, могла быть недостаточная численность контрольной выборки ( $n=122$ ), которая почти в два раза по численности меньше, чем группа больных индивидов ( $n=207$ ). Для увеличения численности контрольной выборки мы использовали контрольные группы, рассмотренные ранее (табл.1) В результате анализа, по локусу *IL4RA* (rs1805010) значимых различий между контрольными группа-

ми не обнаружено ( $p=0,7951-0,9225$ ). Наблюдаемое распределение генотипов соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга во всех контрольных выборках, которые были объединены для дальнейшего анализа. В суммарной контрольной выборке ( $n=268$ ) сохранялось равновесие Харди-Вайнберга, наблюдаемая гетерозиготность составила порядка 50,8% и соответствовала предыдущим трем группам. При сравнении распределения генотипов и аллелей между суммарной контрольной выборкой и группой больных сахарным диабетом 1 типа не было найдено значимых отличий (0,3772 и 0,5420 для генотипов и аллелей соответственно). Таким образом, увеличение контрольной выборки не помогло выявить ассоциаций с заболеванием. В данном случае, первичное предположение о недостаточности контроля по отношению к случаю не подтвердилось.

Настоящее исследование основывалось на подходе увеличения численности контрольной выборки, который использовался консорциумом Wellcome Trust Case Control Consortium [20]. На основании данных полногеномного анализа был проведен поиск ассоциаций с МФЗ в британской популяции, включая коронарный атеросклероз, артериальная гипертензия, биполярный психоз, сахарный диабет 1 типа, сахарный диабет 2 типа, болезнь Крона, ревматоидный артрит. Для исследования были выбраны две контрольные выборки: 1500 индивидов – британская когорта 1958 года рождения (58BC) и 1500 отобранных из образцов донорской крови. По результатам генотипирования 500,568 однонуклеотидных полиморфизмов авторами отмечается, что было мало статистически значимых различий между двумя контрольными выборками, несмотря на то, что эти группы отличались по возрасту и месту проживания. Контрольные группы были объединены для дальнейшего поиска ассоциаций с заболеваниями уже с использованием контрольной группы численностью 3000 индивидов. Так же в данной работе был использован метод наращивания контрольной группы

за счет включения в ее состав индивидов с болезнями, отличающимися по патогенезу от изучаемого заболевания. Такой подход не только подтвердил полученные ассоциации, но и позволил выявить новые локусы с высоким уровнем статистической значимости ( $p < 5 \times 10^{-7}$ ). Авторы указывают, что основной недостаток при использовании популяционного контроля для МФЗ, это наличие в контроле индивидов с исследуемым заболеванием. Однако эффект его на мощность статистических критериев довольно умеренный, за исключением случаев, когда это смещение существенно. Например, если в 5% контроля было бы это заболевание, то это привело бы к потере в мощности, эквивалентной уменьшению размеров выборки на 10%.

#### Заключение

В каждом конкретном случае исследователь делает выбор между уровнем детализации в описании фенотипа и стоимостью исследования. Использование подходов, снижающих стоимость исследования при значительном влиянии на мощность статистических критериев, имеет несомненные преимущества, однако необходимо накопление практического опыта их применения в изучении генетических основ МФЗ.

Полученные предварительные результаты позволяют заключить, что для широко распространенных заболеваний для увеличения доказательности исследования оправдан подход увеличения численности контрольной выборки за счет популяционного контроля.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РГНФ в рамках научно-исследовательского проекта РГНФ № 08-06-00514а.*

#### Литература

1. Бабенко С.А. Роль аллельных вариантов генов иммунного ответа в развитии рассеянного склероза: автореф. дис...канд.мед.наук / С.А. Бабенко. – Томск: НИП, 2008. – 23 с.
2. Вейр Б. Анализ генетических данных. Пер. с англ. / Б. Вейр. – М.: Мир, 1995. – 400 с.
3. Колоколова О.В. Аллельные варианты генов-кандидатов подверженности туберкулезу у русского населения Западной Сибири: автореф.

дис...канд.мед.наук / О.В. Колоколова. – Томск: НИП, 2005. – 18 с.

4. Кучер А.Н. Исследование ассоциаций аллельных вариантов генов с мультифакториальными заболеваниями: проблема формирования контрольных групп / А.Н. Кучер // Генетик человека и патология: сб. науч. тр. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2007. – Вып. 8. — С. 328-331.

5. Тарасенко Н.В. Патогенетика сахарного диабета 1 типа и его осложнений: гены синтаза оксида азота и цитокинов: автореф. дис...канд.мед.наук / Н.В. Тарасенко – Томск: НИП, 2008. – 23 с.

6. A comparison of case-control and family-based association methods: The example of sickle-cell and malaria / H. Ackerman [et al.] // Ann. Hum. Genet. – 2005. – V. 69. – P. 559–565.

7. A comprehensive review of genetic association studies / J.N. Hirschorn [et al.] // Genet. Med. – 2002. – V. 4. – P. 45-61.

8. Cardon L.R. Population stratification and spurious allelic association / L.R. Cardon, L.J. Palmer // Lancet. – 2003. – V. 361. – P. 598–604.

9. Counterpoint: bias from population stratification is not a major threat to the validity of conclusions from epidemiological studies of common polymorphisms and cancer. S. Wacholder [et al.] // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2002. – V. 11. – P. 513–520.

10. Family-based versus unrelated case-control designs for genetic associations / E. Evangelou [et al.] // Plos Genetics. – 2006. – V. 2 (8). – P. 1147-1155.

11. Genetic association analysis using data from triads and unrelated subjects / M.P. Epstein [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2005. – V. 76. – P. 592–608.

12. Genome-wide association studies: Theoretical and practical concerns / W.Y. Wang [et al.] // Nat. Rev. Genet. – 2005. – V. 6. – P.109–118.

13. Hattersley A.T. What makes a good genetic association study? / A.T. Hattersley, M.I. McCarthy // Lancet. – 2005. – V. 366. – P. 1315–1323.

14. Ioannidis J.P. Genetic associations: False or true? / J.P. Ioannidis // Trends. Mol. Med. – 2003. – V. 9. – P. 135–138.

15. Kazeem G.R. Integrating case-control and TDT studies / G.R. Kazeem, M. Farrall // Ann. Hum. Genet. – 2005. – V. 69. – P. 329–335.

16. Mitchell L.E. Relationship between case-control studies and the transmission/disequilibrium test / L.E. Mitchell // Genet. Epidemiol. – 2000. – V. 19. – P. 193–201.

17. Phases of biomarker development for early detection of cancer / M. S. [et al.] Pepe // J. Nat. Cancer Inst. – 2001. – V. 93. – P. 1054–1061.

18. Shifting paradigm of association studies: value of rare SNPs / I.P. Gorlov [et al.] // Am.J. Hum. Genet. – 2008. – V. 82. – P. 100-112.

19. The Wellcome trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14000 cases of seven common diseases and 3000 shared controls // Nature. – 2007. – V. 447. – P. 661-678.

20. Thomas D.C. Point population stratification: A problem for case-control studies of candidate-gene associations? / D.C. Thomas, J.S. Witte // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2002. – V. 11. – P. 505–512.

21. Weinberg C.R. A hybrid design for studying genetic influences on risk of diseases with onset early in life / C.R. Weinberg, D.M. Umbach // Am. J. Hum. Genet. – 2005. – V. 77. – P. 627–636.

С.А. Васильев, В.А. Тимошевский, И.Н. Лебедев

## СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА АНЕУГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

УДК: 575.224.234

Проблема оценки влияния ионизирующего излучения на организм человека в условиях профессиональной деятельности требует пристального внимания. Особую актуальность приобретают исследования, направленные на поиск новых информативных биомаркеров генотоксикологического воздействия. Таковыми потенциально могут выступать числовые нарушения хромосом, возникающие вследствие повреждения механизмов хромосомной сегрегации, в том числе и при непрямом действии ионизирующего излучения. Современные технологии молекулярно-цитогенетического анализа предоставляют уникальную возможность для регистрации анеугенных событий в соматических клетках человека. В настоящей работе показана возможность применения метода флуоресцентной *in situ* гибридизации на цитокинез-блокированных лимфоцитах периферической крови с использованием центромероспецифичных ДНК-зондов на отдельные хромосомы набора и панцентромерных ДНК-зондов для комплексной оценки влияния ионизирующего излучения на хромосомную сегрегацию. Установлены особенности анеугенных эффектов инкорпорированного плутония-239 в соматических клетках работников ядерно-химического производства.

**Ключевые слова:** анеуплоидия, цитогенетический мониторинг, ионизирующее излучение, плутоний-239.

Problem of assessment of occupational ionizing radiation influence on human organism requires special attention. As a result, investigations of new informative biomarkers of genotoxicological influence are particularly relevant. Numerical chromosomal abnormalities formed due to disruption of chromosome segregation machinery can be one of these markers. Modern technologies of molecular cytogenetic analysis provide a unique opportunity to register aneugenic events in human somatic cells. In *this* paper we have shown potential application of fluorescent *in situ* hybridization on cytokinesis-blocked lymphocytes of peripheral blood using centromere-specific DNA probes to individual chromosomes and pancentromeric DNA probes for complex assessment of ionizing radiation influence on chromosomal segregation. Special features of aneugenic effect of incorporated plutonium-239 in somatic cells of nuclear facility workers were revealed.

**Keywords:** aneuploidy, cytogenetic monitoring, ionizing radiation, plutonium-239.

### Введение

Значимость оценки генотоксического влияния ионизирующего излучения на человека в условиях профессиональной деятельности в последние годы приобретает все большую актуальность. Во многом такая ситуация связана с ростом заинтересованности предприятий ядерной энергетики и ядерно-химической промышленности в повышении эффективности проводимых мероприятий по обеспечению биобезопасности персонала [1].

Хорошо известен кластогенный эффект ионизирующего излучения, выражающийся в повышении уровня структурных хромосомных aberrаций в клетках, что соответствует модели прямого действия на хромосомный материал. Однако также существуют и не прямые эффекты ионизирующего излучения, обусловленные образованием свободных радикалов кислорода и азота в результате вторичной ионизации молекул. Результатами подобного воздействия могут стать такие тяжелые для клетки генетические повреждения, как числовые нарушения хромосом. Значение анеуплоидии как аномального состояния генетического аппарата определяется, в первую очередь, нарушением дозы генов, локали-

зованных на недостающих или лишних гомологах [6]. Данное нарушение в соматических клетках может приводить к различным патологическим состояниям, в том числе и к опухолевой трансформации [4].

Несмотря на необходимость включения анализа частоты анеуплоидии в комплексную оценку действия ионизирующего излучения на генетический аппарат соматических клеток работников ядерно-химического производства, данная проблема остается слабо изученной [8]. С целью осуществления такого анализа, совмещающего в себе оценку одновременно класто- и анеугенного потенциала ионизирующего излучения, нами впервые было проведено исследование влияния инкорпорированного в организм плутония-239 на частоту структурных и числовых хромосомных аномалий в соматических клетках работников Сибирского химического комбината (СХК, г. Северск, Томской области). В качестве наиболее оптимального подхода для выполнения поставленной цели был применен метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с центромеро-специфичными ДНК-зондами на хромосомы 2, 7, 8, 12, X и Y. Использование в реакции FISH ДНК-зондов на прицентромерные области отдельных хромосом набора позволяет дифференцировать хромосомное нерасхождение и отставание, возникающие вследствие повреждения различных клеточных мишеней [7]. Кроме того, в настоящем исследовании был использован метод FISH с панцентромерными

ДНК-зондами. Данный подход позволяет оценить сравнительный вклад анеу- и кластогенного эффекта, благодаря анализу частоты микроядер с наличием флуоресцентных сигналов (микроядра, содержащие отставшие хроматиды с центромерной последовательностью) и их отсутствием (микроядра с хромосомными фрагментами). Более того, использование панцентромерных ДНК-зондов дает возможность получить интегральную оценку хромосомного отставания одновременно по всем гомологам в кариотипе человека. Наконец, проведение анализа на цитокинез-блокированных двухъядерных лимфоцитах позволяет существенно повысить информативность оценки анеугенных эффектов вследствие использования второго ядра в качестве контрольного при определении событий хромосомного нерасхождения и отставания.

### Материалы и методы

Обследовано 27 работников СХК с наличием в организме инкорпорированного плутония-239, являющегося источником  $\alpha$ -частиц. Контрольная группа включала 33 жителя г. Северска, не связанных в своей профессиональной деятельности с ядерно-химическим производством. Все обследованные индивиды обеих групп были мужского пола. Сравнимые группы были сопоставимы по возрастному составу (табл. 1). В исследование включались лица без грубой соматической патологии (злокачественные новообразования, аутоиммунные за-

**ВАСИЛЬЕВ Станислав Анатольевич** - аспирант НИИ медицинской генетики СО РАМН, [vstas\\_2000@mail.ru](mailto:vstas_2000@mail.ru); **ТИМОШЕВСКИЙ Владимир Анатольевич** - к.б.н., с.н.с., e-mail: [vladimir.timoshevsky@medgenetics.ru](mailto:vladimir.timoshevsky@medgenetics.ru); **ЛЕБЕДЕВ Игорь Николаевич** - д.б.н., зав., [igor.lebedev@medgenetics.ru](mailto:igor.lebedev@medgenetics.ru).

болевания и др.). Все участники исследования подписали информированное согласие на свое участие в нем. Проведение исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики СО РАМН. Для работников СХК администрацией предприятия была предоставлена информация об активности инкорпорированного плутония в организме, накопленного в течение профессиональной деятельности и определенной с помощью стандартной процедуры уринализа (табл. 1). Для проведения исследования методом FISH с панцентромерными ДНК-зондами из обеих групп случайным образом было взято по 20 индивидов.

Из образцов периферической крови осаждением выделялась лейкоцитарная масса. Культивирование лимфоцитов осуществлялось в течение 72 ч. На 44-м ч в культуру клеток добавлялся цитокинез-блокирующий агент цитохалазин В (Sigma, США) до концентрации 5 мкг/мл [5]. Полученные в результате культивирования двухъядерные клетки фиксировались на 72-м ч в модифицированном фиксаторе Карнуа (метанол : уксусная кислота, 3:1).

Клоны *E. coli* с плазмидами, содержащими вставки, специфичные для прицентромерного района определенной пары хромосом человека, были любезно предоставлены профессором Роччи (Resources for Molecular Cytogenetics, Италия). Введение в ДНК-зонды флуоресцентной метки (TAMRA-dUTP или Fluorescein-dUTP) осуществлялось с помощью ник-трансляции. Для проведения двухцветной реакции FISH использовались пары ДНК-зондов на отдельные хромосомы набора (2 и 8, 7 и 12, X и Y), меченые флуорохромами двух разных цветов. Выбор хромосом для анализа был обусловлен их различиями в размерах, определяющими разную вероятность аномальной сегрегации, а также наличием информации о патогенетической значимости анеуплоидии по исследованным хромосомам в соматических клетках, прежде всего в отношении риска развития гемобластозов. Панцентромерные ДНК-зонды, гибридизующиеся с прицентромерными районами всех хромосом человека, были получены в результате смешивания ДНК-зондов для каждой пары хромосом. Постановка реакции FISH осуществлялась по протоколу, описанному нами ранее [2].

При использовании ДНК-проб на отдельные хромосомы набора для каждой пары зондов анализировали распределение гибридизационных

сигналов в 1000 двухъядерных клеток на одном препарате для каждого индивида. Для FISH с применением панцентромерных ДНК-зондов производилась оценка частоты встречаемости центромеро-негативных и центромеро-позитивных микроядер в 2000 двухъядерных клеток. Примеры комбинаций флуоресцентных сигналов, обнаруживаемых в двухъядерных лимфоцитах периферической крови человека реакцией FISH с различными ДНК-зондами, приведены на рисунке. Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью критерия Манна-Уитни для межгрупповых сравнений.

### Результаты и обсуждение

Частота нерасхождения по всем исследованным хромосомам, за исключением X-хромосомы, оказалась значимо выше в группе работников СХК, по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ) (табл. 2). Частота отставания была значимо выше в группе работников СХК только для хромосомы 7, в то время как по частоте отставания по всем другим исследованным хромосомам значимых отличий обнаружено не было. Однако, учитывая очень малое количество клеток с хромосомным отставанием в обеих обследованных группах (табл. 2), данные отличия, скорее всего, были обусловлены случайными причинами. Среди всех проанализированных аномалий нерасхождение, как механизм возникновения анеуплоидии, регистрировалось гораздо чаще отставания, составляя от 81,4 до 97,2 % всех нарушений сегрегации

Таблица 1

Характеристика обследованных групп		
Параметр	Контрольная группа	Группа работников СХК
FISH с центромероспецифичными ДНК-зондами на хромосомы 2, 7, 8, 12, X, Y		
Число индивидов	33	27
Средний возраст $\pm$ ст. ошибка (годы) (диапазон)	54 $\pm$ 2 (32-70)	58 $\pm$ 2 (38-71)
Средняя активность инкорпорированного Pu-239 $\pm$ ст. ошибка (Бк), (диапазон)	-	1287 $\pm$ 317 (370-6956)
Число проанализированных клеток	99000	81000
FISH с панцентромерными ДНК-зондами		
Число индивидов	20	20
Средний возраст $\pm$ ст. ошибка (годы) (диапазон)	53 $\pm$ 2 (36-70)	59 $\pm$ 2 (39-70)
Средняя активность инкорпорированного Pu-239 $\pm$ ст. ошибка (Бк) (диапазон)	-	1300 $\pm$ 351 (360-6768)
Число проанализированных клеток	40000	40000

Таблица 2

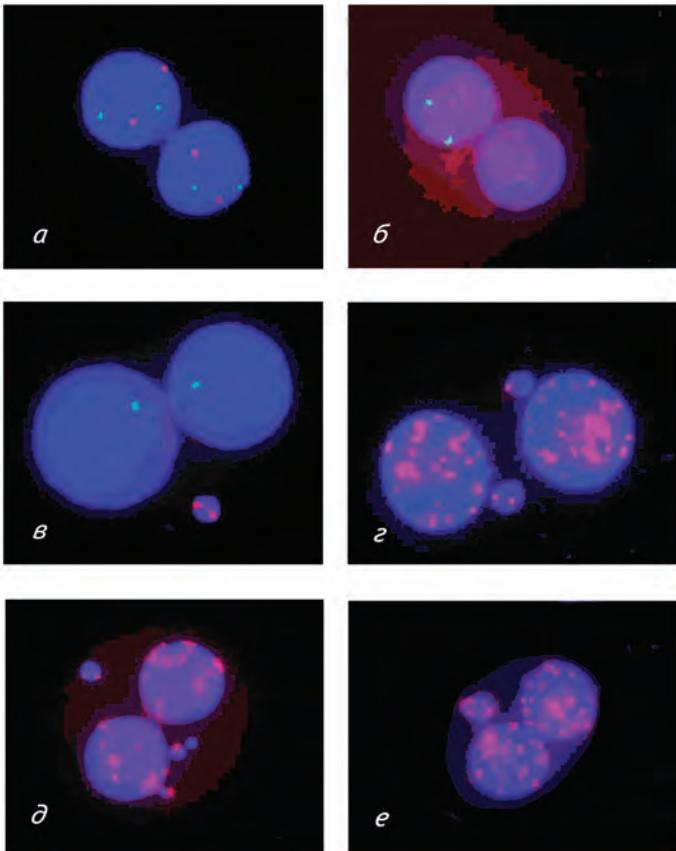
Частоты хромосомного нерасхождения, хромосомного отставания и микроядер в группе работников СХК и в контрольной группе (%)

Параметр	Контрольная группа	Группа работников СХК	Уровень значимости
FISH с центромероспецифичными ДНК-зондами на хромосомы 2, 7, 8, 12, X, Y			
Нерасхождение	2	1,10 $\pm$ 0,19 (35)	2,32 $\pm$ 0,32 (58) $p=0,002$
	7	0,97 $\pm$ 0,16 (34)	1,85 $\pm$ 0,36 (48) $p=0,0041$
	8	0,84 $\pm$ 0,17 (27)	2,80 $\pm$ 0,49 (70) $p=0,00075$
	12	0,94 $\pm$ 0,18 (33)	2,30 $\pm$ 0,33 (60) $p=0,00087$
	X	1,85 $\pm$ 0,35 (54)	2,00 $\pm$ 0,37 (61) $p>0,05$
Отставание	Y	0,85 $\pm$ 0,20 (28)	1,52 $\pm$ 0,27 (41) $p=0,034$
	2	0,06 $\pm$ 0,04 (2)	0,12 $\pm$ 0,09 (3) $p>0,05$
	7	0,06 $\pm$ 0,06 (2)	0,42 $\pm$ 0,14 (11) $p=0,0032$
	8	0,06 $\pm$ 0,04 (2)	0,08 $\pm$ 0,06 (2) $p>0,05$
	12	0,09 $\pm$ 0,06 (3)	0,42 $\pm$ 0,24 (11) $p>0,05$
FISH с панцентромерными ДНК-зондами	X	1,10 $\pm$ 0,20 (18)	0,67 $\pm$ 0,21 (35) $p>0,05$
	Y	0,40 $\pm$ 0,12 (9)	0,33 $\pm$ 0,27 (13) $p>0,05$
Центромеро-позитивные микроядра	2,72 $\pm$ 0,30 (120)	3,90 $\pm$ 0,47 (156)	$p < 0,05$
Центромеро-негативные микроядра	2,41 $\pm$ 0,23 (106)	4,73 $\pm$ 0,40 (189)	$p < 0,001$
Всего микроядер	5,14 $\pm$ 0,42 (226)	8,63 $\pm$ 0,67 (345)	$p < 0,001$

**Примечание.** В скобках указано абсолютное число аномалий в группе.

для аутосом (в среднем 91,5 %) и от 63,5 до 82,0 % для половых хромосом (в среднем 72,2 %). Малые значения частоты отставания по каждой отдельной паре гомологов не позволяют провести статистически достоверный анализ хромосомного отставания. В связи с этим результаты FISH-анализа с использованием панцентромерных ДНК-зондов, позволяющих получить интегральную оценку уровня хромосомного отставания, представляют очевидный интерес (рисунок).

Действительно, в ходе проведенного исследования было показано,



Комбинации флуоресцентных сигналов, обнаруживаемые в двухъядерных лимфоцитах периферической крови человека с помощью FISH: а – нормальное распределение сигналов для хромосом 2 (красный) и 8 (зеленый); б – нерасхождение в одной клетке хромосом X (зеленый) и Y (красный); в – отставание целой хромосомы Y (красный) с образованием микроядра; г – двухъядерная клетка с двумя микроядрами: с одним и двумя флуоресцентными сигналами панцентромерных ДНК-зондов; д – двухъядерная клетка с микроядрами с различным количеством центромерных флуоресцентных сигналов; е – двухъядерная клетка с микроядром, содержащим более 4 центромерных флуоресцентных сигналов.

что частота центромеро-позитивных микроядер с одним или несколькими флуоресцентными сигналами панцентромерных ДНК-зондов (маркеры хроматидного или хромосомного отставания) значительно отличалась между группами: у работников СХК она составила 3,9 %, тогда как в контрольной выборке – 2,7 % ( $p < 0,05$ ).

Что касается центромеро-негативных микроядер (маркеров кластогенного воздействия), то в группе работ-

опасных в генетическом отношении производств и населения территорий с техногенным загрязнением является актуальной задачей, требующей поиска новых биомаркеров воздействия ионизирующего излучения [3]. Применение современных молекулярно-цитогенетических методов, в сочетании со ставшим уже классическим в генотоксикологии микроядерным тестом на цитокинез-блокированных двухъядерных лимфоцитах перифе-

рической крови, позволяет с высокой частотой составила 4,7 % по сравнению с 2,4 % в контрольной группе ( $p < 0,001$ ). Суммарная частота всех микроядер также значительно отличалась между группой работников СХК (8,6 %) и контрольной выборкой (5,1%) (табл. 2). Таким образом, наличие инкорпорированного плутония-239 в организме работников ядерно-химического производства приводит к значимому повышению как частоты потерь хромосомных фрагментов, так и частоты отставания целых хроматид в процессе клеточного деления.

### Заключение

Проведение мониторинга персонала потенциально

рической крови, позволяет с высокой чувствительностью определять величину и характер воздействия ионизирующего излучения на генетический аппарат соматических клеток человека. Следует подчеркнуть, что возможности использованного в настоящей работе подхода позволяют проводить оценку воздействия на человека не только ионизирующего излучения как вредного фактора производства, но и других потенциальных анеутогенов, влияние которых может быть связано как с профессиональной деятельностью, так и с проживанием на территориях с высоким уровнем техногенного загрязнения. За счет использования новых цитогенетических маркеров ионизирующего излучения становится возможным формирование групп высокого генетического риска, а также создание системы мониторинга и контроля над величиной воздействия, оказываемого на организм человека.

### Литература

1. Назаренко С.А. Сравнительный анализ частоты анеуплоидии в покоящихся и делящихся клетках человека при воздействии вредных внешнесредовых факторов / С.А. Назаренко, В.А. Тимошевский // Генетика. – 2005. – Т. 41. № 1. – С. 1-5.
2. Тимошевский В.А. Биологическая индикация мутагенных воздействий: анализ числовых хромосомных нарушений в интерфазных клетках человека (Наследственность и здоровье) / Под ред. В.П. Пузырёва / В.А. Тимошевский, И.Н. Лебедев, С.А. Назаренко. – Томск: «Печатная мануфактура», 2006. – 40 с.
3. Ядерно-химическое производство и генетическое здоровье / Назаренко С.А. [и др.]. – Томск: Печатная мануфактура, 2004. – 272 с.
4. Duesberg P. Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells / P. Duesberg, A. Fabarius, R. Heilmann // IUBMB Life. – 2004. – V. 56. – P. 65-81.
5. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay / M. Fenech // Nature Protocols. – 2007. – V. 2. – P. 1084-1104.
6. Garcia-Sagredo J.M. Fifty years of cytogenetics: A parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology / J.M. Garcia-Sagredo // Biochimica et Biophysica Acta. – 2008. – V. 1779. – P. 363-375.
7. Iarmarcovai G. Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy / G. Iarmarcovai, A. Botta, T. Orsiere // Toxicology Letters. – 2006. – V. 166. – P. 1-10.
8. Sari-Minodier I. Cytogenetic monitoring by use of the micronucleus assay among hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation / Sari-Minodier I. [et al.]. // Mutation Research. – 2007. – V. 629. – P. 111-121.

А.В. Марусин, Н.Р. Максимова, Н.П. Матвеева, М.Г. Спиридонова,  
В.А. Степанов

## АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ПЕРЕНОСЧИКА ДОФАМИНА *DAT1* (*SLC6A3*) И ЭТАНОЛ-МЕТАБОЛИЗИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ *ADH1B* И *CYP2E1* С РИСКОМ ФОРМИРОВАНИЯ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ В ЯКУТСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

УДК 575.174.015.03:22+575.162:17

Изучено распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма двух генов этанол-метаболизирующих ферментов *ADH1B\*Arg47His* и *CYP2E1 Pst I (G/C)*, а также полиморфизм длин tandemных повторов (*VNTR*) в 3'-некодирующей области (3'-UTR) и 1342 A/G в 9 экзоне гена переносчика дофамина *DAT1 (SLC6A3)* в выборках из трёх якутских популяций в сравнении с группой больных алкоголизмом якутов. Три выборки якутских популяций составили общую группу популяционного контроля, в которой, как и в группе больных, по всем четырём изученным локусам выполнялось равновесие Харди-Вайнберга. У якутов не выявлено связи полиморфизма этанол-метаболизирующих ферментов с подверженностью к алкоголизму. Обнаружена близкая к статистически значимой ассоциация полиморфизма A/G ( $p = 0,055$ ) и статистически значимая ассоциация *VNTR* в 3'-UTR гена *DAT1* ( $p = 0,015$ ) с алкоголизмом в якутской популяции. При этом в группе больных между этими локусами наблюдается умеренное неравновесие по сцеплению, которое отсутствует в контрольной группе. Выявлены гаплотипы: предрасполагающий к формированию алкоголизма «X\_G» ( $p = 0,013$ ) и протективный для болезни «X\_A» ( $p = 0,043$ ), где (X) – любой аллель не 10 копиями повтора (7, 9, или 11 повторов).

**Ключевые слова:** этанол-метаболизирующие ферменты, переносчик дофамина, генетический полиморфизм, алкоголизм

The allele and genotype distribution of two alcohol metabolizing enzymes *ADH1B\*Arg47His* and *CYP2E1 Pst I (G/C)* as well as the exon 9 1342 A/G and variable number of tandem repeats (*VNTR*) polymorphisms in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the dopamine transporter *DAT1 (SLC6A3)* gene were investigated in three Yakut populations in comparison with Yakut alcoholics men. The three Yakut populations were combined in total population control group. Genotype frequencies of all four examined loci obeyed the Hardy-Weinberg equilibrium both in control and in patient groups. No associations in allele frequencies of two alcohol metabolizing enzymes with alcoholism in Yakuts were revealed. Almost significant association ( $p = 0,055$ ) of A/G and significant association of *VNTR* ( $p = 0,015$ ) polymorphisms in *DAT1* gene with alcoholism in Yakut population were found. In the same time, moderate LD between these two loci was observed in patients, but not in the control group. The haplotypes contributing to alcoholism susceptibility ("X\_G";  $p = 0,013$ ) and protective with the respect to the disease ("X\_A";  $p = 0,043$ ) were revealed, where X denotes any allele except those with 10 repeat copies.

**Keywords:** alcohol metabolizing enzymes, dopamin transporter, gene polymorphism, alcoholism.

### Введение

Алкоголизм – широко распространённое, хроническое и рецидивирующее заболевание. В 2005 г. уровень первичной заболеваемости алкоголизмом (включая алкогольные психозы) составил в Якутии 303,6 на 100 тыс. населения, тогда как по России в целом этот показатель – 147 больных на 100 тыс. [4]. Семейные, близнецовые и исследования случаев усыновления указывают, что восприимчивость к алкогольной зависимости, вероятно в большей мере, вызывается генетическими факторами, которые составляют 50-60 % риска подверженности [16]. Вообще биологические потомки алкоголиков в три – пять раз с большей вероятностью склонны к зависимости от алкоголя, чем потомки неалкоголиков

[7]. Более того, одно из масштабных близнецовых исследований алкоголизма (около 9000 близнецовых пар мужского пола) установило, что генетические факторы риска составляют 54 % подверженности к злоупотреблению алкоголем [15]. Поэтому актуальным является анализ связи генетической изменчивости с риском заболевания алкоголизмом у коренных малочисленных народов Севера, и у якутов в частности.

**Цель** настоящего исследования – анализ ассоциаций полиморфизма длин tandemных повторов (*VNTR*) в 3'-некодирующей области (3'-UTR) и 1342 A/G в 9 экзоне гена переносчика дофамина *DAT1 (SLC6A3)* и этанол-метаболизирующих ферментов *ADH1B\*Arg47His* и *CYP2E1 Pst I (G/C)* с риском формирования алкогольной зависимости в якутской популяции. Подробно эти полиморфизмы описаны в работах [2,5] для изученной ранее русской популяции из г. Томска.

### Материалы и методы

**Объект исследования.** Контрольную группу составили случайные выборки из трёх популяций Якутии: пос. Бяди ( $n = 156$ ), пос. Дюпса ( $n = 113$ ) и пос. Чериктей ( $n = 127$ ), а группу больных с диагнозом алкоголизм – 102 мужчины из двух центральных улусов

Республики Саха (Якутия). Все группы однородны по этническому составу и представлены якутами. Материал исследования – ДНК, выделенная из периферической крови стандартным методом фенол-хлороформной экстракции.

Генотипирование полиморфизма *ADH1B*, *CYP2E1*, *DAT1*. Генотипирование трёх однонуклеотидных полиморфизмов – *ADH1B\*Arg47His*, *CYP2E1\*G/C* и *DAT1\*A/G* (NCBI Assasy ID rs1229984, rs3813867 и rs6347, соответственно) – проводили методами ПЦР и анализа ПДРФ, как описано ранее [6, 13, 14]. Полиморфизм *VNTR* в 3'-UTR *DAT1* тестировали по [17].

**Статистические методы.** Оценку соответствия распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга (PXB), наблюдаемые и ожидаемые гетерозиготности, сравнение частот аллелей для однонуклеотидных полиморфизмов проводили общепринятыми методами популяционной биометрии [3]. Для полиморфизма *VNTR* в 3'-UTR *DAT1* оценку соответствия распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга для множественных аллелей проводили с помощью точного теста по S. Guo и E. Thomson [11]. Для *VNTR DAT1*, чтобы устранить «шум», привносимый присутствием редких генотипов и/или аллелей, была осу-

ГУ НИИ медицинской генетики СО РАМН: **МАРУСИН Андрей Викторович** - к.б.н., н.с. e-mail: andrey.marusin@medgenetics.ru; **СПИРИДОНОВА Мария Геннадьевна** - к.б.н., н.с., maria.spiridonova@medgenetics.ru; **СТЕПАНОВ Вадим Анатольевич** - д.б.н., зам. дир. по науке, vadim.stepanov@medgenetics.ru; **МАКСИМОВА Надежда Романовна** - к.м.н., гл. н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, nogan@yandex.ru; **МАТВЕЕВА Нюргюяна Петровна** - с.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН.

ществлена редукция данных. Любой аллель с числом копий больше, либо меньше 10 рассматривался как один, менее распространённый аллель (X). Встречались аллели с 7, 9 и 11 копиями повтора. Оценку частот гаплотипов по EM-алгоритму (максимизации математического ожидания) и меры неравновесия по сцеплению по Левонтину (D') проводили в программе Haploview 3.2 (2005). Остальные расчёты проводили в программах «STATistica 5.5», «Excel» и «RxC». Принят уровень статистической значимости 5 %.

### Результаты и обсуждение

По полиморфизму *ADH1B\*Arg47His* был изучен пос. Бяди (n=53), а также выборка больных алкоголизмом (n=102). В обеих группах выполнялось равновесие Харди-Вайнберга, частоты мутантного аллеля *ADH1B\*47His* составили 12,3 % в группе больных и 9,4 % в выборке из пос. Бяди. Статистически значимого отличия частот аллелей не выявлено ( $\chi^2 = 0,58$ ;  $p = 0,448$ ). Ранее установлено, что аллель *ADH1B\*47His* обладает протекторным действием к алкоголизму у китайцев и японцев [13]. Возможно, это объясняется повышенной активностью фермента с *His* (гистидином) в 47 положении аминокислотной последовательности белка, накоплением ацетальдегида и его метаболитов, что вызывает отвращение к алкоголю. Однако данные для других популяций Восточной Азии и европеоидов противоречивы [8-10]. Вероятно, увеличение объёмов тестируемых выборок, позволит выявить связь генетической изменчивости *ADH1B\*Arg47His* с алкоголизмом в якутской популяции.

В трёх выборках популяционно-го контроля – посёлки Бяди, Дюся, Чериктей и в группе больных алкоголизмом по полиморфным вариантам *CYP2E1\*G/C*, *VNTR DAT1* и *DAT1\*A/G* выполняется PХВ, за исключением полиморфизма *DAT1\*A/G* в пос. Чериктей, вследствие недостатка гетерозигот. Наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности составили 10,2 и 16,7% соответственно. Возможно, это следствие низкой частоты аллеля *DAT1\*G* и небольшого объёма выборки (n = 49). Выявлены близкие к статистически значимым различия частот аллелей по полиморфизму *DAT1\*A/G* между посёлками Дюся – Чериктей ( $\chi^2 = 3,46$ ;  $p = 0,063$ ) и Бяди – Дюся по полиморфизму *CYP2E1\*G/C* ( $\chi^2 = 3,28$ ;  $p = 0,070$ ), а также статистически значимое различие по полиморфизму *VNTR DAT1* в частотах аллелей с 10 и с X (т.е. 7, 9 или 11) повторов между

**Таблица 1**  
Частоты и численности мутантных аллелей, генотипов и показатели генетической изменчивости полиморфизма *CYP2E1\*G/C*, *VNTR DAT1* и *DAT1\*A/G* в группах больных и контроля

Ген/аллель	Группа	Аллель (%)	Генотипы (%)			Hobs	Hexp	n	$\chi^2$	p
			11	12	22					
<i>CYP2E1*G/C</i> (*+Pst I)	A	14 (8,3)	70 (83,3)	14 (16,7)	0 (0)	16,6	15,3	84	0,69	0,405
	OK	36 (12,0)	117 (78,0)	30 (20,0)	3 (2,0)	20,0	21,1	150	0,42	0,516
<i>DAT1*G (-Dde I)</i>	A	35 (19,0)	60 (65,2)	29 (31,5)	3 (3,3)	31,5	30,8	92	0,05	0,824
	OK	30 (12,3)	94 (77,1)	26 (21,3)	2 (1,6)	21,3	21,6	122	0,02	0,896
<i>VNTR DAT1*X</i>	A	29 (14,1)	78 (75,7)	21 (20,4)	4 (3,9)	20,4	24,2	103	2,54	0,111
	OK	67 (8,5)	331 (83,6)	63 (15,9)	2 (0,5)	15,9	15,5	396	0,29	0,590

Примечание. А – больные алкоголизмом, ОК – общий контроль из трёх популяционных выборок, Hobs и Hexp значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности в %, n – объём выборки,  $\chi^2$  и p значения критерия и достигнутый уровень значимости соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга, для полиморфизма *VNTR DAT1* сравнивали аллель с 10 копиями повтора против остальных (X - 7, 9 или 11 копий повтора).

пос. Бяди и пос. Дюся ( $\chi^2 = 4,35$ ;  $p = 0,037$ ). Несмотря на вышеизложенные факты, данные о полиморфизмах *CYP2E1\*G/C*, *VNTR DAT1* и *DAT1\*A/G* для трёх посёлков были объединены и составили общую группу популяционного контроля. Так как, вероятно, обнаруженные отличия являются следствием стохастических и/или выборочных причин, а не отражают истинные генетические процессы, приводящие к изменчивости частот аллелей и генотипов в трёх популяциях Усть-Алданского улуса Республики Саха (Якутия). В дальнейшем анализе сравнивались частоты аллелей объединённого контроля (OK) с группой якутов, больных алкоголизмом.

Данные о частотах, численностях аллелей и генотипов полиморфизма *CYP2E1* и *DAT1*, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, соответствия PХВ в контрольной группе и у больных представлены в табл.1. В обеих группах по всем трём полиморфизмам выполняется PХВ. Так же как и в русской популяции из г. Томска [5], у якутов не выявлено статистически значимого отличия частот аллелей полиморфизма *CYP2E1\*G/C* между группами больных и объединённого контроля ( $\chi^2 = 0,62$ ;  $p = 0,429$ ). Ассоциация аллеля *CYP2E1\*G* с алкогольной болезнью печени выявлена, в популяции Республики Башкортостан [1].

Обнаружена близкая к статистически значимой повышенная частота (на 6,7 %) аллеля *DAT1\*G* в 9 экзоне гена ( $\chi^2 = 3,68$ ;  $p = 0,055$ ) и статистически значимо повышенная частота аллеля не с 10 копиями повтора (X) полиморфизма *VNTR DAT1* ( $\chi^2 = 5,93$ ;  $p = 0,015$ ) в группе больных алкоголизмом якутов (табл. 1). В изученной ранее русской популяции не было выявлено связи полиморфизма 1342 A/G в 9 эк-

зоне гена *DAT1* с алкоголизмом, а для полиморфизма *VNTR DAT1* ассоциация показана на уровне генотипов ( $p = 0,042$ ) и только близка к статистически значимой на уровне частот аллелей ( $p = 0,055$ ) [2].

Оценки нормализованной меры неравновесия по сцеплению (D') между полиморфизмами в гене *DAT1* составили 0,72 у больных (95 % доверительный интервал (95 % CI) 0,48-0,87; LOD-балл (натуральный логарифм отношения шансов за сцепление) равен 5,28) и 0,08 в контроле (95 % CI 0-0,29; LOD = 0,14). Таким образом, в выборке якутов больных алкоголизмом отмечено умеренное, статистически значимое сцепление, тогда как в объединённой выборке из трёх якутских популяций сцепление этих локусов отсутствует. Возможно, это является следствием большей генетической гетерогенности популяционных выборок.

В табл.2 представлены частоты гаплотипов и достигнутые уровни значимости различий между группами мужчин, страдающих алкоголизмом, и

**Таблица 2**

Ассоциация полиморфизма *VNTR* в 3'-UTR и 1342 A/G в 9 экзоне гена *DAT1* с риском формирования алкоголизма у якутов на уровне гаплотипов

Гаплотипы	A	OK	$\chi^2$	p
10_A	77,8	79,8	0,25	0,617
X_A	3,2	7,8	4,12	0,043
10_G	11,3	9,8	0,24	0,627
X_G	7,7	2,5	6,13	0,013
n	92	121		

Примечание. В таблице приведены частоты гаплотипов (в %) у больных алкоголизмом (A) и в общей контрольной группе (OK), значения критерия  $\chi^2$  и достигнутый уровень значимости (p) рассчитанные путём сравнения долей гаплотипов в группах, X - любой аллель *VNTR DAT1* не с 10 копиями повтора (7, 9 или 11 повторов).

контролем. Как видно из табл.2, у якутов, больных алкоголизмом, статистически значимо понижена частота гаплотипа «X\_A» на 4,5 % (протективное действие) и повышена частота гаплотипа «X\_G» на 5,2 % (предрасполагающее к болезни влияние). В изученной ранее популяции русских г. Томска, в противоположность якутской популяции, выявлено близко к статистически значимому ( $p = 0,058$ ) предрасполагающее к алкоголизму действие гаплотипа «X\_A» (у больных частота повышена на 6 %) и отсутствие влияния гаплотипа «X\_G» на подверженность к болезни. При этом эти локусы были умеренно, но статистически значимо сцеплены у больных и в контроле ( $D' = 0,40$ ;  $LOD = 2,82$  и  $D' = 0,60$ ;  $LOD = 4,94$ ) [2].

### Заключение

В настоящем исследовании изучено распределение частот аллелей и генотипов полиморфизмов двух генов этанол-метаболизирующих ферментов *ADH1B\*Arg47His* и *CYP2E1 Pst I (G/C)*, полиморфизм длин tandemных повторов (*VNTR*) в 3'-некодирующей области (3'-UTR) и 1342 A/G в 9 экзоне гена переносчика дофамина *DAT1 (SLC6A3)* в выборках из трёх якутских популяций в сравнении с группой больных алкоголизмом якутов. Три выборки якутских популяций составили общую группу популяционного контроля, в которой, как и в группе больных, по всем четырём изученным локусам выполнялось равновесие Харди-Вайнберга. У якутов не выявлено связи

полиморфизма этанол-метаболизирующих ферментов с подверженностью к алкоголизму. Обнаружена близкая к статистически значимой ассоциация полиморфизма A/G ( $p = 0,055$ ) и статистически значимая ассоциация *VNTR* в 3'-UTR гена *DAT1* ( $p = 0,015$ ) с алкоголизмом в якутской популяции. При этом в группе больных между этими локусами наблюдается умеренное неравновесие по сцеплению, которое отсутствует в контрольной группе. Выявлены гаплотипы: предрасполагающий к формированию алкоголизма «X\_G» ( $p = 0,013$ ) и протективный для болезни «X\_A» ( $p = 0,043$ ), где (X) – любой аллель не 10 копиями повтора (7, 9, или 11 повторов).

*Настоящая работа выполнена при поддержке грантов РФФИ: 07-04-01629-а, 09-04-99083-р\_офи.*

### Литература

1. Анализ полиморфизма генов, участвующих в метаболизме этанола у лиц с алкогольной болезнью печени / З.А. Шангареева [и др.] // Медицинская генетика. – 2003. – Т. 2, № 11. – С. 485-490.
2. Ассоциация полиморфизма 1342 A/G в экзоне 9 и длин tandemных повторов (*VNTR*) в 3'-некодирующей области (3'-UTR) гена переносчика дофамина *DAT1 (SLC6A3)* с риском формирования алкогольной зависимости в Западно-Сибирской популяции русских / А.В. Марусин [и др.] // Медицинская генетика. – 2008. – № 6. – С. 31-35.
3. Животовский Л.А. Популяционная биометрия / Л.А. Животовский. - М.: Наука, 1991. - 271 с.
4. Киржанова В.В. Наркологические расстройства в России / В.В. Киржанова // Демоскоп Weekly (электронная версия бюллетеня «Население и общество». – 2007. - № 275-276 [URL=<http://demoscope.ru/weekly/2007/0275/tema02.php>].
5. Полиморфизм генов этанол-метаболизирующих ферментов *ADH1B*, *ADH7* и *CYP2E1* и риск развития алкоголизма в русской популяции За-

падно-Сибирского региона / А.В. Марусин [и др.] // Мед. генетика. – 2006. – Т. 5, № 7 (49). – С. 51-56.

6. A global perspective on genetic variation at the *ADH* genes reveals unusual patterns of linkage disequilibrium and diversity / M.V. Osier [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2002. – V. 71, № 1. – P. 84-99.

7. Cotton N.S. The familial incidence of alcoholism: A review / N.S. Cotton // J. Stud. Alcohol. – 1979. – N 40. – P. 89–116.

8. Genetic and environmental influences on alcohol metabolism in humans / T.-K. Li [et al.] // Alcohol. Clin. Exp. Res. – 2001. – V. 25, N 1. – P. 136-144.

9. Genetic polymorphisms of *ADH2*, *ADH3*, *CYP4502E1 Dra-I* and *Pst-I*, and *ALDH2* in Spanish men: lack of association with alcoholism and alcoholic liver disease / [et al.] Vidal F. // J. Hepatol. – 2004. – V. 41, N 5. – P. 744-750.

10. Genetic time-series analysis identifies a major QTL for in vivo alcohol metabolism not predicted by in vitro studies of structural protein polymorphism at the *ADH1B* or *ADH1C* loci / A.J. Birley [et al.] // Behav. Genet. – 2005. – V. 35, N 5. – P. 509-524.

11. Guo S. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles / S. Guo, E. Tomson // Biometrics. – 1992. – Vol. 48. – P. 361-372.

12. Haplotype study of three polymorphisms at the dopamine transporter locus confirm linkage to attention-deficit/hyperactivity disorder / C.L. Barr [et al.] // Biol. Psychiatry. – 2001. – V. 49, N 4. – P. 333-339.

13. Lee Sh.-L. Functionality of allelic variation in human alcohol dehydrogenase gene family: assessment of a functional window for protection against alcoholism / Sh.-L. Lee, J.-O. Höö, Sh.-J. Yin // Pharmacogenetics. – 2004. – V. 14, №11. - P. 725-732.

14. Susceptibility to esophageal cancer and genetic polymorphisms in glutathione S-transferases T1, P1 and M1 and cytochrome P450 2E1 / D.-X. Lin [et al.] // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 1998. – V. 7, № 11. – P. 1013-1018.

15. Temperance board registration for alcohol abuse in a national sample of Swedish male twins, born 1902 to 1949 / K.S. Kendler [et al.] // Arch. Gen. Psychiatry. – 1997. – V. 54, N 2. – P. 178–184.

16. Unraveling the molecular mechanisms of alcohol dependence / G. Kalsi [et al.] // Trends Genet. – 2009. – N 1. – P. 49-55.

17. URL: [http://info.med.yale.edu/genetics/kkidd/SLC6A3\\_3VNTR.html](http://info.med.yale.edu/genetics/kkidd/SLC6A3_3VNTR.html)

## А.А. Семенова, Е.Я. Яковлева, А.Н. Ноговицына ЖЕНСКОЕ БЕСПЛОДИЕ: ЧАСТОТА, ЭТИОЛОГИЯ, ДИАГНОСТИКА ПО ДАННЫМ КОНСУЛЬТАЦИИ ПО РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА ПЕРИНАТАЛЬНОГО ЦЕНТРА РЕСПУБЛИКАНСКОЙ БОЛЬНИЦЫ №1 – НАЦИОНАЛЬНОГО ЦЕНТРА МЕДИЦИНЫ

УДК 618.177

**Цель исследования.** Изучение структуры, факторов риска и причин женского бесплодия.

**Материалы и методы.** Проведен ретроспективный анализ 500 амбулаторных карт женщин с бесплодием.

**Результаты исследования.** В структуре причин первичного бесплодия преобладает трубно-перитонеальное бесплодие (45,7%), эндокринное (23,9%) и генитальный эндометриоз (29,9%); вторичного - эти причины составляют 54,3, 19 и 8,9% соответственно. Основными этиологическими факторами женского бесплодия являются хронические воспалительные заболевания гениталий, эндометриоз, нарушение менструальной функции.

**Ключевые слова:** женское бесплодие, факторы риска, генетические исследования.

**СЕМЕНОВА Айталиа Афанасьевна** – врач акушер-гинеколог КРЧ ПЦ РБ№1-НЦМ, e-mail: 4aita@mail.ru; **ЯКОВЛЕВА Елизавета Яновна** – зав. Консультацией по репродукции человека ПЦ РБ№1-НЦМ; **НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна** – к.м.н., врач-генетик МГК ПЦ РБ№1-НЦМ, зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН, e-mail: nogovan@yandex.ru.

**Materials and methods.** The retrospective analysis of 500 out-patient cards of women with sterility is lead.

**Results of research.** In structure of the reasons of primary sterility tubal-peritoneal sterility (45, 7%), endocrine (23, 9%) and genital endometriosis (29, 9 %) prevail; at secondary - these reasons make 54, 3%, 19 and 8, 9 % accordingly. The basic etiologic factors of female sterility are chronic inflammatory diseases of genitals, endometriosis and menstrual function disorder.

**Keywords:** female sterility, risk factors, genetic researches.

## Введение

В настоящее время демографическая ситуация в России является крайне неблагоприятной как в количественном (уменьшение численности населения), так и в качественном отношении (снижение продолжительности жизни, демографическое старение и увеличение заболеваемости всех категорий населения, в том числе женщин и детей) [1]. Бесплодный брак продолжает оставаться достаточно сложной проблемой для современных специалистов акушеров-гинекологов [3]. Серьезность положения обусловлена высоким процентом бесплодия (15%), что, по данным ВОЗ, является критическим уровнем репродуктивной функции населения [4].

Установлено, что 30% всех пороков развития генетически обусловлены (20% генные мутации и 10% хромосомные aberrации), 10% вызваны вирусными инфекциями, а в 60% причину установить не удалось. Цитогенетические исследования выявили различные изменения кариотипа у 8 (9,35%) женщин из 86. Наибольшее число (у 4) хромосомных нарушений обнаружено у больных с удвоением матки и влагалища. У данных женщин фертильность сохранена. Были проведены исследования по всему комплексу генетической информации по полиморфизму локусов и биохимическим маркерам. Из всей совокупности проведенных исследований выявлена генетическая связь: а) с белками, сопряженными с дыхательной функцией, обеспечением тканей с кислородом, и б) с гормональным статусом (генетически зависимое изменение уровней ЛГ, пролактина, тестостерона, Т4). Моногенные формы врожденных пороков развития могут быть чаще при внутриматочных перегородках и синдроме Рокитанского – Кюстера [2].

Республика Саха (Якутия) является одним из немногих регионов Российской Федерации с малоизученной проблемой бесплодия. Географическое положение Якутии и суровые климатические условия обостряют любое негативное воздействие промышленной деятельности на экологическую обстановку и здоровье населения. Народы Севера, освоившие эту экстремальную по климатическим условиям часть планеты, в настоящее время находятся на пороге этнической катастрофы. За период с 1995 по 2002 г. население малочисленных народов Севера сократилось почти наполовину [5].

**Цель исследования** – изучение структуры, факторов риска и причин

женского бесплодия среди женщин коренной национальности.

## Материалы и методы

Проведен ретроспективный анализ 500 амбулаторных карт женщин якутской национальности с диагнозом бесплодие, обратившихся в консультацию по репродукции человека РБ №1-Национального Центра Медицины. Общеклиническое обследование было проведено по стандартной схеме, предусматривающей выяснение жалоб, сбор анамнеза, специальное гинекологическое обследование, дополнительно были изучены гормоны гипофизарно-яичниковой системы, ультразвуковая эхография органов малого таза и эндоскопические методы (гистероскопия, лапароскопия). Статистическая обработка данных выполнена на компьютере Aсег Aspire 5520 с помощью электронных таблиц Microsoft Excel. В результате проведенных цитогенетических исследований в медико-генетической консультации за 2000-2008 гг. выявлено 18 женщин с хромосомной патологией.

## Результаты

Наибольшее количество женщин были в возрастной группе 25-29 (37,6%) и 30 - 34 года (26,6%) (таблица). Средний возраст составил  $30 \pm 1,0$  лет.

Количество городских жителей 283 (56,6%), сельских - 217 (43,4%). По социальному положению преобладали служащие - 370 (74,0%), рабочие - 76 (15,2%), студенты - 10 (2,0%), неработающие - 44 (8,8%).

Все пациентки предъявляли жалобы на бесплодие. Длительность бесплодия 1-2 года отмечалась у 146 (29,2%), 3-5- у 160 (32,0), 6-10 - у 142 (28,4) и более 10 лет у 52 (10,4%). Первичным бесплодием страдали 237 (47,4%), вторичным - 263 (52,6) пациентки. У 437 (87,4%) пациенток возраст менархе 11 - 14 лет, позднее менархе у 63 (12,6). Нарушение становления менструальной функции отмечали 81 (16,2%) пациентка, из них у 36 менструальный цикл не восстановился. Альгодисменорея отмечалась у 260 (52%) пациенток, по типу олигоменореи у 74 (14,8%).

Начало половой жизни в возрасте 15-17 лет у 70 (14%), 18-20 лет у 288 (57,6), после 20 - у 142 (28,4) пациенток. Контрацепцию использовали 173 (34,6%) женщины, из них внутриматочную (ВМК) - 63 (36,5), оральные контрацептивы - 110 (63,5). Согласно анамнеза на фоне ВМК выявлены: эн-

дометрит у 17 (27,7%), гиперполименорея у 14 (22,2) и экспульсия контрацептива у 7 (11,1) пациенток. У 138 (52,4%) пациенток в анамнезе одна беременность, из них у 76 (55%) завершилась родами, у 76 (29%) - 2 беременности, у 28 (10,7) - 3, у 7 (2,9) - 4, у 7 (2,9) - 5, у 5 (1,9) - 6, у 2 (0,7) - 7. Количество абортот составил 44%, из них 2 и более - 29%, самопроизвольных выкидышей - 25%, внематочных беременностей - 12,7%. Трубное бесплодие встречалось у пациенток, имеющих медицинские аборты (57,8%) и внематочную беременность (23,6%) в анамнезе. На значительную частоту бесплодия после аборта указывают и другие авторы [4]. После сальпингоэктомии в связи с трубной беременностью у 54,7% женщин оставшаяся маточная труба оказалась непроходимой или функционально неполноценной [2].

Частые ОРВИ, тонзиллит, детские инфекции, грипп наблюдались у 401 (80,2%) женщины. Заболевания мочевыделительной системы у 193 (38,7%), верхних дыхательных путей у 169 (33,8%), органов дыхания у 59 (11,8%) и сердечно-сосудистой системы у 37 (26%), сочетание нескольких заболеваний у 96 (19,2%) пациенток.

В структуре гинекологических заболеваний преобладали воспалительные процессы органов малого таза (50,4%), нарушение менструальной функции (14,8%) и генитальный эндометриоз (11,8%).

Хирургическое лечение по поводу кисты яичников в анамнезе отмечали 34 (6,8%), внематочной беременности - 27 (5,4%); консервативная миомэктомия проведена у 4 (0,8%) пациенток.

Инфекции, передаваемые половым путем, выявлены у 42,7%, в каждом втором случае микст-инфекция. Среди выявленных возбудителей *ureaplasma urealiticum* и *mycoplasma hominis* в ассоциации с бактериальной инфекцией составили 41,5 и 32,3% соответственно, *chlamidia trachomatis* - 25,3%.

У 19,2% пациенток базальный уровень ФСГ на 2-3 день менструального цикла был выше нормальных значений и составил в среднем  $-14,3 \pm 1,2$  мМЕ/мл. Уровень прогестерона у 36,8% соответствовал нижней границе нормы, у

Распределение женщин по возрасту

Возраст	Кол-во пациенток	Уд.вес, в %
19-24 лет	108	21,6
25-29 лет	188	37,6
30-34 лет	133	26,6
35-39 лет	66	13,2
40-44 лет	5	1

19,2% - базальному уровню. О развитии вторичной гипофункции яичников на фоне хронического воспалительного процесса внутренних половых органов свидетельствует недостаточность лютеиновой фазы и ановуляция.

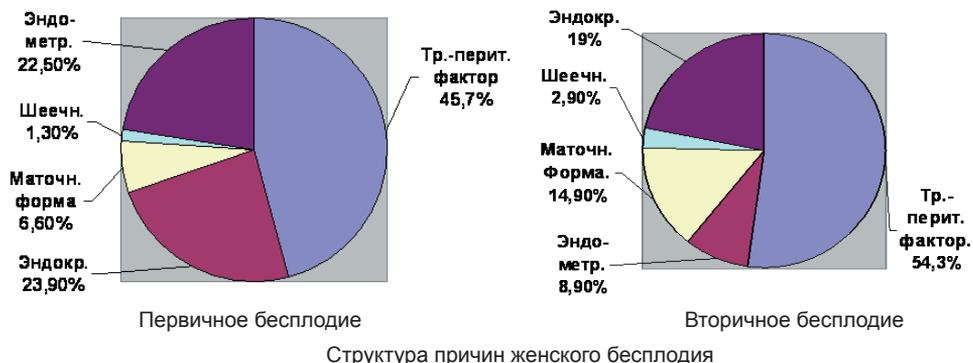
При эхографическом исследовании органов малого таза у 359 (71,8%) пациенток выявлена патология гениталий, в том числе: признаки воспалительного процесса придатков матки (48%), аденомиоз (16,2), доброкачественные опухоли и опухолевидные образования яичников (15,6), лейомиома (12,2), поликистоз яичников (7,2%).

Из 479 пациенток при гистеросальпингографии непроходимость маточных труб выявлена у 156 (31,2%), наиболее часто (42,9%) в ампулярном отделе. Гиперплазия, полипы эндометрия и внутриматочные синехии диагностированы у 24 (5%), аденомиоз у 19 (3,9), врожденные аномалии матки у 6 (0,2%) пациенток.

Патология эндометрия при гистероскопии выявлена у 88 (88,3%) пациенток из 105 обследованных. При патоморфологическом исследовании биопсийного материала наиболее часто диагностирована железистая гиперплазия эндометрия (20,9%), эндометрит (25,7), железистый полип (10,4) и эндометриоз (6,6%).

Лечебно – диагностическая лапароскопия проведена у 221 пациентки (одновременно с гистероскопией у 78), из них 107 с первичным и 114 с вторичным бесплодием. При первичном бесплодии трубно-перитонеальная форма выявлена у 46 (42,9%), наружный генитальный эндометриоз у 32 (29,9), поликистозные яичники у 6 (5,6), лейомиома у 4 (3,7) и сочетание патологии у 13 (12,1) пациенток, при вторичном бесплодии эта патология выявлена у 58 (50,8), 26 (22,8), 5 (4,3), 4 (3,5) и 9 (7,8%) соответственно.

Объем хирургического лечения следующий: сальпингооариолизис, фимбриолизис, сальпингостомия, консервативная миомэктомия. В 18 случаях проведена односторонняя, в 8 – двусторонняя сальпингоэктомия при выра-



женных деструктивных изменениях в маточных трубах.

На основании проведенного анализа выявлено, что у каждой второй пациентки имелось сочетание 2-4 факторов бесплодия органического и функционального характера. В структуре причин первичного бесплодия преобладали трубно-перитонеальное (45,7%), эндокринное (23,9%) и генитальный эндометриоз (22,5%). При вторичном бесплодии генитальный эндометриоз наблюдался в 3 раза реже (8,9%), внутриматочная патология в 2 раза чаще (14,9%), чем при первичном (6,6%) (рисунок).

У пациенток с хромосомной патологией первичная аменорея наблюдалась у 9 женщин с синдромом Шерешевского-Тернера (46,Х0), одна с дисгенезией гонад (46ХУ). У 4 пациенток с полисомией X хромосомы выявлены альгодисменорея. Заместительная терапия женскими половыми гормонами проводилась одной пациентке с синдромом Шерешевского-Тернера. У 4 женщин выявлены сбалансированные хромосомные транслокации, у которых нарушения репродуктивной функции в виде невынашивания и рождения детей с хромосомной патологией.

#### Выводы

В структуре причин первичного бесплодия преобладает трубно-перитонеальное бесплодие (45,7%), эндокринное (23,9%) и генитальный эндометриоз (29,9%); при вторичном бесплодии эти причины составляют 54,3, 19 и 8,9% соответственно.

Факторами риска трубно-перитонеального бесплодия являются хрониче-

ские, гинекологические заболевания; эндокринного – нарушение менструальной функции, ретенционные кисты и поликистозные яичники; маточного – эндометрит, внутриматочные синехии, врожденные аномалии развития матки; сочетание нескольких факторов встречается в 12,1% при первичном и 7,8% случаев при вторичном бесплодии.

Позапное комплексное обследование женщин с бесплодием с применением современных методов диагностики позволяют провести лечение, в том числе с использованием методов вспомогательных репродуктивных технологий.

При первичном бесплодии необходимо обследование супружеских пар в медико-генетической консультации с цитогенетическим анализом. Для наиболее углубленного выявления причин бесплодия и получения достоверной информации обследования необходимо дополнить молекулярно-генетическими исследованиями.

#### Литература

1. Адамян Л.В. Технология XXI века в гинекологии / Адамян Л.В., Сухих Г.Т. // Проблемы репродукции - 2008. – Спец. выпуск. - С. 5.
2. Адамян Л.В. Генетические аспекты гинекологических заболеваний / Л.В. Адамян, В.А. Спицын, Е.Н. Андреева. – М., Медицина. - 1999. С -131-206.
3. Казанцева Т.А. Оценка кровотока в яичниковых и маточных артериях у пациенток с оперированными и неоперированными яичниками в программах ЭКО /Казанцева Т.А., Клепикова А.А.// Российский вестник акуш.-гинеколог. – 2008. - №5. –С. 10.
4. Кулаков В.И. Гинекология: национальное руководство. / Кулаков В.И., Манухин И.Б. - М.: ГЭОТАР-медиа. - 2007.

Л.П. Назаренко

## ОЧЕРК О НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОМ СОТРУДНИЧЕСТВЕ МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ) И НИИ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ СО РАМН

*Люди вместе могут совершить то,  
чего не в силах сделать в одиночку;  
единение умов и рук, сосредоточение  
их сил может стать почти всемогущим.*

Д. Уэбстер

Поиск оптимальных путей снижения детской заболеваемости и смертности неизбежно приводит к необходимости изменения подходов к организации охраны здоровья матери и ребенка. Понимая важность сохранения здоровья будущего поколения, Министерство здравоохранения Республики Саха приняло решение о создании медико-генетической службы республики, которой в этом году исполняется 20 лет. Главным направлением медико-генетической службы является профилактика наследственных и врожденных заболеваний, снижение инвалидности и смертности обслуживаемого населения. Большой вклад в становление медико-генетической службы внесла талантливый организатор, профессионал, кандидат медицинских наук Ноговицына Анна Николаевна. На её плечи легла забота по организации службы: подготовка кадров разного профиля – врачи лаборанты цитогенетики, биохимики, врачи-генетики, акушеры-гинекологи – специалисты по ультразвуковой диагностике. Уже 19 лет и до сегодняшнего дня не прекращается тесное сотрудничество с НИИ медицинской генетики СО РАМН г. Томска по проблемам медико-генетического консультирования и изучению «груза» наследственных и врожденных пороков развития в республике. В апреле 1990г. врач-генетик Ноговицына А.Н. обратилась за помощью в консультации больных, которую проводили заочно по выпискам и фотографиям специалисты института. Начало службы, её становление началось со специализации специалистов в ведущих институтах России. Трудности: отсутствие необходимых реактивов, оборудования, отсутствие необходимой литературы – всё сказывалось на работе, невероятное упорство Анны Николаевны позволяет не впасть в отчаяние и про-

должать строительство службы. 1991 год, декабрь, лютые морозы. Главный педиатр Минздрава РС (Я) Григорьева А.Н. приглашает сотрудников института на переговоры о научно-практическом сотрудничестве. Совместная консультация семей с патологией позволяет увидеть не только организаторскую, но и профессиональную работу врача. На переговорах была достигнута предварительная договоренность о совместной работе по наследственной и врожденной патологии в 1993-1994гг. Министр экологии и природопользования Республики Саха (Якутия) доктор технических наук Чемизов Е.Н. и директор НИИ медицинской генетики ТНЦ РАМН, член-корр. РАМН, профессор Пузырев В.П. заключают договор о совместной работе по теме «Изучение груза наследственных болезней и анализ врожденных пороков развития в Верхневилуйском и Амгинском районах Республики Саха (Якутия) в качестве основы генетических последствий загрязнения окружающей среды». В результате исследований уровня наследственных заболеваний и врожденных пороков развития Республики Саха (Я) в регионах, отличающихся антропогенной нагрузкой, показано, что средняя частота врожденных пороков развития выше в экологически неблагоприятном районе. Впервые проведено изучение уровня мутационного процесса по критерию хромосомных aberrаций и сестринских хроматидных обменов в лимфоцитах периферической крови людей длительно проживающих в экологически неблагоприятном районе и экологически чистом районе. Показано, что частота клеток с хромосомными мутациями у жителей экологически загрязненного района статистически достоверно превышает частоту клеток у лиц, проживающих в экологически чистом районе. Обобщенный анализ груза моногенной наследственной патологии (аутосомно-доминантной, аутосомно-рецессивной и X-сцепленной) проведен в 2 районах республики. Сравнение груза

наследственных заболеваний в двух обследованных районах позволило определить, что он выше в Амгинском районе. Данное обстоятельство исследователи объяснили высокой степенью этнической эндогамии и генетическим дрейфом. Июнь 1994г. 70 лет педиатрической службе, проведение совместно научно-практического семинара для специалистов республики. В работе семинара принимали участие специалисты республики: Яковлев П.Н., министр здравоохранения РС(Я); Гурьева Р.С., зам. министра МЗ РС(Я); заведующие кафедрами МИ ЯГУ: Ханды М.В., Барашкова Н.Н., главные специалисты МЗ РС(Я): Замураева Г.Е., Кирова Н.Н. Из НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН принимали участие директор института Пузырев В.П. и руководители лабораторий Назаренко С.А. и Назаренко Л.П. Для практических врачей прочитаны лекции: «Медико-генетические проблемы в педиатрии». Сотрудничество продолжалось не только научное, но и практическое. В НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН ежегодно обучались кадры для работы в медико-генетической службе республики: врачи-генетики, врачи для работы в лабораторной службе.

Широкая распространенность, динамика естественного развития, тяжесть проявления и значительное укорочение продолжительности жизни лиц с наследственными болезнями и пороками развития лежит тяжелым бременем на социальной жизни общества. Резко растёт и экономический ущерб, связанный со снижением трудоспособности и производительности труда, с затратами на реабилитацию, лечение и содержание в специализированных домах больных с наследственными заболеваниями и врожденными пороками развития. Для продолжения работы по определению генетического груза среди населения республики был предложен проект. Департаментом по охране генофонда народов РСЯ МОП РС (Я) (директор- Кириллина В.И). в 2000 г. заключён договор с институтом на выполнение темы «Комплексная

оценка техногенных воздействий на генофонд и биологическое здоровье народа саха Усть-Алданского и Нюрбинского улусов Республики Саха (Якутия)». Результаты совместной работы обсуждены на конференции «Достижения современной науки в решении проблем охраны генофонда народов». Подготовлена и опубликована совместная монография: Назаренко Л.П., Назаренко С.А., Кириллина В.И., Прокопьева Ю.Н. «Генетико-экологическая оценка состояния здоровья жителей Якутии» (Якутск, 2001). Ноговицына Анна Николаевна обобщила проделанную за это время работу и успешно защитила в 2001г.

диссертацию на тему «Отягощенность населения Республики Саха (Якутия) наследственной патологией и анализ работы региональной медико-генетической консультации». Совместная научно-практическая работа НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН (директор – академик РАМН, профессор Пузырев В.П.) и Национального центра медицины МЗ РС (Я) позволила подготовить научных сотрудников, кандидатов медицинских наук: Банщикова Е.С., Максимова Н.Р., Сухомясову А.Л. Итогом совместной работы явилось создание Якутского научного центра РАМН и Правительства РС (Я) (директор - д.м.н.,

профессор Иванов А.И.) в настоящее время это Якутский научный центр комплексных медицинских проблем СО РАМН (директор - д.м.н. Томский М.И.). Ежегодно от трех до пяти сотрудников филиала и медико-генетической консультации республики стажировались в лабораториях института, осваивают новые технологии и с успехом внедряют их в лабораториях Якутска. Для повышения медико-генетических знаний врачей различных специальностей в 2007 г. организован выездной цикл лекций сотрудниками НИИ медицинской генетики СО РАМН по теме «Избранные вопросы медицинской генетики».

Г.Н. Бирюкбаева, А.Н. Ноговицына, Т.Я. Николаева, А.Б. Гехт  
**НОЧНАЯ ЛОБНАЯ ЭПИЛЕПСИЯ: ОПИСАНИЕ  
КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ**

УДК 616.8

Приведён клинический случай наблюдения ночной лобной эпилепсии, которая является формой фокальной идиопатической эпилепсии с ночными пароксизмами. Количество наблюдений данной формы невелико. Аутосомно-доминантная лобная эпилепсия стала первым моногенным синдромом среди идиопатических парциальных форм, при которых был картирован дефектный ген хромосомы 20q13.2 – 13.3.

**Ключевые слова:** эпилепсия, фокальная форма, ночные пароксизмы, ген.

A clinical case of nocturnal frontal lobe epilepsy that is a form of focal idiopathic epilepsy with night paroxysms is presented. A quantity of the given form observations is small. Autosomal dominant lobe epilepsy becomes the first monogenic syndrome among idiopathic partial forms in which defective gene of 20q13.2-13.3 chromosome has been carted.

**Keywords:** epilepsy, focal form, night paroxysms, gene.

Лобные доли мозга – область повышенного интереса в эпилептологии. Так же, как и височные доли, лобные отделы мозга являются фокусом преимущественного эпилептогенеза, где инициируется и распространяется эпилептический потенциал. Чрезвычайное богатство соматотопическими проекционными зонами определяет наличие ярких моторных и психических проявлений лобных эпилепсий, а также их относительную тяжесть и полиморфизм клинических и электроэнцефалографических проявлений.

Согласно основным положениям Классификации эпилепсии и эпилептических синдромов (Нью-Дели, 1989), лобная эпилепсия (ЛЭ) детского возраста дифференцирована на идиопатическую аутосомно-доминантную лобную эпилепсию (АДЛЭ) с ночными пароксизмами (Schefer I. et al., 1995) и симптоматические формы [1,2,4,7].

Симптоматические формы лобной эпилепсии – те формы, при которых

очаг патологической активности локализуется в лобных отделах коры; ЛЭ – вторая по частоте (после височной) среди симптоматических локально обусловленных форм эпилепсии. Частота её в популяции детей с эпилепсией оценивается от 18 до 30% случаев.

*Клиническая характеристика.* Возраст больного при дебюте аутосомно-доминантной эпилепсии с ночными пароксизмами варьирует от 2 мес. до 52 лет (чаще 2-8 лет). Согласно I. Schefer с соавт. [6], несмотря на очевидную возрастную вариабельность манифестации заболевания, в 80% случаев аутосомно-доминантная форма эпилепсии с ночными пароксизмами дебютирует в первые 20 лет, причём в первую декаду жизни – 53%, во вторую – 35%.

Наиболее типичными особенностями приступов у больных с аутосомно-доминантной лобной эпилепсией являются ауры, ночной характер и высокая частота пароксизмов, дебютирующих с крика и характеризующихся преимущественно моторными симптомами. Аура, хотя и встречается у большинства больных, не является специфической. По данным I. Schefer с соавт. [6], наиболее частыми аурами у больных с аутосомно-доминантной лобной эпилепсией является генера-

лизованное дрожание, головная боль, слуховая аура. Аура обычно способствует внезапному пробуждению. Но в отдельных случаях больной вспоминает об ауре только на следующий день при целенаправленном опросе.

Нередко (61%) приступ начинается с внезапного затруднения дыхания, громкого всхлипывания, хрюканья, стоны или вскрикивания. Глаза обычно открыты, взгляд неподвижен, иногда наблюдаются вращательные движения глазных яблок. Моторные расстройства во время пароксизмов разнообразны: гиперкинезы, тонические вытягивания, клонические подёргивания. Поведенческие изменения в момент пароксизма включают попытку сесть, насильственную гиперэкстензию, положение на четвереньках.

Большинство (70%) больных не теряют сознания и являются «наблюдателями» своего приступа. Больные отмечают, что во время приступов не могут контролировать движения, отвечать на вопросы, но слышат. 33% больных испытывают испуг в момент приступа и боятся заснуть. После приступа в большинстве случаев засыпают. Частота приступов в течение ночи, а также в течение фиксированного наблюдения отрезка жизни вариабельна. В течение ночи, как правило,

**БИРЮКБАЕВА Галина Николаевна** – к.м.н., докторант кафедры неврологии и нейрохирургии РГМУ; **НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна** – к.м.н., врач-генетик МГК ЦОМид, зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; **НИКОЛАЕВА Татьяна Яковлевна** – д.м.н., проф., зав. кафедрой МИ ЯГУ; **ГЕХТ Алла Борисовна** – д.м.н., проф. РГМУ.

отмечается серия кластерных атак, в среднем около восьми за несколько часов. В большинстве случаев приступы имеют циклолептическое течение и в случае отсутствия терапии наблюдаются еженедельно или ежемесячно [2,6,7].

Провоцирующие факторы не играют существенной роли в детерминировании приступов аутосомно-доминантной лобной эпилепсии. Однако в ряде случаев могут иметь значение стресс, переутомление. Нервно-психический статус больных с аутосомно-доминантной лобной эпилепсией с ночными пароксизмами, как правило, нормальный. Снижение интеллекта отсутствует [6].

По данным ЭЭГ у большинства больных эпилептические паттерны отсутствуют. При проведении ЭЭГ-мониторинга приступов аутосомно-доминантной лобной эпилепсии показано, что пароксизмы возникают преимущественно во 2 стадию медленного сна и характеризуются наличием билатеральных комплексов «острая-медленная волна» в лобных областях.

При нейрорадиологических исследованиях у большинства больных не выявляются патологические изменения или они неспецифичны.

Уже в ранних публикациях, посвящённых НЛЭ, подчёркивалась высокая частота семейных случаев эпилепсии в родословных пробандов. Такие семьи были описаны в Италии, Австралии, Англии, Канаде, Норвегии. Сегрегационный анализ семей, отсутствие кровно-родственных связей, привели к выводу об аутосомно-доминантном типе наследования НЛЭ с пенетрантностью 69%-81% и вариабельной экспрессивностью у поражённых родственников внутри одной семьи. Впервые Phillips H.A. с соавт. в 1995 г., проведя молекулярно-генетические исследования на материале семей из Австралии, локализовала ген, ответственный за развитие НЛЭ. Дефектный ген локализован на дистальном участке длинного плеча хромосомы 20 - локус 20q 13.2. Мутация затрагивает подтип альфа-4 никотиновых ацетилхолиновых рецепторов нейронов, локализованных в области 20q. 13.2 - 13.3, и приводит к замещению аминокислоты серина фенилаланином. Таким образом, НЛЭ стала первым моногенным синдромом среди идиопатических парциальных форм эпилепсии, при которых был картирован дефектный ген [6,7].

Появление спорадических случаев заболевания не исключает диагноза НЛЭ.

Представляем описание собственного клинического наблюдения ночной лобной эпилепсии, где прослеживается тенденция к семейному накоплению.

*Больной М., 48 лет, инвалид III группы, работает слесарем.* С 14-летнего возраста у больного наблюдаются ночные приступы, появляющиеся 1-2 раза в месяц. Приступы могут повториться за ночь до 2-4 раз и носят следующий характер:

1. Встаёт ночью, начинает ходить, что-то искать, в это время может говорить о каких-то служебных ситуациях. При этом его можно окликнуть и уложить, тем самым прекратить приступ.

2. Может сесть на кровати, имитировать движения одевания.

1-я и 2-я разновидности приступов могут закончиться тонико-клоническими судорогами длительностью 1-3 мин.

3. Часто приступ начинается с внезапного крика, закатывания глаз, прикуса языка, появления кровавой пены изо рта, тонических судорог, переходящих в клонические. Длительность приступа 5-7 мин.

Очень редко подобные приступы могут наблюдаться днём.

Объективный статус: невысокого роста, удовлетворительного питания. Раннее развитие психомоторных и речевых навыков происходило в соответствии с возрастом. В семейном анамнезе по эпилепсии прослеживается отягощённость по материнской линии - эпилептические припадки были у бабушки. У старшего сына в семилетнем возрасте наблюдался развёрнутый тонико-клонический приступ, у дочери в шестилетнем возрасте возник первый тонико-клонический приступ.

В неврологическом статусе: функция черепно-мозговых нервов без особенностей. Вызывается назо-лабиальный рефлекс. Парезов конечностей нет. Объем пассивных и активных движений полный. Мышечный тонус не изменён. Сухожильные рефлексы с двухглавых, трёхглавых мышц, коленные, ахилловы живые, равные. Карпорадиальные рефлексы умеренной живости, равные. Положительный кистевой симптом Россолимо с двух сторон. Нарушения глубокой и поверхностной чувствительности отсутствуют. Координаторные пробы выполняет удовлетворительно. Интеллект соответствует полученному образованию, социальному статусу и возрасту. Отмечает повышение нервозности перед развитием приступов. Длительное время принимал фенобарбитал в дозе

0,1. В настоящее время принимает карбамазепин в дозе 1200 мг в сутки.

ЭЭГ в состоянии бодрствования в межприступный период: регистрируются диффузные изменения БЭА мозга без очагов эпилептической активности. Магнитно-резонансная томография головного мозга: изменений со стороны мозга не выявлено. В анализе ликвора, лабораторных показателей крови и мочи без патологических отклонений.

Обобщая приведённое наблюдение, можно выделить ряд характерных особенностей.

1. Дебют заболевания в 14 лет.

2. Доброкачественное течение заболевания в течение 39 лет.

3. Отсутствие очаговой неврологической симптоматики в меж- и постприступный период.

4. Сохранный интеллект.

5. Парциальные приступы с выраженными моторными компонентами, вокализацией в начале приступа, иногда вторичной генерализацией.

6. Отсутствие зарегистрированных изменений на ЭЭГ.

7. Отсутствие изменений при проведении нейровизуализационных исследований.

8. В данной семье прослеживается накопление признака судорожных состояний.

Таким образом, представленная история болезни демонстрирует типичный случай НЛЭ с доброкачественным течением.

Из разных литературных источников известно, что основным диагностическим критерием НЛЭ является наличие ночных серийных гипермоторных приступов. К характерным особенностям заболевания могут быть отнесены следующие: вокализация в начале приступа, гипермоторные и тонические феномены в структуре приступа, неполная утрата сознания (простые парциальные пароксизмы), серийные ночные приступы, отсутствие изменений на ЭЭГ в межприступном периоде, положительный эффект карбамазепина в купировании приступов и их возобновление при отмене препарата. НЛЭ следует дифференцировать в первую очередь от состояний, характеризующихся ночными приступами - доброкачественными ночными парасомниями (ночные страхи, сногворенье, снохождение)). Необходимо дифференцировать НЛЭ-форму эпилепсии от пароксизмальной ночной дистонии, истерических приступов, семейных дискинезий, бронхиальной астмы [1,3,4,5].

В лечении НЛЭ препаратом абсолютного выбора является карбамазепин, применяемый в суточной дозе от 10 до 30 мг/кг, при хорошей переносимости выше. В наблюдении Schefer I. и соавт. лишь у 32% больных НЛЭ удалось достичь полной ремиссии при монотерапии карбамазепином. При неэффективности карбамазепина в максимально высоких дозах или при плохой его переносимости возможна монотерапия фенитоином или вальпроатами. Интересны наблюдения, что при правильно подобранной терапии АЭП и урежении приступов, исчезают жалобы пациентов на дневную сонливость и нарушение внимания. Применение барбитуратов не рекомендуется.

При отсутствии эффективной терапии пересестирование приступов

может продолжаться в течение всей жизни. Однако даже при отсутствии адекватного лечения, не отмечается возрастание частоты приступов или появление интеллектуального дефицита. Большинство авторов считают, что необходима очень длительная терапия АЭП (возможно в течение всей жизни). Вследствие небольшого числа наблюдений прогноз аутосамно-доминантной лобной эпилепсии не уточнен [6,7].

В заключение следует подчеркнуть, что при НЛЭ, даже при наличии спорадических случаев, необходимо проведение медико-генетического консультирования.

### Литература

1. Алиханов А.А. Лобная эпилепсия / А.А. Али-

ханов // Эпилептология детского возраста / ред. А.С. Петрухина. – 2000. – С.139-141.

2. Ситдинов А.Л. Каналопатии / А.Л. Зефи-ров, Г.Ф. Ситдикова // Дизрегуляторная патология нервной системы / Под ред. Е.И. Гусева, Г.Н.Крыжановского. – М., 2009 – С.275-317.

3. Префронтальная эпилепсия / В.А. Карлов [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии. – 1997. – №7. – С.8-12.

4. Мухин К.Ю. Редкие формы идиопатической парциальной эпилепсии / К.Ю. Мухин, А.С. Петрухин // Идиопатические формы эпилепсии: систематика, диагностика, терапия. – М., 2000 – С.209-216.

5. Никанорова М.Ю. Аутосамно-доминантная лобная эпилепсия с ночными пароксизмами / М.Ю. Никанорова // Эпилепсия и судорожные синдромы у детей / ред. П.А. Темина, М.Ю. Никаноровой. – 1999 – С.227-238.

6. Localisation of gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 20q13.2 / H.A. Phillips [et al.] // Nature Genetics. – 1995. – Vol.10. – №2. – P.117-119.

7. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: a distant clinical disorder / Schefer I. [et al.] // Brain. – 1995. – Vol.118. – №1. – P.61-73.

М.Г.Спиридонова, Н.В.Трапп, С.К.Степанова, А.В.Марусин, А.Л.Сухомясова, В.А.Степанов

## АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ В ГЕНЕ МЫШЕЧНОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ И АССОЦИАЦИЯ С МИОТОНИЧЕСКОЙ ДИСТРОФИЕЙ В ЯКУТСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

УДК: 577.21:575.17:575.1\2.018.3:572.575

В статье анализируются шесть однонуклеотидных полиморфизмов -Dralll, Hnal, Bpml, Hphl, Fnu4HI, Taql в гене миотонической протеинкиназы (DMPK) в двух группах представителей якутской популяции – больных миотонической дистрофией и здоровых коренных жителей Республики Саха (Якутия). Дана популяционно-генетическая характеристика обеих групп по всем изучаемым локусам, оценен относительный риск развития заболевания – он значительно увеличен для T-аллеля локуса Fnu4HI и для B аллеля локуса Taql. При сравнении исследованных групп по частотам гаплотипов выявлена предрасполагающая к миотонической дистрофии роль гаплотипов h1 и h2. Гаплотипы же h4 и h5, напротив, можно рассматривать как протективные. Анализ структуры неравновесия по сцеплению в группе больных не выявил блоков сцепления. В контрольной выборке были обнаружены два коротких блока сцепления.

**Ключевые слова:** якутская популяция, ген мышечной протеинкиназы, неравновесие по сцеплению, полиморфный маркер.

Six SNP markers - Dralll, Hnal, Bpml, Hphl, Fnu4HI, Taql in the DMPK gene in healthy and myotonic dystrophy Yakuts, residing in the settlements located on the territory of the Republic of Sakha (Yakutia) were analysed. The population-genetics characteristic and relative risk of six locus have been studied. The relative risk for T-allele Fnu4HI and B-allele Taql increased significantly. The analysis groups healthy and myotonic dystrophy Yakuts were revealed the predispose roles to myotonic dystrophy h1 and h2 haplotypes. The haplotypes h4 and h5 are protective roles on the contrary. The analyses of linkage disequilibrium in myotonic dystrophy Yakuts were investigated. The block of adhesion in *tHis* group is not shown. Two short blocks in healthy group were detected.

**Keywords:** Yakut population, muscle proteinkinase gene, linkage disequilibrium, polymorphous marker.

### Введение

Миотоническая дистрофия (МД) представляет собой наследственное нейромышечное заболевание, связанное с экспансией tandemных тринуклеотидных повторов CTG в 3'-нетранслируемой области гена мышечной

протеинкиназы. Ген мышечной протеинкиназы (DMPK) картирован на коротком плече 19 хромосомы в области 13.2 – 13.3, содержит 15 экзонов. Для исследования миотонической дистрофии была взята именно якутская популяция, так как в ней встречаемость заболевания значительно превышает этот показатель по России. По результатам исследований МД в популяции якутов, частота этого заболевания – 21,28 на 100 тыс. населения [6]. При исследовании структуры генофонда якутов ранее было выявлено невысокое генетическое разнообразие в этой популяции [5]. Имеется большое количество публикаций по изучению CTG-повторов в гене DMPK [1,2,4,8,9,15]. Выявлены популяционные различия в числе CTG-повторов в норме и патологии; в распространенности МД в различных регионах, этнических груп-

пах; в характере самого заболевания. Кроме CTG-повторов, представляет определённый интерес исследование однонуклеотидных полиморфизмов – SNP, которые чаще всего представлены двумя аллельными вариантами. Они широко распространены в геноме человека, стабильны и более многочисленны, чем какие-либо другие полиморфные варианты (частота 1/1000 [10]). Эти свойства делают SNP удобными для изучения генетического разнообразия в популяциях человека. В настоящее время, по данным NCBI, в гене DMPK выявлено более 100 SNP. Неоднократно показана корреляция увеличения числа повторов в различных популяциях с определёнными гаплотипами [12]. Важным также представляется изучение блочной архитектуры неравновесия по сцеплению (LD) в геноме человека. LD является

**СПИРИДОНОВА Мария Геннадьевна** - к.б.н., н.с. НИИ медицинской генетики СО РАМН, e-mail: maria.spiridonova@medgenetics.ru; **ТРАПП Наталья Викторовна** - студентка Биологического института ТГУ; **СТЕПАНОВА Светлана Кимовна** - с.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН; **МАРУСИН Андрей Викторович** - к.б.н., н.с. НИИ медицинской генетики СО РАМН, andrey.marusin@medgenetics.ru; **СУХОМЯСОВА Айталиа Лукична** - к.м.н., зав. МГК РБ№1-НЦМ, зав.лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; **СТЕПАНОВ Вадим Анатольевич** - д.б.н., зам.директора по науке НИИ медицинской генетики СО РАМН, vadim.stepanov@medgenetics.ru.

значимой популяционной характеристикой, позволяющей судить о порядке и примерном времени возникновения различных мутаций [13]. Обнаружение различных блоков в выборке больных MD и в контрольной группе будет свидетельствовать о наличии определенной характерной для якутского этноса блочной структуры в гене DMPK.

Все эти сведения и предпосылки привели к необходимости проанализировать полиморфные локусы в гене мышечной протеинкиназы, часть из которых находится в непосредственной близости к тринуклеотидным повторам и фланкирует их, что и было сделано в данной работе. В дальнейшем предполагается провести оценку количества тринуклеотидных СТГ-повторов среди населения Якутии и анализ взаимосвязи числа повторов с изученными локусами гена мышечной протеинкиназы.

#### Материалы и методы исследования

Для исследования использовалась ДНК, выделенная из крови 129 якутов, проживающих в центральных и северных улусах Республики Саха (Якутия), свободных от диагноза миотоническая дистрофия, и 51 больного миотонической дистрофией, представителей коренного населения Якутии. Для анализа применялись методы ПЦР и рестрикции с последующей визуализацией фрагментов с помощью агарозного гель-электрофореза. Кровь хранилась в морозильных камерах при температуре -24°C, в качестве антикоагулянта использовался буфер 0.5 М ЭДТА pH 8,0. Для выделения ДНК использовался макрометод, разработанный М. Johns [14] и дополненный Л. Kunkel [7]. Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) исследовали область гена мышечной протеинкиназы, содержащую полиморфные маркерные локусы – DraIII, HhaI, BpmI, HphI, Fnu4HI, TaqI.

Для полиморфизма Dra III «Т» аллель соответствовал ам-

плифицированному 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, быстро выходил 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 Bpm 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 Fnu4HI 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.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью статистических программ «GenSTAT», «STATistica 6.0» и критерия Фишера. Различие двух сравниваемых величин считалось достоверным с надежностью  $p > 0,95$ , если вероятность их тождества оказывалась меньше 5%. Неравновесие по сцеплению оценивали с помощью нормализованного коэффициента неравновесия по сцеплению  $D'$  в программе «Haploview». Блочная структура определялась по-

редством алгоритма «Solid Spine», при пороговом значении  $D' > 0.8$ . Для определения отношения шансов развития заболевания использовался коэффициент Odds Ratio (OR), вычисляемый в компьютерной программе «STATcalc».

#### Результаты и обсуждение

Частоты генотипов и аллелей, гетерозиготность и соответствие равновесию Харди-Вайнберга по 6 изученным SNP представлены в табл.1

Практически по всем локусам в контрольной выборке наблюдается соответствие равновесию Харди-Вайнберга. Исключение составляет лишь локус Bpm I, отклонение в котором связано с нехваткой гетерозигот и большим количеством гомозигот по G-аллелю. В контрольной группе лишь для локуса Dra III гетерозиготность составила 0.4827, а по большинству локусов наблюдалась низкая частота ожидаемой гетерозиготности, что ещё раз подтверждает уже неоднократно описанный низкий уровень генетического разнообразия в якутской популяции [3,5], свидетельствующий о наличии эффекта основателя.

При попарном сравнении частот генотипов изученных полиморфных вариантов гена в группе больных и контрольной выборке было найдено значимое отличие по трём локусам: Hha I, Fnu4HI и TaqI. Относительный риск развития заболевания (OR) значимо ( $p < 0.01$ ) увеличен для Т-аллеля

Таблица 1

Частоты аллелей изучаемых локусов, распределение генотипов и гетерозиготность в контрольной выборке якутов

Полиморфизм	Частоты аллелей		Наблюдаемое распределение генотипов		Наблюдаемая гетерозиготность ( $H_o$ )		Ожидаемая гетерозиготность ( $H_e$ )		Отклонение Х-В Значение $\chi^2$	
	Больные MD (N=51)	Контроль (N=129)	Больные MD (N=51)	Контроль (N=129)	Больные MD (N=51)	Контроль (N=129)	Больные MD (N=51)	Контроль (N=129)	Больные MD (N=51)	Контроль (N=129)
Dra III Tel to exon 1	(G) 0.3235 (T) 0.6765	(G) 0.4070 (T) 0.5930	(GG) 3 (GT) 28 (TT) 20	(GG) 24 (GT) 57 (TT) 48	0.5490± 0.0697	0.4419± 0.0437	0.4444± 0.0314	0.4827± 0.0116	2.8235 ( $p > 0.05$ )	0.9231 ( $p > 0.05$ )
HphI Intron 4	(T) 0.8628 (G) 0.1373	(T) 0.8876 (G) 0.1124	(TT) 40 (TG) 8 (GG) 3	(TT) 103 (TG) 23 (GG) 3	0.1569± 0.0509	0.1783± 0.0337	0.2368± 0.0491	0.1995± 0.0304	5.8141 ( $p < 0.05$ )	1.4620 ( $p > 0.05$ )
Hha I Intron 5	(C) 0.5490 (T) 0.4510	(C) 0.8760 (T) 0.1240	(CC) 13 (CT) 30 (TT) 8	(CC) 100 (CT) 22 (TT) 6	0.5882± 0.0689	0.2016± 0.0353	0.4952± 0.0118	0.2173± 0.0308	1.8250 ( $p > 0.05$ )	0.6772 ( $p > 0.05$ )
Bpm I Exon 10	(C) 0.9020 (G) 0.0980	(C) 0.8450 (G) 0.1550	(CC) 42 (CG) 8 (GG) 1	(CC) 98 (CG) 22 (GG) 9	0.1569± 0.0509	0.1705± 0.0331	0.1769± 0.0469	0.2620± 0.0310	0.6517 ( $p > 0.05$ )	15.7198 ( $p < 0.001$ )
Fnu4HI Intron 11	(G) 0.1863 (T) 0.8137	(G) 0.7713 (T) 0.2287	(GG) 9 (GT) 1 (TT) 41	(GG) 78 (GT) 43 (TT) 8	0.0189± 0.0187	0.3333± 0.0415	0.3398± 0.0451	0.3528± 0.0283	47.4776 ( $p < 0.01$ )	0.3917 ( $p > 0.05$ )
TaqI 15kb Centr	(B) 0.5588 (A) 0.4412	(B) 0.9109 (A) 0.0891	(BB) 11 (BA) 35 (AA) 5	(BB) 106 (BA) 23 (AA) 0	0.5588± 0.0650	0.1783± 0.0337	0.4931± 0.0133	0.1624± 0.0291	7.8294 ( $p < 0.1$ )	1.2357 ( $p > 0.05$ )

Таблица 2

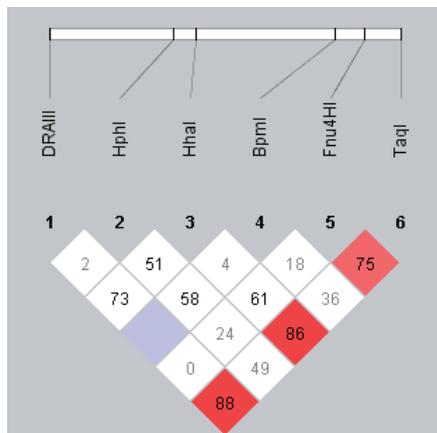
Гаплотипы, их частоты и результаты попарного сравнения в изучаемых группах

№ Гаплотип	Частота гаплотипа		Значение $\chi^2$
	Больные MD(N=51)	Контроль (N=129)	
h1 G T C C G T	0.3330	0.0526	$\chi^2=9.82$ (P<0.05)
h2 T T C C G T	0.3100	0.0789	$\chi^2=6.63$ (P<0.05)
h3 T T C C T T	0.0714	0.0526	$\chi^2=0.12$ (P>0.05)
h4 T T T C T C	0.0714	0.3420	$\chi^2=9.14$ (P<0.05)
h5 G T C C T T	0.0476	0.2370	$\chi^2=6.02$ (P<0.05)
h6 T T C G G T	0.0238	0.0263	$\chi^2=0.01$ (P>0.05)
h7 T G C G G T	0.0476	0	$\chi^2=0.63$ (P>0.05)
h8 T G C G T T	0.0238	0	
h9 T G T G G T	0.0238	0	
h10 T T T C G T	0.0238	0	
h11 T T T C G C	0.0238	0	
h12 T G C C T T	0	0.0526	
h13 T T T G T C	0	0.0526	
h14 G G C C G T	0	0.0263	
h15 T T C C T C	0	0.0263	
h16 T T T C T T	0	0.0263	
h17 G G C C T T	0	0.0263	

локуса Fnu4HI и для В аллеля локуса TaqI – у носителей этого аллеля шанс развития заболевания возрастает более чем в 14 раз. Для Т-аллеля локуса HhaI – только в 5 раз. Для остальных аллелей значимого увеличения риска развития миотонической дистрофии выявлено не было.

При анализе возможных гаплотипов, в исследованной контрольной популяции выявлено 22 гаплотипа, а в группе больных – 20. 17 гаплотипов встречались с частотой больше 1%. В группе больных всего 2 гаплотипа составляли 64 % всех наблюдаемых – это гаплотипы h1 и h2. В контрольной группе также 2 гаплотипа составляли 58 % наблюдений – это гаплотипы h4 и h5. Остальные 11 гаплотипов, численность которых не превышает двух в каждой группе, показали в совокупности незначимые различия по частотам встречаемости (табл.2).

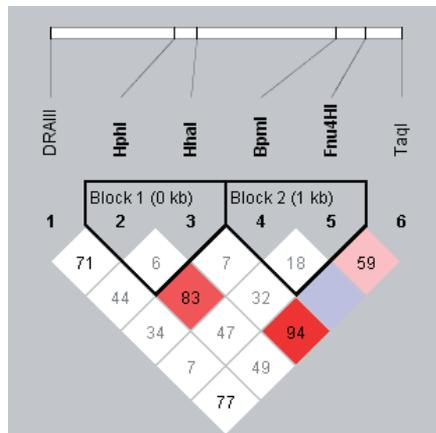
а



ной выборке были обнаружены два непротяжённых блока сцепления. Первый (0.7kb), в области 4-6 экзона гена, включает 2 SNP (HphI и HhaI). Второй блок протяжённостью 1 kb в области 10-12 экзона гена DMPK (близко к области CTG-повторов) составляют также 2 SNP (BpmI и Fnu4HI) (рисунок). Отсутствие блоков в выборке больных можно объяснить гетерогенностью выборки – больные являются представителями всех географических уголков территории Республики Саха (Якутия), тогда как в контрольную группу входят представители более компактно расположенных центральной и северной части Якутии.

Кроме сцепленных блоков, в контрольной группе было обнаружено сильное сцепление между парами локусов HphI- BpmI ( $D'=0.831$ ) и HhaI- TaqI ( $D'=0.948$ ). В группе больных также наблюдалось сильное сцепление

б



Структура неравновесия по сцеплению в группе больных (а) и популяционной группе (б)

При сравнении исследованных групп по частотам гаплотипов выявлена достоверные различия гаплотипов h1, h2, h4 и h5 между выборкой больных и контрольной (P<0.05). По полученным данным, гаплотипы h1, h2 ассоциированы с миотонической дистрофией и являются предрасполагающими к заболеванию в якутской популяции. Гаплотипы h4 и h5, напротив, можно рассматривать как протективные.

Анализ структуры неравновесия по сцеплению в группе больных не выявил блоков сцепления. В контроль-

между отдельными локусами – DrIII- TaqI ( $D'=0.883$ ), HphI- TaqI ( $D'=0.867$ ) и Fnu4HI- TaqI ( $D'=0.755$ ).

### Выводы

При анализе двух групп – больных миотонической дистрофией и контрольной выборки было обнаружено, что относительный риск развития заболевания в якутской популяции значимо увеличен для Т-аллеля локуса Fnu4HI и для В аллеля локуса TaqI. Выявлена предрасполагающая к миотонической дистрофии роль гаплотипов h1 и h2 и протективная – гаплотипов h4 и h5. Анализ структуры неравновесия по сцеплению в группе больных не выявил блоков сцепления. В контрольной выборке были обнаружены два непротяжённых блока сцепления. Дальнейшая работа по исследованию гена мышечной протеинкиназы предполагает исследование гаплотипов по полиморфным сайтам гена DMPK и поиск их сцепления с патологическими аллелями – CTG-повторами в популяции якутов, проживающих в Республике Саха.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ. Грант № 07-04-01629-а.

### Литература

1. Анализ аллельного полиморфизма триплетных повторов (CTG)<sub>n</sub> и (CAG)<sub>n</sub> в генах DM, DRPLA и SCA1 в различных популяциях России / С.Н. Попова [и др.] // Генетика человека. – 2002. – Т. 38, № 11. – С.1549-1553.
2. Изучение аллельного полиморфизма и анализ гаплотипов гена мышечной протеинкиназы у жителей северо-западного региона России и у больных миотонической дистрофией / О.В. Малышева [и др.] // Генетика человека. – 1998. – Т. 34, № 2. – С.259-299.
3. Медико-генетическое исследование населения Республики Саха (Якутия): сб. науч. тр. / под ред. В.П. Пузырева. – Якутск: ЯФ Изд-ва СО РАН, 2002. – 160 с.
4. Полиморфизм CTG-повторов в гене DMPK в популяциях Якутии и Центральной Азии / Фёдорова С.А. [и др.] // Мол.Биол.-2005.- Т.39(3).-С. 385-393.
5. Степанов В.А. Этногеомика населения Северной Евразии / В.А. Степанов. – Томск: Печатная мануфактура, 2002. – 244 с.
6. Сухомясова А.Л. Аутосомно-доминантная миотоническая дистрофия в республике Саха (Якутия): автореф. дис...канд. мед. наук / А.Л.Сухомясова.– Томск, 2005.– 28 с.
7. Analysis of human Y-chromosome specific reiterated DNA in chromosome variants / L. Kunkel [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci USA. – 1977. – V. 74. – P.1245-1249.
8. Carson N.L. Analysis of repetitive regions in myotonic dystrophy type 1 and 2. Curr Protoc Hum Genet. 2009 Apr;Chapter 9:Unit9.69
9. CTG repeat polymorphism in DMPK gene in healthy Yugoslav population / B. Cuijkovic [et al.] // Acta Neurologica Scandinavica. – 2002. – V.105. – P. 55-58
10. CTG expansion & haplotype analysis in DM1 gene in healthy Iranian population / B. Shojasaffar [et al.] // Can J Neurol Sci. – 2008.- V.35(2).-P.216-219
11. DMPK-associated myotonic dystrophy and CTG repeats in Alabama African Americans / RT.

Acton [et al.] // Clin Genet. - 2007. - V.72(5). - P.448-453

12. Haplotype analysis of the DM1 locus in the Serbian population / D. Krndija [et al.] // Acta Neurol Scand. - 2005. - V.111(4). - P.274-277.

13. High resolution genetic analysis suggests

one ancestral predisposing haplotype for the origin of the myotonic dystrophy mutation / E. Neville [et al.] // Human Molecular Genetics. - 1994. - V. 3, № 1. - P.45-51.

14. Johns M. Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place

of phenol / M. Johns, J. Paulus-Thomas // Anal. Biochem. - 1989. - V. 180, № 2. - P.276-278.

15. Structure and genomic sequence of the myotonic dystrophy (DM kinase) gene / M.S. Mahadevan [et al.] // Human Molecular Genetics. - 1993. - V. 2, № 3. - P.299-304.

И.В. Довжикова, М.Т. Луценко

## АКТИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ОБРАЗОВАНИЯ НАДФ В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ, ОСЛОЖНЕННОЙ ОБОСТРЕНИЕМ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

УДК: 618.2/36:616.523:577.175.6

Целью работы была оценка активности НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы и работы пентозофосфатного пути в плаценте при беременности, осложненной обострением герпетической инфекции. Гистохимическими методами оценена работа ферментов в 26 плацентах и 38 ворсинчатых хорионах, взятых при проведении медицинских абортотворов и родах в срок. Выявлено снижение их активности при беременности, осложненной обострением герпетической инфекции.

**Ключевые слова:** плацента, герпес, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа.

The purpose of work was an estimation of NADPh-dependent malatdehydrogenase activity and pentose phosphate way's work in placenta at the pregnancy complicated by an aggravation of herpetic infection. We estimated by histochemical methods work of enzymes in 26 placentae and 38 villiferous chorions, taken during medical abortions and delivery at term. Decrease in their activity is revealed at the pregnancy complicated by aggravation of herpetic infection.

**Keywords:** placenta, herpes, glucose-6-phosphatedehydrogenase, malatdehydrogenase.

### Введение

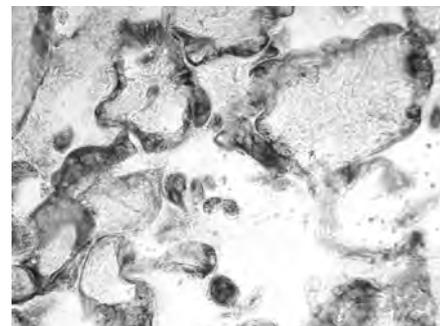
При обострении герпетической инфекции наблюдается снижение содержания холестерина и стероидных гормонов [2]. Одним из факторов, регулирующих процессы синтеза данных стероидов, считается достаточная концентрация НАДФ [6]. Примерно половину его количества составляет пентозофосфатный путь окисления глюкозы, маркером работы которого считается глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. Другая половина никотинамидадениндинуклеотидфосфата образуется за счет НАДФ-зависимой формы малатдегидрогеназы [4]. Малатдегидрогеназа – фермент, расщепляющий яблочную кислоту. В клетках присутствуют две его формы: НАД+ и НАДФ+ - зависимые. Первая расположена в митохондриях, катализирует образование оксалоацетата и участвует в цикле Кребса. Вторая осуществляет окислительное декарбоксилирование субстрата до пировиноградной кислоты в цитоплазме. В доступной нам современной литературе каких-либо данных об активности НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы в плаценте не обнаружено. Отсутствуют и сведения об изменениях ее интенсивности при наличии герпетической, а также другой инфекционной патологии у беременной. Несмотря на то, что активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в плаценте более изучена, данных о ее поведении при обострении герпетической инфекции в литературе недостаточно.

**ДОВЖИКОВА Инна Викторовна** – к.б.н., с.н.с. ДНЦ ФПД СО РАМН, (4162)44 12 27; **ЛУЦЕНКО Михаил Тимофеевич** – д.м.н., проф., руковод. лаб. ДНЦ ФПД СО РАМН, kantz-cfpd@amur.ru.

Целью нашей работы была оценка активности НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы и работы пентозофосфатного пути (по его маркеру – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназе) в плаценте при беременности, осложненной обострением герпетической инфекции.

### Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужили 38 хорионов, взятых при проведении медицинских абортотворов, и 26 зрелых плацент, полученных во время родов от практически здоровых женщин и матерей, имевших во время беременности лабораторно диагностированное обострение герпетической инфекции (титр антител 1:12800). В зависимости от течения беременности материал был разделен на группы: основную и контрольную. По значимым параметрам (возраст, акушерско-гинекологический анамнез, наличие других хронических соматических заболеваний) на момент исследования сравниваемые группы достоверно не различались.



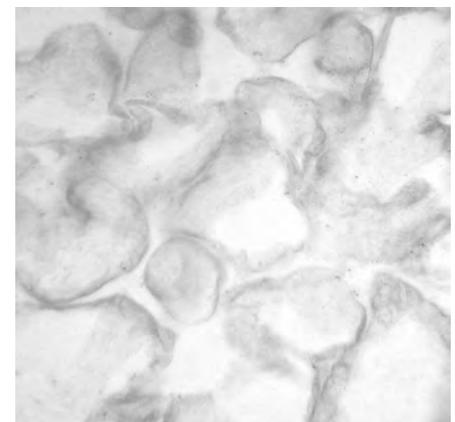
**Рис. 1.** Зрелая плацента. Контрольная группа. Гистохимическая реакция на НАДФ-зависимую малатдегидрогеназу. В рис.1-4 увеличение 10 ×40

Диагностику герпетической инфекции осуществляли путем определения антител класса М и G к вирусу простого герпеса иммуноферментным методом с помощью стандартных тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск) на аппарате спектрофотометр «STAT-Fax 2100» (USA).

Для изучения работы НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы был применен метод определения дегидрогеназ по прописи Z. Lojda (1965) [3]. Количество образующихся продуктов реакции подсчитывали с помощью программы компьютерной цитофотометрии методом измерения на стандартную единицу площади 0,01 (зонд) в 100 различных точках объекта.

### Результаты и их обсуждение

Проводилось изучение активности НАДФ-зависимой малатдегидро-



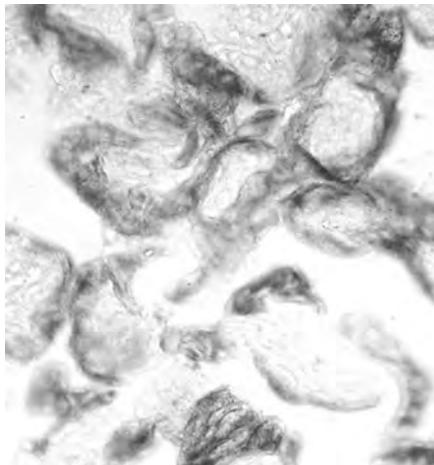
**Рис. 2.** Зрелая плацента. Обострение герпетической инфекции (титр антител 1:12800). Снижение интенсивности гистохимической реакции на НАДФ-зависимую малатдегидрогеназу

геназы в плаценте. Фермент хорошо выявлялся в синцитиотрофобласте и цитотрофобласте хориальных ворсин, начиная с 4-й недели внутриутробного развития (рис. 1). Цитофотометрически его содержание составило  $2,6 \pm 0,08$  усл.ед. В соединительнотканной стро-ме и сосудах наблюдались следы гистохимической реакции. При исследовании ворсинчатого хориона отмечалось возрастание интенсивности окраски трофобласта по мере увеличения срока гестации до 12-13 недель.

В плацентах от женщин, перенесших обострение герпетической инфекции (титр антител класса Ig G к вирусу простого герпеса – 1:12800), отмечалось снижение активности гистохимической реакции на НАДФ+-зависимую малатдегидрогеназу ( $1,1 \pm 0,03$  усл.ед.) (рис.2). Данный факт свидетельствовал об уменьшении содержания продуктов, образующихся в результате ферментативной реакции.

Мы провели исследование интенсивности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в плаценте беременных контрольной группы. Фермент очень хорошо выявлялся в синцитио- и цитотрофобласте ворсин (рис. 3). Цитофотометрически его содержание составило  $4,8 \pm 0,06$  усл. ед. Небольшое количество энзима определялось в эпителии сосудов ворсин и совсем незначительное – в соединительнотканной стро-ме. В плацентах от женщин, перенесших обострение герпеса (титр антител класса Ig G к вирусу простого герпеса – 1:3200) в третьем триместре беременности, наблюдалось умеренное снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, вырастающее до значительного ( $2,5 \pm 0,04$  усл. ед.) в тех случаях (рис. 4), когда вспышка инфекции происходила незадолго до родов (титр антител класса Ig G к вирусу простого герпеса – 1:12800).

Зарубежными исследователями была установлена свободнорадикаль-

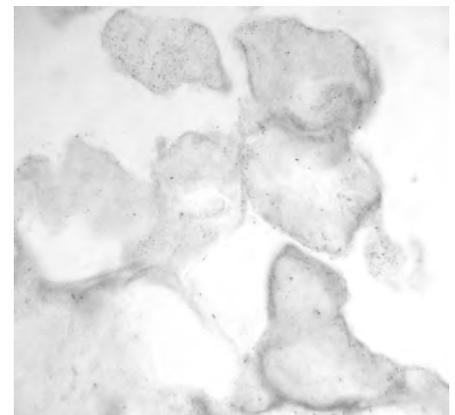


**Рис. 3.** Зрелая плацента. Контрольная группа. Гистохимическая реакция на глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу

ная инактивация глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [7], то есть повышенное количество свободных радикалов снижает активность энзима. Ранее нами было отмечено, что при обострении герпетической инфекции в плаценте наблюдается увеличение содержания перекисей жирных кислот, а также повышение активности NO-синтазы [1,5], мы полагаем, что это послужило одной из причин угнетения интенсивности работы выявляемого нами фермента.

#### Заключение

Таким образом, при обострении герпетической инфекции отмечается снижение интенсивности работы НАДФ+-зависимой малатдегидрогеназы и уменьшение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, свидетельствующее о низкой степени работы пентозофосфатного пути. Полученные факты позволяют прийти к выводу о падении концентрации одного из важнейших кофакторов – НАДФ+, что могло отразиться на многих процессах, в том числе и на биосинтезе стероидов, снижение активности которого мы отмечали в наших исследованиях [2].



**Рис. 4.** Зрелая плацента. Обострение герпетической инфекции (титр антител 1:12800). Снижение интенсивности гистохимической реакции на глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу

#### Литература

1. Довжикова И.В. Гистохимическая характеристика активности НАДФН-диафоразы (маркера NO-синтазы), аденилат- и гуанилатциклаз в плаценте при беременности, осложненной герпетической инфекцией / И.В. Довжикова // Бюл. физиол. и патол. дыхания. - 2004. - Вып.15. - С.14-19.
2. Довжикова И.В. Холестериновый обмен в плаценте у беременных с герпес-вирусной инфекцией / И.В. Довжикова // Фундаментальные аспекты оценки фетоплацентарной недостаточности при вирусных заболеваниях во время беременности: сб. науч. тр. - Благовещенск: изд-во АМГУ, 2008. - С.24-44.
3. Лойда З. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы / З. Лойда, Р. Госсрау, Т. Шиблер. - М.: Мир, 1982. - 259 с.
4. Николаев А.Я. Биологическая химия / А.Я. Николаев. -М.: Медицинское информационное агентство. - 2004. - 566 с.
5. Фетоплацентарная система при герпесной инфекции / Луценко М.Т. [и др.]. - Благовещенск, 2003. - 200с.
6. Agarwal A. K. Minireview: Cellular Redox STATE Regulates Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity and Intracellular Hormone Potency / A. K. Agarwal, R. J. Auchus //Endocrinology. - 2005. - Vol.146, N6. - P.2531 – 2538.
7. Господарьов Д.В. Вількорадикальна інактивация in vitro глюкозо-6-фосфатдегидрогенази дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* / Д.В. Господарьов, М.М. Байляк, В.І. Лушак // Укр. біохім. ж-л. - 2005. - Т.77, №1. - С.58-64.

В.А. Алексеева, П.Г. Петрова, Л.В. Синдеева

**РАЗВИТИЕ ВТОРИЧНЫХ ПОЛОВЫХ ПРИЗНАКОВ  
У ДЕВОЧЕК ЯКУТОК ПУБЕРТАТНОГО ВОЗРАСТА  
(11-15 ЛЕТ) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОМАТОТИПА**

УДК 616-036.22; 616/618; 61:575

Проведен анализ развития вторичных половых признаков у 125 девочек якутской национальности пубертатного возраста. Изучены стадии развития вторичных половых признаков в зависимости от соматотипа. Выявлено раннее развитие вторичных половых признаков у девочек с микросомным и микромезосомным конституциональными типами.

**Ключевые слова:** пубертатный период, соматотип, менструальная функция.

The analysis of development of secondary sexual attributes in 125 girls of the Yakut nationality of pubertal age is lead. Stages of development of secondary attributes depending on somatype are studied. Early development of secondary sexual attributes in girls with microsomal and micromesosomal constitutional types is revealed.

**Keywords:** somatotype, secondary sexual attributes, pubertal age.

**Введение**

Обеспечение репродукции в суровых климатических условиях Крайнего Севера имеет огромное значение для сохранения и поддержания численности этносов, издавна проживающих на территории РС (Я) [1].

Известно, что репродуктивное здоровье женщины во многом определяется ее гармоничным развитием в детском и подростковом возрасте. Пубертатный период является сенситивным, наиболее ранимым и важным по последствиям для физиологии и морфологии девочки [3,6]. Поэтому изучение соматического, репродуктивного здоровья и сроков полового созревания девочек подростков является актуальной проблемой современной медицины.

**Цель** исследования - на основе изучения антропологических особенностей девочек пубертатного возраста установить конституциональные особенности становления репродуктивной функции женского организма в условиях Республики Саха (Якутия).

**Задачи исследования.** Выявить возрастные и конституциональные особенности развития вторичных половых признаков девочек - якуток пубертатного возраста Республики Саха (Якутия).

**Материалы и методы.** Всего было исследовано 125 девочек якутской национальности пубертатного возраста (от 11 до 15 лет). Конституциональную диагностику проводили методом соматотипирования Р.Н. Дорохова и В.Г. Петрухина [2], в основу которого положен анализ трехуровневого варьирования ортогональных соматических показателей и закономерностей

их временных изменений. Соматотипирование включало вычисление трех уровней варьирования телосложения: габаритного (ГУВ), компонентного (КУВ) и пропорционного (ПУВ). При этом выделены пять основных (НаС - наносомный, МиС - микросомный, МеС - мезосомный, МаС - макросомный, МеГС - мегалосомный) и два переходных (МиМеС - микромезосомный и МеМаС - мезомакросомный) соматических типа, рассматриваемых как фрагменты непрерывного ряда варьирования.

Стадии развития вторичных половых признаков у девочек определяли по методу Л.Г. Тумилович с соавт. [5] с оценкой половой формулы, включающей данные о степени развития молочных желез, степени оволосения лобка и подмышечной области, становлении менструальной функции.

Статистическая обработка полученного цифрового материала проведена на персональном компьютере (процессор Intel Core, ATI Radeon Xpress 200m) с использованием стандартных пакетов программ Microsoft Office, прикладной статистической программы «Soma», созданной на кафедре вычислительной математики Красноярского государственного университета [4]. Достоверность межгрупповых различий изучаемых признаков, имеющих нормальное распределение, оценивалась по t-критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

**Результаты и обсуждение**

Первым соматическим признаком пубертата является увеличение молочных желез (телархе). Молочная железа начинает интенсивно развиваться в возрасте 12-16 лет, когда усиливается функциональная активность коры надпочечников и половых желез. В пубертатном периоде онтогенеза преобладает доля девочек с третьей степенью развития молочных желез (Ма3) - 67 или 53,6% (таблица). Также доминирующее положение занимают

лица с единичными волосами на лобке (Р1) - 42 чел. (33,6%). Пубертатный возраст характеризуется интенсивным ростом волос на подмышечных впадинах, так, вторая стадия (Ах2) адrenaрхе наблюдается у 32 чел. (25,6%), третья (Ах3) - у 17 чел. (13,6%). Тем не менее в этом возрастном периоде преобладают лица с отсутствием волос на подмышечных впадинах (Ах0) - 49 чел. (39,2%) и встречаются лица с первой степенью адrenaрхе - 27 чел. (21,6%).

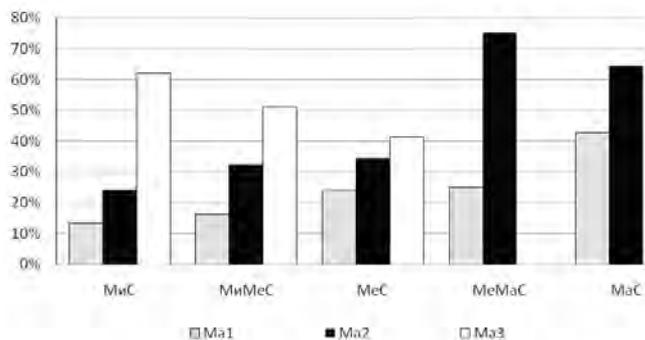
В пубертатном периоде развития наблюдается становление менструальной функции. Анализ результатов исследования выявил, что у большинства исследованных наблюдается установившаяся менструальная функция (Ме3- 47,2%). Первая менструация

**Степень развития вторичных половых признаков у девочек якутской национальности в пубертатном периоде онтогенеза**

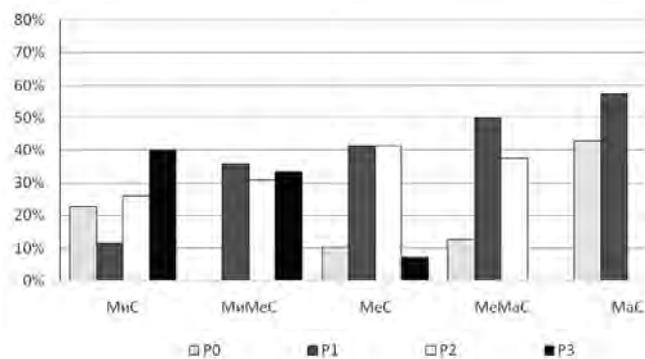
Признак	Степень	Абс. кол-во	% соотнош	Достоверность
Молочные железы	Ma0	-	0	
	Ma1	14	11,2	$P_1 < 0,001$
	Ma2	44	35,2	$P_2 < 0,01$
	Ma3	67	53,6	$P_3 < 0,01$
Лобковое оволосение	P0	18	14,4	$P_4 < 0,001$
	P1	42	33,6	
	P2	36	28,8	$P_5 < 0,01$
	P3	29	23,2	
Подмышечное оволосение	Ax0	49	39,2	$P_6 < 0,01$
	Ax1	27	21,6	
	Ax2	32	25,6	$P_7 < 0,05$
	Ax3	17	13,6	$P_8 < 0,05$
Менструальная функция	Me0	37	29,6	$P_9 < 0,001$
	Me1	13	10,4	$P_{10} < 0,001$
	Me2	16	12,8	$P_{11} < 0,001$
	Me3	59	47,2	

Примечания.  $P_1$  - достоверность различий между Ma1 и Ma2;  $P_2$  - между Ma1 и Ma3;  $P_3$  - между Ma2 и Ma3;  $P_4$  - между P0 и P1;  $P_5$  - между P0 и P2;  $P_6$  - между Ax0 и Ax1;  $P_7$  - между Ax0 и Ax2;  $P_8$  - между Ax2 и Ax3;  $P_9$  между - Me0 и Me1;  $P_{10}$  - между Me1 и Me3;  $P_{11}$  - между Me2 и Me3.

**АЛЕКСЕЕВА** Вилюя Александровна - ст. препод. МИ ЯГУ, viljen@mail.ru; **ПЕТРОВА** Пальмира Георгиевна - д.м.н., проф., ректор МИ ЯГУ; **СИНДЕЕВА** Людмила Викторовна - к.м.н., доцент Красноярской государственной медицинской академии, lsind@mail.ru.



**Рис.1.** Распределение девочек по степени развития молочной железы в зависимости от соматотипа в пубертатном возрасте



**Рис.2.** Распределение девочек пубертатного возраста по степени оволосения лобка в зависимости от соматотипа

(менархе) выявлено в 10,4% случаев исследования.

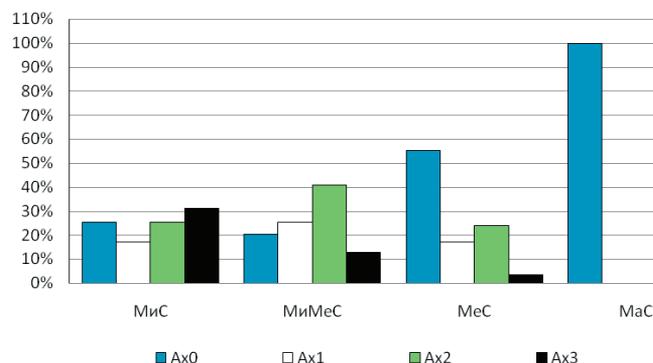
Анализ распределения девочек пубертатного возраста по степени развития молочной железы в зависимости от соматотипа выявил следующие особенности: в этом возрастном периоде девочки с МиС, МиМеС и МеС вариантом развития занимают лидирующее положение, у них наблюдается развитие молочных желез до Ма3 степени в 62,2; 51,3 и 41,4% случаев соответственно (рис.1).

Анализ распределения девочек пубертатного возраста по степени оволосения лобка в зависимости от соматотипа показал, что чем больше размеры сомы девочек, тем меньше степень оволосения на лобке (рис.2). Развитие волос на лобке до P3 степени выявлено у девочек с МиС (40,0%), МиМеС (33,3%) и МеС (6,9%) вариантами развития, причем самые высокие показатели зарегистрированы у девочек с МиС вариантом развития. У девочек с МеМаС и МаС соматотипом преобладают лица с развитием пубархе первой стадии (50,0 и 57,2% соответственно). У девочек с МаС типом развития пубархе до Ма2 не выявлено.

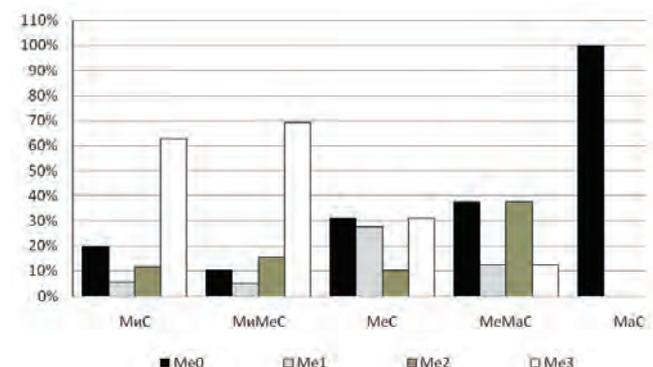
Степень развития подмышечного оволосения девочек пубертатного возраста в зависимости от соматотипа представлена на рис. 3. У девочек

этого возрастного периода также прослеживается зависимость степени развития адренархе с габаритными размерами тела. Так, у девочек с МиС типом доминируют лица с 3 стадией адренархе (Ах3 – 31,4%), лица с Ах2 и Ах0 встречаются одинаково (по 25,7% соответственно) и на третьем месте лица с первой стадией развития адренархе (Ах1 – 17,2%). Девочек с МиМеС соматотипом в большинстве случаев обладают второй стадией развития адренархе (Ах2 – 41,1%), на втором месте лица с первой стадией адренархе (Ах1 – 25,6%), далее идут лица с Ах0 -20,5% и Ах3 - 12,8%. У девочек с МеС и МаС соматотипами преобладают лица с отсутствием роста волос на подмышечных впадинах (55,2 и 100,0% соответственно).

В пубертатном возрасте доминирующее положение по становлению менструальной функции занимают девочки с МиС и МиМеС типом развития (Ме3-62,9 и Ме3- 69,2% соответственно) (рис.4). А у девочек с МаС типом наблюдается 100,0%-ное отсутствие менархе. У девочек с МеС соматотипом выявлено отсутствие менархе (Ме0) - 31,05%, первая менструация (Ме1) - 27,6, неустановившаяся менструальная функция (Ме2) - 10,3, установившаяся - 31,05% случаев. Девочки



**Рис.3.** Распределение девочек пубертатного возраста по степени подмышечного оволосения в зависимости от соматотипа



**Рис.4.** Распределение девочек пубертатного возраста по степени развития менструальной функции в зависимости от соматотипа

с МеМаС типом развития одинаково часто имели Ме0 - 37,5% , Ме2 - 37,5, Ме1- 12,5 и Ме3 - 12,5%.

Таким образом, из полученных результатов можно сделать вывод, что лица с микросомным и микромезосомным конституциональными типами опережают своих сверстниц с мезосомным, мезомакросомным и макро-сомным типами по степени развития вторичных половых признаков.

## Литература

- Агаджанян Н.А. Человек в условиях Севера / Н.А. Агаджанян, П.Г. Петрова. – М.:КРУК, 1996.- С.35-50.
- Дорохов Р.Н. Методика соматотипирования детей и подростков / Р.Н. Дорохов, В.Г. Петрухин // Медико-педагогические аспекты подготовки юных спортсменов. – Смоленск, 1989. – С. 4- 14.
- Искра И.П. Особенности созревания репродуктивной системы у девушек-подростков с учетом изменчивости антропометрических параметров: дисс....канд.мед.наук / И.П. Искра. - Красноярск, 2005. - С.10-20.
- Методы оценки индивидуально-типологических особенностей физического развития человека: учебно-методическое пособие / Николаев В.Г. [и др.] -Красноярск: Изд-во КрасГМА, 2005.- С.97-102.
- Тумилович Л.Г. Оценка степени полового развития девочек / Л.Г. Тумилович, Г.П. Сальникова, Г.И. Дзюба //Акушерство и гинекология. – 1975. - №3. –С.54.
- Щедрина А.Г. Онтогенез и теория здоровья. Методологические аспекты / А.Г. Щедрина. – Новосибирск: СО РАМН, 2003. – С.30-35.

К.В. Гайдуль, И.А. Гольдина, И.В. Сафронова, Ю.Л. Якимова, В.А. Козлов  
**АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЦЕФОТАКСИМА,  
 МЕХАНИЧЕСКИ ИММОБИЛИЗОВАННОГО  
 НА ПОЛИМЕРНОМ НОСИТЕЛЕ**

УДК: 615.33

Проведено сравнительное изучение антибактериальной активности механически модифицированного комплексного соединения, представляющего собой смесь цефалоспорины 3 поколения - цефотаксима и декстрана с различной молекулярной массой. Выявлено, что нативный и механически модифицированный декстран различной молекулярной массы не обладает антибактериальной активностью. Механохимическая модификация цефотаксима с декстраном приводит к увеличению антибактериальных свойств данного антибиотика в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

**Ключевые слова:** цефотаксим, декстран, механическая модификация, антибактериальная активность.

Comparative studying of antibacterial activity of mechanically modified complex connection representing a mix of 3d generation cephalosporin -cephotaxim and dextran with various molecular mass is conducted.

It is revealed that, native and mechanically modified dextran of various molecular mass does not possess antibacterial activity. Mechanochemical cephotaxim updating with dextran leads to increase in antibacterial properties of the given antibiotic concerning *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

**Keywords:** cephotaxim, dextran, mechanical updating, antibacterial activity.

### Введение

Неуклонный рост инфекционной заболеваемости, несмотря на создание мощного арсенала антибактериальных препаратов, ставит проблему рациональной антибиотикотерапии в число наиболее актуальных в современной медицине [1]. В то же время, формирование антибиотикорезистентности у современных штаммов микроорганизмов ставит перед необходимостью поиска новых подходов к созданию эффективных антибиотиков. Механическая обработка лекарственных веществ в смеси со вспомогательными компонентами является перспективным методом модификации медицинских препаратов [2]. Измельчение лекарственного компонента с полимерным носителем до молекулярного уровня, процесс агрегации микрочастиц, формирование микрокомпозитов, состоящих из субмикронных частиц, с образованием водородных связей между молекулами, усиливающими контакт между фазами, иммобилизация на полимере может придавать частицам микрокомпозитов уникальные свойства. Образование молекулярных комплексов лекарственных веществ с полимерами может приводить к изменению растворимости, увеличению стабильности лекарственного препарата в растворе, изменению его фармакокинетики [4]. Так как цефалоспорины, имеющие  $\beta$  - лактамную структуру, представляют собой один

из наиболее обширных классов антибиотиков, который, благодаря высокой эффективности и низкой токсичности, занимает одно из ведущих мест по частоте клинического использования среди антибиотиков [1], целью настоящего исследования являлось сравнительное изучение антибактериальной активности механически модифицированного комплексного соединения, представляющего собой смесь цефалоспорины 3 поколения - цефотаксима и декстрана с молекулярной массой 10,000 кД, 40,000 кД, 70,000 кД в массовом соотношении 1:1.

### Материалы и методы исследования

Оценка чувствительности микроорганизмов к антибиотику: Для определения чувствительности к нативному и модифицированному цефотаксиму были использованы музейные штаммы микроорганизмов *Staphylococcus aureus* ATCC № 25923, *Escherichia coli* ATCC № 25922, полученные из ГИСК им. А.А. Тарасевича (Москва), а также штамм *Streptococcus pyogenes*, выделенный от больного.

Для определения чувствительности данных штаммов микроорганизмов к антибиотикам использовали диски, импрегнированные цефотаксимом (НИНЦ, Санкт – Петербург), в соответствии с «Методическими рекомендациями по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» МУК 4.2.1890 – 04, на среде АГВ (Биотехновация, Москва).

Для изучения антибактериальной активности нативного и модифицированного цефотаксима применяли метод серийных разведений («Методические рекомендации по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» МУК 4.2.1890 – 04). С этой целью в пробир-

ки, содержащие 1 мл сывороточного бульона, вносили 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 мкг образца антибиотика, затем в культуральную среду стерильной петлей вводили исследуемый микроорганизм и культивировали в термостате в течение 24 часов при 37°С. По окончании периода культивирования оценивали наличие роста микроорганизмов по стандарту мутности (ГИСК им. А. А. Тарасевича, Москва).

Модификация антибиотика проводилась методом механического измельчения в высокоинтенсивных шаровых мельницах с одновременной иммобилизацией на полимере с целью формирования механокомпозита [3]. В качестве полимерного носителя мы выбрали декстран (Sigma) с молекулярной массой 10,000 кД, 40,000 кД, 70,000 кД.

### Результаты и обсуждение

В серии предварительных экспериментов мы оценивали чувствительность указанных выше микроорганизмов к нативному цефотаксиму (табл.1).

Следовательно, изученный штамм *Staphylococcus aureus* обладает умеренной чувствительностью, *Escherichia*

**Таблица 1**

**Чувствительность микроорганизмов к различным концентрациям нативного цефотаксима**

Микроорганизмы	Концентрация цефотаксима, мкг/мл, n=3					
	2	4	8	16	32	64
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	-	-	-	-	-

Примечание. «+» - наличие роста микроорганизма в среде с антибиотиком. «-» - отсутствие роста микроорганизма в среде с антибиотиком.

ГУ НИИКИ СО РАМН, г. Новосибирск:  
**ГАЙДУЛЬ Константин Валентинович** – в.н.с., проф., gaidul@risp.ru; **ГОЛЬДИНА Ирина Александровна** - н.с., igoldina@mail.ru; **САФРОНОВА Ирина Васильевна** - к.м.н., н.с., safiv@freemail.ru; **ЯКИМОВА Юлия Леонидовна** – зав. лаб. МСЧ № 68, hedgehog@academ.org; **КОЗЛОВ Владимир Александрович** – акад. РАМН, директор ГУ НИИКИ СО РАМН.

Таблица 2

Максимальные концентрации наличия роста микроорганизмов под действием нативного и модифицированного цефотаксима ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

Микроорганизмы	Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Streptococcus pyogenes
Цефотаксим, мкг/мл	32,0 ± 0	32,0 ± 0	2,0 ± 0
Декстран 10,000 кД нативный, мкг/мл	128,0 ± 0	128,0 ± 0	128,0 ± 0
Декстран 40,000 кД нативный, мкг/мл	128,0 ± 0	128,0 ± 0	128,0 ± 0
Декстран 70,000 кД нативный, мкг/мл	128,0 ± 0	128,0 ± 0	128,0 ± 0
Декстран 10,000 кД модифицированный, мкг/мл	128,0 ± 0	128,0 ± 0	128,0 ± 0
Декстран 40,000 кД модифицированный, мкг/мл	128,0 ± 0	128,0 ± 0	128,0 ± 0
Декстран 70,000 кД модифицированный, мкг/мл	128,0 ± 0	128,0 ± 0	128,0 ± 0
Цефотаксим, иммобилизованный на декстране 10,000 кД, мкг/мл	16,0 ± 0*	8,0 ± 0**	4,0 ± 0*
Цефотаксим, иммобилизованный на декстране 40,000 кД, мкг/мл	8,0 ± 0**	8,0 ± 0**	2,0 ± 0
Цефотаксим, иммобилизованный на декстране 70,000 кД, мкг/мл	4,0 ± 0**	8,0 ± 0**	2,0 ± 0

Примечание. Достоверность различий с контрольной группой (U – критерий Манна – Уитни): \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ .

coli и Streptococcus pyogenes – высокой чувствительностью к нативному цефотаксиму, что свидетельствует о целесообразности выбора данных микроорганизмов для проведения исследования.

Результаты экспериментов по изучению антибактериальной активности цефотаксима, иммобилизованного на декстране с различной молекулярной массой, по сравнению с нативным, представлены в табл.2.

Было обнаружено, что цефотаксим,

иммобилизованный в результате механического измельчения на декстране 10,000 кД, увеличивает свою антибактериальную активность в отношении Staphylococcus aureus и Escherichia coli, но снижает её в отношении Streptococcus pyogenes, по сравнению с нативным.

Цефотаксим, иммобилизованный на декстране 40,000 кД, не изменяет антибактериальной активности, по сравнению с нативным, в отношении Streptococcus pyogenes и значительно увели-

чивает её в отношении Staphylococcus aureus и Escherichia coli.

Цефотаксим, иммобилизованный на декстране 70,000 кД, по сравнению с нативным, значительно увеличивает свою антибактериальную активность в отношении Staphylococcus aureus, Escherichia coli и не изменяет её в отношении Streptococcus pyogenes.

Нативный и механически модифицированный декстран различной молекулярной массы не обладает антибактериальной активностью.

#### Заключение

Механохимическая модификация цефотаксима с декстраном приводит к увеличению антибактериальных свойств данного антибиотика в отношении Staphylococcus aureus и Escherichia coli и является перспективным подходом к созданию нового лекарственного препарата на основе модифицированного цефотаксима.

#### Литература

1. Антибактериальные лекарственные средства. М., 2004.
2. Болдырев В.В. // Успехи химии. – 2006. – Т.75. – . 203 – 216.
3. Душкин А.В. // Химия в интересах устойчивого развития. – 2004. – Т.12. – №3. – С.251 – 274.
4. Ломовский О.И. Обработка дисперсных материалов и сред / О.И. Ломовский // Межд. период. сб. научн. трудов. Одесса. – 2001. – Вып. 11. – С. 81 – 100.
5. Манько В.М., Петров Р.В., Хаитов Р.М. // Иммунология. 2002. №3. с. 132-138.

### И.В. Сафронова, И.А. Гольдина, К.В. Гайдуль, В.А. Козлов ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛИЛ-ТИОАЛКАНКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

УДК 615.03

Изучено влияние соединения BM-7-02 (производного индолил-тиоалканкарбонической кислоты) на жизнеспособность и пролиферативную активность мононуклеарных клеток периферической крови доноров. Выявлено, что данное соединение проявляет антипролиферативные свойства в отношении мононуклеарных клеток периферической крови человека, стимулированных как T-, так и B-клеточными митогенами. Антипролиферативный эффект соединения BM-7-02 не связан с его цитотоксическим действием.

**Ключевые слова:** индолил-тиоалканкарбоническая кислота, мононуклеарные клетки периферической крови человека, спонтанная пролиферация, митоген-индуцированная пролиферация.

Influence of linkage BM-7-02 (derivative of indole-thioalkanecarbon acid) on viability and proliferative activity of mononuclear cells of peripheral blood of donors is studied. It is revealed, that the given linkage shows antiproliferative properties concerning mononuclear cells of person peripheral blood, stimulated as T-, and B-cellular mitogens. Antiproliferative effect of linkage BM-7-02 is not connected with its cytotoxic action.

**Keywords:** indole-thioalkanecarbon acid, mononuclear cells of person peripheral blood, spontaneous proliferation, mitogen-induced proliferation.

#### Введение

В настоящее время одним из приоритетных направлений современной

иммунофармакологии является создание новых иммуностропных препаратов с целью разработки методов направленной иммунокоррекции [5]. В этом отношении большой интерес представляет оригинальное соединение (трис - (2-гидроксиэтил) аммониевая соль 1-бензилиндолил-3-тиоуксусной кислоты), производное индолил-тиоалканкарбонической кислоты, синтезированное в ГУ НИИ органической химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск,

условно названное BM-7-02. Данное соединение обладает способностью подавлять миелопозез, реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей, IgM - антителообразование in vivo, проявляет антипролиферативный эффект в отношении клеток селезенки интактных мышей [1,2]. При этом BM-7-02 обладает менее выраженной токсичностью по сравнению с цитостатиками, в частности циклофосфаном, что позволяет его рассматривать как

ГУ НИИКИ СО РАН, г. Новосибирск: **САФРОНОВА Ирина Васильевна** - к.м.н., н.с., E-mail.: safiv@freemail.ru; **ГОЛЬДИНА Ирина Александровна** - н.с., E-mail.: igoldina@mail.ru; **ГАЙДУЛЬ Константин Валентинович** – проф., в.н.с., E-mail.: gaidul@risp.ru; **КОЗЛОВ Владимир Александрович** – акад. РАН, директор.

потенциальный препарат иммуно-депрессивного действия [1].

**Целью** настоящего исследования явилось изучение характера влияния соединения VM-7-02 на спонтанную и индуцированную пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови человека.

#### Материалы и методы исследования

Исследования проведены в соответствии с методическими рекомендациями по изучению иммуотропной активности фармакологических препаратов, утверждёнными и одобренными Фармакологическим комитетом при Минздраве РФ от 10.12.98 г. [6].

**Выделение мононуклеарных клеток.** Использована периферическая венозная кровь здоровых лиц из числа штатных доноров Новосибирского Центра крови. МНК ПК выделяли при помощи центрифугирования гепаринизированной венозной крови на градиенте плотности фиколла 1,078г/см<sup>3</sup> (Lymphocyte separation medium, MP Biomedicals, LLC, Eschwege, Germany) при 1500 оборотов/мин в течение 40 мин [3]. Клетки, собранные из интерфазы, трехкратно отмывали средой RPMI-1640 (ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирская область, п. Кольцово) и осаждали центрифугированием. Осадок МНК ресуспендировали в полной культуральной среде RPMI-1640 (ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирская область, п. Кольцово), содержащей 10% сыворотки крови человека АВ (IV) (Новосибирский центр крови), 10 мМ Нерес (ICN Biomedicals Inc, Aurora, Ohio), 4x10<sup>-5</sup> М 2-меркаптоэтанол (L.Oba Feinchemie, Fischamene), 2 Мм L-глутамин (ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор»), 40 мкг/мл гентамицин (ФГУП НПО «Вирион») и подсчитывали их общее количество.

#### Оценка жизнеспособности мононуклеарных клеток крови человека

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МНК ПК) здоровых доноров культивировали в концентрации 2 x 10<sup>6</sup>/мл, по 100x10<sup>3</sup> клеток на лунку, в полной культуральной среде RPMI-1640 в течение 72 ч. По окончании периода инкубации клетки окрашивали 0,5% раствором трипанового синего (LACHEMA), подсчитывали количество неокрашенных и окрашенных МНК по формуле:

$$\chi = \frac{A \times 100}{A+B}$$

где А-окрашенные, В-неокрашенные

Таблица 1

#### Влияние соединения VM-7-02 на спонтанную и индуцированную пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови доноров (имп/мин), (M+m, n=6)

Показатель	Контроль	Концентрация VM-7-02, мкг/мл					
		0,01	0,1	1	30	100	300
Спонтанная пролиферация	373+ 76,6	362,3+ 90,7	297+ 79,3	331+ 52,5	345,7+ 51,2	318,3+ 49,5	196+ 31,8
Con A – стимулированная пролиферация	44060+ 2485	46943+ 1967	53908+ 6129	48089+ 3136	54854+ 4392	46685+ 1796	994+ 562*
РНА – стимулированная пролиферация	49766+ 7324	45536 + 12751	49644 + 15663	43072+ 16944	44509 + 14029	21365+ 12494	312+ 129*
PWM – стимулированная пролиферация	21375+ 2910	24707 + 5318	20595 + 3810	20091+ 5609	22610 + 4042	19326+ 3671	667+ 327*

\* p<0,05 по сравнению с показателем в контроле.

клетки, рассчитывали процентное содержание нежизнеспособных клеток и определяли жизнеспособность (100% - % нежизнеспособных клеток).

#### Определение пролиферативной активности клеток

Пролиферативную активность МНК ПК человека определяли стандартным методом, по включению радиоактивной метки [4]. Полученную клеточную суспензию МНК культивировали в концентрации 2x10<sup>6</sup> клеток/мл, как описано выше. Для стимуляции МНК использовали Т-клеточные митогены - конканавалин А (Con A, Sigma) и фитогемагглютинин (РНА, Sigma), а также В-клеточный - митоген лаконоса (PWM, Sigma). Оптимальные дозы Con A, РНА и PWM, определённые в серии предварительных экспериментов, составили 2; 5 и 10 мкг/мл соответственно. Раствор VM-7-02 вносили в культуру клеток в концентрациях 0,01; 0,1; 1; 3; 30; 100 и 300 мкг/мл одновременно с митогенами. За 18 ч до окончания периода культивирования во все лунки добавляли по 1 мкКи 3Н-тимидина. Результаты оценивали в имп./мин на 100x10<sup>3</sup> клеток. В качестве контроля использовали клеточную культуру, инкубированную без соединения VM-7-02.

**Математическая обработка результатов** проводилась методами непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «Statistica 5.0».

#### Результаты и обсуждение

При исследовании влияния соединения VM-7-02 на спонтанную пролиферацию МНК ПК доноров выявлено, что изучаемое соединение во всех исследованных концентрациях не оказывает влияния на спонтанную пролиферацию МНК ПК (табл.1).

При оценке влияния изучаемого соединения на митоген-индуцированную

Таблица 2

#### Влияние соединения VM-7-02 на жизнеспособность мононуклеарных клеток крови (%), (M+m, n=6)

Контроль (спонтанная жизнеспособность)	Концентрация VM-7-02, мкг/мл		
	30	100	300
94,8+1,7	96,5+0,8	98,4+0,2	98,0+0,3

\* p<0,05 по сравнению с показателем в контроле.

пролиферацию МНК ПК доноров было получено, что соединение VM-7-02 в концентрациях 0,01; 0,1; 1; 30 и 100 мкг/мл достоверно не изменяет Con A-стимулированную, РНА-стимулированную, PWM-стимулированную пролиферацию МНК ПК здоровых лиц. Данное соединение в исследуемой концентрации 300 мкг/мл достоверно подавляет Con A-стимулированную, РНА-стимулированную, PWM-стимулированную пролиферацию МНК ПК доноров.

Таким образом, соединение VM-7-02, в максимальной изучаемой дозе, обладает антипролиферативными свойствами в отношении мононуклеарных клеток периферической крови человека, стимулированных как Т-, так и В- клеточными митогенами.

Результаты исследования жизнеспособности МНК ПК при совместном 72- часовом культивировании с VM-7-02 в концентрациях 30, 100 и 300 мкг/мл представлены в табл.2. При совместном 72- часовом культивировании МНК ПК человека с VM-7-02 во всех изученных концентрациях не происходит снижения жизнеспособности клеток. Следовательно, подавление пролиферативной активности клеток крови не связано с цитотоксическим действием исследуемого соединения.

#### Выводы

1. Исследуемое соединение VM-7-

02 во всех изученных концентрациях не влияет на спонтанную пролиферацию МНК ПК доноров.

2. Соединение VM-7-02 в максимальной исследуемой концентрации 300 мкг/мл подавляет Con A-стимулированную, РНА-стимулированную и РWM-стимулированную пролиферацию МНК ПК доноров.

3. Антипролиферативный эффект

соединения VM-7-02 не связан с его цитотоксическим действием.

### Литература

1. Влияние производного индолилтиоалканкарбоновой кислоты (соединение ВЛ-11-02) на пролиферативную активность иммунокомпетентных клеток у интактных мышей / В.Л. Лимонов [и др.] // Бюллетень СО РАМН 2005. - № 1. - с. 70 - 73.

2. Изучение иммунотропной активности у новых производных арилгетероалканкарбоновых кислот / О.П. Колесникова [и др.] // Эксперимен-

тальная и клиническая фармакология. - 2006. - Т.69. - № 3. - с. 47 - 49.

3. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. - М.: Медицина, 1987. - 472 с.

4. Клаус Дж. Лимфоциты. Методы / Дж. Клаус. - М., 1990. - 395 с.

5. Манько В.М. Иммуномодуляция: история, тенденции развития, современное состояние и перспективы / В.М. Манько, Р.В. Петров, Р.М. Хаитов // Иммунология. 2002. - № 3. - с. 132 - 138.

6. Методические указания по изучению иммунотропной активности фармакологических веществ / Р.М. Хаитов [и др.] // Ведомости фармакологического комитета. - 1999. - № 1. - с. 259.

А.М. Постникова, О.П. Баланова, Н.В. Аввакумова, К.М. Николаева, Н.Н. Васильев, С.В. Гаврильева, А.В. Константинов, Л.Г. Чибыева

## УРОВЕНЬ ИНТРАГАСТРАЛЬНОЙ КИСЛОТНОСТИ У БОЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЕМ ПИЩЕВОДА И ЖЕЛУДКА В РАЗЛИЧНЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ СЕВЕРА

УДК 616-036.22; 616/618; 61:575

Выявлено, что внутрижелудочная кислотность значительно выше у больных язвенной болезнью европейской этнической группы по сравнению с группой больных азиатской принадлежности, независимо от локализации. У больных ЯБ азиатской группы в отличие от европейской схемой первого выбора должна быть четырехкомпонентная эрадикационная терапия.

**Ключевые слова:** гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, функциональная диспепсия, язвенная болезнь желудка.

It is revealed, that intragastral acidity level is prominently higher in patients with peptic ulcer of European ethnic group in comparison with group of Asian ethnicity, independently from localiation. In patients with peptic ulcer of Asian group, unlike European, scheme of first choice treatment must be 4-component eradication therapy.

**Keywords:** gastroesophageal reflux disease, functional dyspepsia, stomach ulcer.

В последние годы в клиническую практику широко внедряется новый метод изучения кислотообразующей функции желудка (компьютерная внутрижелудочная рН-метрия). Метод основан на определении концентрации свободных ионов водорода на уровне тела желудка (кислотообразующей зоны) и антрального отдела кислото-нейтрализующей зоны в межпищеварительный период (базальная секреция) и после воздействия стимулятора или ингибитора кислотообразования [4,5].

В настоящее время предпочтение отдается методу непрерывного мониторинга интрагастральной кислотности в течение суток. Известно, что интрагастральная кислотность является конечным интегральным результатом взаимодействия множества

факторов: кислого и щелочного компонентов желудочного сока, дуоденогастрального рефлюкса, приема пищи и жидкости, скорости опорожнения желудка и т.д. [3-5].

Основное преимущество внутрижелудочной рН-метрии – возможность точного исследования секреторной функции желудка в условиях, приближающих к физиологическим, а также индивидуальная оценка эффективности лекарственных препаратов в режиме реального времени [1].

**Цель исследования.** Оценить точный уровень интрагастральной кислотности у больных заболеваниями пищевода и желудка, а также медикаментозной коррекции выявленных нарушений.

### Материал и методы

В исследование были включены 371 больной: ГЭРБ-108, ХГ с функциональной диспепсией – 105, ЯБЖ и ЯБДПК – 158 чел., которые находились на стационарном обследовании и лечении в гастроэнтерологическом отделении Якутской городской клинической больницы за период 2002-2008 гг. В основную группу (1-я группа) включили 183 больных азиатской этнической принадлежности и 188 больных европейской принадлежности (2-я группа). Возраст обследованных – от 18 до 68 лет. Внутрижелудочная рН-метрия проводилась в течение 24 ч для регис-

трации кислотности в желудке и для оценки кислотодепрессивного эффекта различных групп антисекреторных препаратов [1,2,5]. Метод основан на измерении концентрации водородных ионов по величине электродвижущей силы регистрируемой специальными электродами, помещенными в раствор.

Исследование проводилось с помощью автономного ацидогастрометра «Гастроскан-24» (Исток-Система, Россия), который осуществляет запись рН автоматически в течение 24 ч. Частота регистрации рН в данном приборе составляет 1 раз в 20 с, что вполне достаточно для оценки эффективности антисекреторных препаратов [1,6,7]. При суточном мониторинге рН пищевода исследовали следующие показатели: общее время рН<4, время рН<4 в вертикальном положении больного, время рН<4 в горизонтальном положении больного, общее число рефлюксов, продолжительностью более 5 мин, длительность наиболее продолжительного рефлюкса (мин), «составной» показатель (DeMeester score). Патологическими рефлюксными мы считали: заклинение пищевода, продолжающееся дольше 5 мин, снижение рН менее 4 ед. в течение времени, превышающем 4,2% всего времени записи, изменение составного показателя DeMeester. Также о патологическом гастроэзофагеальном рефлюксе

МУ Якутская городская клиническая больница: **ПОСТНИКОВА Анна Михайловна** - врач-гастроэнтеролог, аспирант МИ ЯГУ, email: posanna@mail.ru, **БАЛАНОВА Оксана Петровна** - врач-гастроэнтеролог, аспирант, **АВВАКУМОВА Надежда Владимировна** - врач-терапевт, аспирант, **НИКОЛАЕВА Капиталина Михайловна** - зав. отделением, аспирант, **ВАСИЛЬЕВ Николай Николаевич** - к.м.н., гл. врач, **ГАВРИЛЬЕВА Саргылана Васильевна** - зав. эндоскоп. отделением, **КОНСТАНТИНОВ Алексей Васильевич** - врач-эндоскопист, **ЧИБЫЕВА Людмила Григорьевна** - д.м.н., проф., зав. кафедрой МИ ЯГУ.

(ГЭР) можно говорить и тогда, когда общее число эпизодов рефлюкса превышает 50 или регистрируемая при этом общая продолжительность снижения внутрипищеводного рН менее 4 за сутки превышает 1 ч.

### Результаты и обсуждение

Суточное мониторирование рН пищевода проводилось в течение 24 ч для выявления и оценки характера, продолжительности и частоты гастроэзофагеальных рефлюксов, определения уровня и суточного биоритма внутрижелудочного кислотообразования [1,5,8].

Несомненно, преимуществом метода является объективная оценка кислотопродуцирующей функции желудка в условиях, максимально приближенных к физиологическим [3,4,9]. Суточная рН-метрия проведена всем больным. Результаты выявления патологического гастроэзофагеального рефлюкса методом суточного (24- часового) мониторирования рН в нижней трети пищевода представлены в табл. 1. Выявлен патологический гастроэзофагеальный рефлюкс у трети обследованных больных 1-й группы и практически у половины 2-й группы, то есть количество и продолжительность патологических гастроэзофагеальных рефлюксов у больных ГЭРБ в различных этнических группах имеют значительное различие – патологический ГЭР выявлен у европейцев в 1,5 раза чаще и более выражен, чем у азиатов. Ниже представлены показатели патологических гастроэзофагеальных рефлюксов в обеих этнических группах в сравнении с нормальными показателями (табл. 2).

При проведении суточной рН-метрии выявлено, что основные параметры (общее время с рН<4 и итоговый показатель) были достоверно повышены у больных ГЭРБ в обеих группах и значительно отличалась от соответствующих показателей в норме.

Уровень интрагастральной кислотности был изучен у 66 больных язвенной болезнью желудка и 93 больных с локализацией язв в луковице двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с НР.

У 1-й группы интрапищеводная кислотность несколько ниже, чем у 2-й группы, т.к. у азиатской группы чаще встречается рефлюкс эзофагит, чем в европейской группе, но в целом существенной разницы нет, максимальное повышение кислотности отмечается в ночное время с 00.00-04.00. Днем наблюдается максимальное

**Таблица 1**  
Выявление патологических гастроэзофагеальных рефлюксов у больных при проведении суточного мониторирования рН пищевода

Показатели патологического ГЭР	1-я группа, n=63		2-я группа, n=45		Всего проведено рН-метрия, n=108	
	n	%	n	%	n	%
Общее время рН<4,0;%	24	38,1	24	53,3	48	44,4
То же, вертикально; %	15	23,8	23	51,1	38	35,2
То же, горизонтально; %	18	28,6	20	44,4	38	35,2
Общее число рефлюксов	18	28,6	23	51,1	41	37,9
Число рефлюксов более 5 мин	24	38,1	20	44,4	44	40,7
Наиболее продолжительный рефлюкс, мин	20	31,7	19	42,2	39	36,1
Индекс симптома	17	26,9	21	46,7	38	35,1

**Таблица 2**  
Показатели патологических гастроэзофагеальных рефлюксов в обеих этнических группах в сравнении с нормальными показателями

Показатели	1-я группа n=63	p	2-я группа n=45	p	В норме
Общее время рН<4,0;%	3,1±5,4	<0,05	5,3±7,7	<0,05	1,5±1,4
То же, вертикально; %	4,1±8,2	>0,05	6,1±8,1	<0,05	2,2±2,3
То же, горизонтально; %	1,9±5,0	<0,05	3,2±7,5	<0,05	0,6±1,0
Общее число рефлюксов	19,6±25,7	>0,05	37,8±34,1	<0,01	19±12,8
Число рефлюксов более 5 мин	1,3±2,3	>0,05	2,3±3,6	<0,01	0,8±1,2
Наиболее продолжительный рефлюкс, мин	16,7±51,1	>0,05	22,6±49,1	<0,05	6,7±7,9
Индекс симптома	10,8±18,9	<0,05	17,7±24,0	<0,05	6,0±4,4

снижение кислотности. В пищеварительный период кислотность в обеих этнических группах умеренно повышается, что объясняется естественными рефлюксами во время приема пищи. В течение суток интрапищеводная рН существенно не отличается в обеих этнических группах, держится в среднем на уровне рН=6,0.

Внутрижелудочный уровень рН желудка приведен в табл. 3.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что внутрижелудочная кислотность была значительно выше у больных язвенной болезнью европейской этнической группы с локализацией язв в антральном отделе, по сравнению с группой больных азиатской принадлежности, независимо от локализации.

Максимальная внутрижелудочная кислотность отмечена в первую половину ночи, т.е. в период с 20.00-00.00, как у больных с локализацией язв в желудке, так и в луковице двенадцатиперстной кишки, у обеих этнических групп.

Таким образом, проведенные исследования уровня интрагастральной кислотности у больных язвенной болезнью с локализацией язв в желудке и луковице двенадцатиперстной кишки выявили различные колебания уровня интрагастральной кислотности в течение суток, с увеличением ее в ночные периоды суток в обеих этнических группах (с 20.00-00.00 и 00.00-04.00).

Известно, что включение в эрадикационные схемы ингибиторов протонной помпы приводит к существенной депрессии кислотной продукции, что имеет ряд положительных эффектов: быстро купируются кислотозависимые клинические симптомы, рубцуются язвенные дефекты ИПП, повышая интрагастральный уровень рН, снижают активность протеолитических ферментов, удлиняют период полужизни антител к рН, повышают функциональную активность нейтрофилов, угнетают активность уреазы и АТФ-азы НР, что в конечном итоге создает неблагоприятные условия для жизнедеятельности НР [5,6].

Как следует из представленных в табл. 4 данных, динамика клинических симптомов и частота рубцевания язв существенно не различались при ис-

**Таблица 3**  
Внутрижелудочный уровень рН у больных с локализацией язв в желудке в различных этнических группах

Периоды суток	Внутрижелудочный уровень рН		P
	I группа	II группа	
Сутки	3,1±2,0	1,2±1,0	>0,05
День	4,0±2,5	1,9±1,1	>0,05
Пищеварительный период	6,0±3,0	4,0±3,0	<0,05
Межпищеварительный период	3,0±2,0	2,5±1,0	<0,05
Ночь	2,0±1,2	1,1±0,5	>0,05
20.00-00.00	2,5±2,0	1,6±1,0	>0,05
00.00-04.00	1,3±0,9	0,9±0,3	<0,05
04.00-08.00	1,6±1,2	1,0±0,5	<0,05

Таблица 4

Влияние 7-дневной эрадикационной терапии на клинические симптомы заболевания и частоту рубцевания язв в зависимости от использованного ИПП

Симптомы	Количество больных с наличием симптома в группе получавших								P	P <sub>1</sub>
	Омес n-28				Лосек n-26					
	До лечения		После лечения		До лечения		После лечения			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
Болевой синдром	28	100	1	3,7	26	100	1	3,8	>0,05	>0,05
Диспепсические расстройства	22	78,6	1	3,7	20	76,9	2	7,7	>0,05	>0,05
Наличие пальпаторной болезненности	27	96,4	8	28,6	23	88,4	8	30,7	>0,05	>0,05
Язва гастродуоденальной зоны	28	100	1	3,6	26	100	1	3,8	>0,05	>0,05

Примечание. Достоверность различий результатов в группах, принимавших омез и лосек: P – до лечения; P<sub>1</sub> – после лечения.

пользовании оригинального препарата лосека и генерического омепразола (омеза).

Так, при проведении трехкомпонентной терапии, частота эрадикации НР у европейцев оказалась значительно выше, чем у азиатской группы больных.

Эффективность четырехкомпонентной терапии у изучаемых этнических групп существенно не различалась.

Полученные результаты исследования свидетельствуют о преимуществе четырехкомпонентной терапии в лечении НР-инфекции у больных, проживающих в условиях Севера. К тому же стоимость препаратов, входящих в четырехкомпонентные схемы существенно ниже, чем у входящих в трехкомпонентную схему.

Также нами оценивалась взаимосвязь кислотообразующей функции желудка и интенсивности болевого синдрома у больных различными

формами функциональной диспепсии. Наличие болевого синдрома при ФД достоверно коррелирует с повышенным кислотообразованием в желудке ( $p < 0,05$ ), а при гипоацидных и нормацидных состояниях одинаково часто присутствует болевой синдром средней и слабой интенсивности. В терапии функциональной диспепсии с успехом используются антигеликобактерные и антисекреторные препараты и прокинетики.

#### Выводы

Суточная рН-метрия пищевода у больных ГЭРБ в условиях Севера выявила патологический гастроэзофагеальный рефлюкс у трети больных ГЭРБ азиатской группы и у половины европейской группы.

Суточная интрагастральная кислотность у азиатской группы существенно ниже, чем у европейцев (за исключением интервала 24.00-04.00).

Эффективность трехкомпонентной антигеликобактерной терапии у больных ЯБЖ азиатской группы оказалась низкой, а четырехкомпонентной – была сопоставимой с европейцами. У больных ЯБЖ азиатской этнической группы, в отличие от европейской группы, схемой первого выбора должна быть четырехкомпонентная эрадикационная терапия.

При синдроме ФД эпигастральные боли достоверно коррелируют с повышенным кислотообразованием в желудке.

#### Литература

1. Ивашкин В.Т. Болезни пищевода и желудка / В.Т. Ивашкин, А.А. Шептулин. – М., 2002.
2. Кравец В.П. Диагностические аспекты внутрижелудочной рН-метрии / В.П. Кравец, Б.Г. Бучинский // Врач. дело. – 1993. – №7. – С.108-110.
3. Линар Е.Ю. Кислотообразовательная функция желудка в норме и патологии / Е.Ю. Линар. – Рига, 1968 – 281с.
4. Охлабыстин А.В. Лабораторные и инструментальные методы исследования рН-метрии. / А.В. Охлабыстин // Гастроэнтерология национальное руководство. – М.: ГЭОТАР-Медико, 2008. – С.32-36.
5. Суточное мониторирование интрагастрального рН у здоровых и больных ЯБДПК / П.Я. Григорьев [и др.] // Развитие идей акад. Василенко В.Х. в совр. гастроэнтерологии. – М. – 1993. – Т.1. – С.109-110.
6. Суточное мониторирование интрагастральной кислотности у больных язвенной болезнью желудка / Э.П. Яковенко [и др.] // М.: РГМУ, 1998. – 179с.
7. Яковенко А.В. Суточные колебания интрагастральной кислотности у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки / А.В. Яковенко // Российский журнал гастроэнт., гепатол., колопрокт. – 1995. – №1. – С.20-24.
8. Early dinner reduces natural gastric acidity / P. Duro [et al.] // Gut. – 1989. – Vol.30. – P.1063-1067.
9. The timing of evening meal and administration effects on patterns of 24-hour intragastric acidity / W.C. Orr [et al.] // Alim. Phar. Ther. – 1988. – N2. – P.541-549.

Т.Г. Захарова, М.М. Петрова, А.В. Листратова

## БОЛЕЗНИ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ИСХОД РОДОВ

УДК 616-036.22; 616/618; 61:575

Проведено медико-социальное исследование частоты, структуры бронхолегочной патологии у беременных в г.Красноярске и влияние данной патологии на течение беременности, родов и состояние новорожденных. Полученные данные свидетельствуют, что частота бронхолегочной патологии у беременных не превышает таковую в популяции. Однако беременные с заболеваниями органов дыхания имели более высокий уровень осложнений беременности и родов, заболеваемость новорожденных также превышает таковую среди родильниц без бронхолегочной патологии.

**Ключевые слова:** беременная, бронхит, пневмония, ОРВИ, туберкулез, новорожденный, гипоксия.

Medical and social research of frequency and structure of bronchopulmonary pathology in pregnant women of Krasnoyarsk city and influence of this pathology on course of pregnancy, delivery and condition of newborn child was held. Results show, that frequency of bronchopulmonary pathology in pregnant women does not exceed the populational indicators. However, pregnant women with respiratory diseases had higher level of complications of pregnancy and delivery, morbidity of newborn children also exceeds such in comparison with pregnant women who do not have bronchopulmonary pathology.

**Keywords:** pregnant woman, bronchitis, pneumonia, acute respiratory viral infection, newborn child, hypoxia.

#### Введение

Состояние репродуктивного здоровья населения страны остается одной из наиболее важных медико-социальных проблем. Сохранение и восстановление репродуктивного здоровья

является важнейшей медицинской и государственной задачей, благополучное решение которой определяет возможность воспроизводства вида и сохранение генофонда [2].

**ЗАХАРОВА Татьяна Григорьевна** (акушер-гинеколог) – д. м.н., проф. ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф.В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ и СР РФ, e-mail: rektorkgmu@rambler.ru; **ПЕТРОВА Марина Михайловна** – д.м.н., проф., зав. каф. ГОУ ВПО КрасГМУ; **ЛИСТРАТОВА Анастасия Владимировна** – гл. терапевт Курагинского района Красноярского края, моб. 8-902-978-74-22.

В 70% случаев беременные женщины страдают хроническими болезнями, в 86% - во время беременности возникают острые заболевания. Экстрагенитальная патология не только определяет во многих случаях состояние женщины в гестационном периоде, но с нею связано в 17-20% случаев материнская смертность [1].

Ведущей патологией на территории Сибири являются болезни органов дыхания, в Красноярском крае они вышли на I место в структуре заболеваемости и занимают от 21,9% до 55,5% в зависимости от групп населения [1,2]. Бронхолегочная патология (БЛП) характеризуется интенсивными темпами прироста показателей заболеваемости, инвалидности и смертности населения.

Болезни органов дыхания не препятствуют зачатию и встречаются у беременных женщин с такой же частотой, как и у небеременных репродуктивного возраста. Многие из приобретенных заболеваний легких отягощают развитие беременности и родов, изменяют характер своего течения под влиянием беременности, могут явиться причиной заболеваемости и смертности новорожденных, а так же материнской смертности. Однако акушерские проблемы беременных имеющих бронхолегочную патологию разработаны не достаточно [3].

Целью исследования явилась оценка особенностей реализации репродуктивной функции у женщин города Красноярска, имеющих хронические или перенесших за период беременности острые заболевания органов дыхания в сравнительном аспекте с женщинами, не имеющими бронхолегочной патологии.

### Методы

Проведено ретроспективное исследование особенностей течения беременности, родов и состояния новорожденных у 384 женщин, имевших бронхолегочную патологию. Для контроля в исследование включены 384 беременные (роженицы, родильницы), не имевшие данной патологии, но рожавшие в этом же родильном доме в этот же период времени. Исследование проводилось на базе родильного дома, профилированного по заболеваниям органов дыхания у беременных г. Красноярска. В исследовании применялся клинико-статистический метод, метод логического анализа, экспертный метод. Производилась выкопировка материала из историй родов, карт беременных, из историй развития новорожденных, обменных карт и др. медицинской документации на специально разработанные анкеты.

Из общего числа родов (2047), произошедших в родильном доме за год, 384 случая (18,8%) составили женщины, имеющие хронические или перенесшие за период беременности острые заболевания органов дыхания. Репрезентативность данной выборки рассчитана по формуле Е.Н. Шигана [4], за результирующий признак взята частота хронических бронхитов у беременных по данным научной литературы.

Статистическая обработка материала проводилась с применением современных систем компьютерной обработки «Statistica». Достоверность различия результатов определяли с использованием критерия Стьюдента, а межгрупповые различия – по критерию соответствия ( $\chi^2$ ).

### Результаты исследования

Возраст беременных, имевших бронхолегочную патологию, варьировал от 15 до 45 лет. В возрасте 15-19 лет роды произошли у 48 (12,5%) беременных, в 20-24 года – у 152 (39,5%), в 25-29 лет – у 114 (29,7%), в 30-34 года – у 53 (13,8%), в 35-39 лет – у 14 (3,7%), в 40-44 года – у 2 (0,5%), в возрасте 45 лет – у 1 (0,3%).

В выборочной совокупности 4,2% беременных с БЛП имели начальное образование, тогда как беременные контрольной группы в 3,1%. Среднее образование получили в 26,6% и в 22,4% в контроле, и среднеспециальное в 33,5% и 40,4% соответственно. Высшее образование имели беременные основной группы в 36,5% и 34,1% в контрольной группе.

Анализ семейного положения показал, что 64,1% беременных с БЛП состояли в зарегистрированном браке, «гражданский брак» отмечен в 26,8% случаев, не были замужем 9,1%. В сравнении с беременными контрольной группы достоверных различий выявлено не было. Самостоятельный источник дохода имели 48,7% беременных основной группы и 46,9% - контрольной группы, находились на иждивении мужа 46,1 и 45,6% в контроле, на иждивении родителей 5,2 и 7,6% соответственно.

До беременности и на ранних сроках беременности курили равное количество женщин в обеих группах (3,7%), но во время беременности достоверно чаще курили беременные, имеющие бронхолегочную патологию, 23,8% против 14,6% ( $p < 0,05$ ). В 0,5% беременные с заболеваниями органов дыхания употребляли наркотики, в контрольной группе случаев наркоман-

нии не зарегистрировано. Однако беременные основной группы несколько реже употребляли алкоголь по сравнению с контролем (0,8% против 1,3%) и злоупотребляли алкоголем (0,3% против 0,5%).

Ведущее место в структуре экстрагенитальной патологии у беременных с БЛП принадлежит анемии - 30,7%, при этом анемия беременных II степени тяжести встречалась в 8,6%, III степени в 1,6%. Заболевания желудочно-кишечного тракта в основной группе встречались в 21,1%, заболевания почек в 13,3%, метаболический синдром в 10,2%. Достоверно чаще отмечены болезни щитовидной железы (6,6% против 4,2 в контроле), заболевания печени (5,7% против 2,9%) и пиелонефрит (12,0% против 6,5%) ( $p < 0,05$ ).

В структуре гинекологической патологии у беременных с заболеваниями органов дыхания ведущее место занимают эрозии шейки матки (29,7% против 28,4% в контрольной группе), кольпиты (10,7% против 7,6% в контрольной группе), хронические сальпингоофориты (7,8% против 5,5% в контрольной группе). У 11,2% беременных с БЛП выявлены венерические заболевания.

Огромный вред состоянию репродуктивной здоровья наносят аборт. По данным наших исследований, 36,7% беременных основной группы имели в анамнезе искусственные аборты, из них миниаборты составляли 8,1%. Прерывание беременности в поздние сроки по социальным показаниям отмечалось у 2,4%, по медицинским показаниям – 1,3%.

Каждая 10-я женщина основной группы имела в анамнезе самопроизвольный выкидыш в ранние сроки беременности (до 15 недель) и 2 женщины – в поздние сроки (до 22 недель).

В структуре осложнений, возникших во время беременности, ведущее место занимают: плацентарная недостаточность (42,5% в сравнении с 32,6% контрольной группы;  $p < 0,05$ ;  $X^2=3,0$ ), ранний гестоз (34% в сравнении с 24,5% контрольной группы;  $p < 0,05$ ;  $X^2=3,4$ ), поздний гестоз (32,6% в сравнении с 16,4% контрольной группы;  $p < 0,0025$ ;  $X^2=15,9$ ). Причем I степень тяжести позднего гестоза встречалась у 27,1 и 14,1% контрольной группы, II степень – у 4,7 и 2,1% соответственно, III степень - 0,8 и 0,3% соответственно. Дородовое излитие околоплодных вод (33,3% в сравнении с 27,6% контрольной группы;  $p < 0,1$ ;  $X^2= 1,2$ ), гипоксия плода (22,9% в сравнении с 14,58%

контрольной группы;  $p < 0,01$ ;  $X^2 = 4,8$ ), маловодие (6,3% в сравнении с 2,6% контрольной группы;  $p < 0,01$ ;  $X^2 = 5,1$ ).

Родами в срок в равном проценте случаев (96,9%) завершились беременности женщин обеих групп. Преждевременные роды были отмечены у 1,8% беременных с БЛП, в контрольной группе – 1,0%, запоздалые роды в 1,0 и 1,8% соответственно.

Продолжительность родов в группе рожениц, имевших бронхолегочную патологию, в 47,1% случаев составляла до 8 часов, в контрольной группе этот показатель был достоверно выше – 63,5% ( $p < 0,01$ ;  $X^2 = 5,7$ ), однако продолжительность родов 12 часов превалировала в основной группе (36,1% против 20,7% группы сравнения;  $p < 0,0025$ ;  $X^2 = 11,4$ ), роды более 12 часов были зарегистрированы в 3,0 и 1,9% соответственно, роды до 4 часов в 11,3% против 12,4% контрольной группы.

Осложненное течение родов чаще регистрировалось среди рожениц основной группы. Так, раннее излитие околоплодных вод у женщин с БЛП встречалось в 14,6% против 11,7% в контроле ( $p < 0,01$ ), слабость родовой деятельности в 12,5% против 9,9% в контроле ( $p < 0,01$ ), дискоординация родовой деятельности в 1,8% в против 0,5% в контроле ( $p < 0,01$ ). Приходилось прибегать к родостимуляции в 8,1% против 6,8% в контроле, гипотонические кровотечения отмечались в 0,5% против 0,3% в контроле ( $p < 0,01$ ).

Большое число осложнений беременности и родов у женщин с бронхолегочной патологией способствовало необходимости более часто прибегать к оперативному родоразрешению. Операцией кесарево сечение было родоразрешено 14,6% беременных основной группы и 10,7% контрольной

группы, в большинстве случаев показания к кесареву сечению у рожениц с заболеваниями органов дыхания возникали во время родов ( $p < 0,05$ ;  $X^2 = 4,8$ ).

Патологическая кровопотеря (свыше 500 мл) превалировала в группе рожениц с заболеваниями органов дыхания в 9,6% против 4,7% в группе сравнения ( $p < 0,05$ ;  $X^2 = 5,2$ ).

Прослеживается зависимость массы тела и роста новорожденного от наличия у матери заболеваний органов дыхания, так в основной группе маловесных детей (до 2500 г) было 3,7%, в контрольной группе – 2,3%. От 2500 до 3000 г – 19,3% в основной группе, в контроле 12,5% ( $p < 0,05$ ;  $X^2 = 3,7$ ). От 3000 до 4000 г – 68,8% в основной группе, в контроле 75,3%. Весом более 4000 г – 8,3% у женщин с БЛП, в контроле 9,9%. Новорожденных ростом 45-50 см у родильниц с бронхолегочной патологией было 16,7%, в контрольной группе – 11,2% ( $p < 0,1$ ;  $X^2 = 2,7$ ); более 50 см – 83,3% в основной группе, в контрольной группе – 87,8% ( $p < 0,1$ ).

В 10,7% новорожденные, матери которых имели бронхолегочную патологию, родились в состоянии асфиксии, с оценкой по шкале Апгар 4-6 баллов, в контрольной группе – 2,1%. Без асфиксии, с оценкой 7-10 баллов – 88,8% в основной и 97,4% - в контрольной группе.

Новорожденные у женщин основной группы в 73,7% имели заболевания при рождении, в контрольной группе – 57,8% ( $p < 0,05$ ;  $X^2 = 4,4$ ).

У новорожденных, матери которых имели БЛП, чаще встречались родовые травмы (27,3% против 20,1%;  $p < 0,05$ ;  $X^2 = 2,58$ ), церебральная ишемия (44,3% против 34,1%;  $p < 0,05$ ;  $X^2 = 5,4$ ), чаще беременность завершалась досрочно, (17,5% против 10,7%;

$p < 0,001$ ;  $X^2 = 6,63$ ), а также чаще отмечалась задержка развития плода (21,1% против 14,85%;  $p < 0,0025$ ;  $X^2 = 9,4$ ) и внутриутробное инфицирование (13,3% против 8,9% в контрольной группе;  $p < 0,005$ ;  $X^2 = 3,8$ ).

### Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что бронхолегочная патология играет существенную роль в репродуктивном здоровье женщин. Беременные с заболеваниями органов дыхания имеют более высокий уровень гинекологической и экстрагенитальной патологии, больший процент осложнений беременности (анемию, гестозы), осложнений родов, чаще нуждаются в оперативном родоразрешении, у них выше заболеваемость новорожденных.

Это позволило разработать критерии риска, перинатальных осложнений у женщин с бронхолегочной патологией, в зависимости от нозологии и периода гестации, когда возникло заболевание. Данная методика способствовала улучшению результатов диспансеризации беременных и исходов родов у женщин с заболеванием органов дыхания.

### Литература

1. Кравченко Е.Н. Роль экстрагенитальной патологии в структуре материнской смертности / Е.Н. Кравченко, С.В. Баринов // Вестник перинатологии, акушерства и гинекологии. – Красноярск, 2000. – Вып. – VII. – С.241-243.
2. Колосов В.П. // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2006. – Вып.22. – С.7-11.
3. Шехтман М.М., Бурдули Г.М. // Болезни органов дыхания и кровообращения у беременных. – М., 2002. – С.5-7.
4. Шиган Е.Н. Методика социально-гигиенических исследований / Е.Н. Шиган // Руководство по социальной гигиене и организации здравоохранения / Под ред. Ю.П. Лисицина. – М., 1987. – С.200-278.

## ПОЗДРАВЛЕНИЕ С МЕЖДУНАРОДНЫМ ДНЁМ МЕДИЦИНСКОЙ СЕСТРЫ

*Тот, в чьем сердце нет милосердия к людям,  
всегда проигрывает и не может одержать победу.  
Только доброта и милосердие –  
залог успеха в любом деле.*

*(Восточная мудрость)*

Ежегодно 12 Мая медицинские сестры всех стран отмечают Международный День медицинской сестры. Этот профессиональный праздник учрежден во имя трудового подвига всех медицинских сестер мира, которые самой природой наделены чувством милосердия, сострадания и заботы к пациентам.

Нынешний праздник знаменателен тем, что совпал со 150-летним юбилеем легендарной английской медицинской сестры милосердия Кэт Марсден, чье имя вписано золотыми буквами в историю здравоохранения нашего Северного края.

Английская сестра милосердия Кэт Марсден (Kate Marsden) по благо-

словению королевы Великобритании Виктории и Российской императрицы Марии Александровны совершила памятную поездку в далекую Сибирь, в Якутию, где посетила места проживания прокаженных. Якутский и Вилюйский епископ Мелетий и английская сестра милосердия Кэт Марсден совершили подвиг - презрев страх,

пришли к прокаженным, чтобы помочь им. Их вело великое чувство христианской любви - любви к самым сирым и бедным. Главным делом Мелетия и Кэт Марсден стало создание Вилюйского лепрозория. Навсегда в истории здравоохранения Якутии сохранится светлое имя англичанки Кэт Марсден, которая во имя жизнеутверждающей гуманной идеи милосердия совершила трудное продолжительное путешествие в далекий Северный край за многие тысячи километров...

Сегодняшнее поколение медицинских сестер продолжает славные традиции своих предшественников. Самоотверженно трудятся каждый на своем участке работы, будь то постовая или

процедурная медицинская сестра, участковая или стационарная, операционная или реанимационная, сестра-анестезистка или терапевтическая, претворяя в жизнь сегодня национальный проект в сфере здравоохранения. Это специалисты своего дела - добрые, отзывчивые, ответственные, внимательные к больным детям и взрослым, пожилым и молодым.

Мы гордимся, что подавляющее большинство медицинских сестер лечебных учреждений нашей республики получило образование в стенах Якутского базового медицинского колледжа. Выпускники нашего учебного заведения разных лет внесли и вносят свой достойный вклад в дело даль-

нейшего развития здравоохранения и сестринского дела Якутии. Они являются примером беззаветного служения своему делу, их имена с чувством глубочайшего уважения вспоминают и произносят во всех уголках нашей большой республики.

Коллектив преподавателей и студентов Якутского базового медицинского колледжа горячо и сердечно поздравляет всех медицинских сестер лечебно-профилактических учреждений Республики Саха (Якутия) с Международным Днем медицинской сестры, желает всем крепкого здоровья, семейного благополучия и больших профессиональных успехов!

*Директор Якутского базового медицинского колледжа*

*Д.А.Алексеев*

*Зам. директора по практическому обучению*

*С.Г.Васильева*

*Зам. директора по учебной работе*

*М.Н.Иванова*

## К 50- ЛЕТИЮ МУ «ГОРОДСКАЯ СТОМАТОЛОГИЧЕСКАЯ ПОЛИКЛИНИКА Г. ЯКУТСКА»

В июне 2009 г. исполняется 50 лет со дня образования МУ «Городская стоматологическая поликлиника» г. Якутска.

МУ ГСП - первая специализированная стоматологическая поликлиника Республики Саха (Якутия), образована на базе стоматологического отделения поликлиники № 1 г. Якутска в 1959г. Сегодня городская стоматологическая поликлиника – это ведущая стоматологическая клиника, которая работает в системе здравоохранения республики и использует в своей работе современный менеджмент.

Целью деятельности МУ «Городская стоматологическая поликлиника» является охрана здоровья граждан города и республики, обеспечение доступности современных медицинских технологий, повышение эффективности и качества стоматологической помощи.

Основными задачами поликлиники являются оказание амбулаторно-поликлинической стоматологической помощи, ортопедическое лечение врожденных и приобретенных аномалий челюстно-лицевой области, замещающее и косметическое протезирование.

Поликлиника оснащена современ-

ном оборудованием, большая часть из которого приобретена по Программе «Профилактика стоматологических заболеваний» МЗ РС(Я). В рентгенологическом кабинете есть возможность

практику прочно вошло применение титановых анкерных штифтов фирмы «Ikadent», стекловолоконна «Гласспан» для шинирования при пародонтитах и с целью микропротезирования.

На хирургическом приеме на протяжении последних лет главенствуют два приоритетных направления: зубосохраняющие операции и дальнейшее расширение имплантологии. В течение последних лет помимо цилиндрических имплантатов, освоены и внедрены винтовые цилиндрические и пластиночные с памятью формы, что существенно расширяет показания, поскольку они могут быть использованы при значительной атрофии альвеолярного отростка, а также мини-имплантаты для стабилизации съемных пластиночных протезов.

Врачами – пародонтологами широко используются аппаратные методы лечения при проведении профессиональной гигиены – аппараты «Пъезон мастер», «АЭР-флоу», «Вектор». С хорошими отдаленными результатами внедряются хирургические методы лечения заболеваний пародонта – лоскутные операции, гингиво-, вестибулопластика. Это позволяет продлить сроки ремиссии, а при использовании остеорепных средств добиться вос-



для получения дентальных и панорамных рентгенологических снимков.

В МУ ГСП врачами широко используются современные методы лечения неосложненных и осложненных форм кариеса с использованием новейших пломбировочных материалов (композиты на основе химического и фотополимеризационного отверждения), карпульных анестетиков, физиотерапевтические методы лечения и рентгенологические исследования. В

становления атрофированной костной ткани.

В ортопедическом отделении предложат все виды протезирования – от одиночных коронок до сложных бюгельных конструкций с замковыми креплениями. За последнее время внедрено изготовление культовых вкладок непосредственным способом с лабораторным этапом, используется новая самотвердеющая пластмасса для культовых вкладок (Pattern-resin), металлокерамическая масса нового поколения “Vintash Halo”, освоены и внедрены в работу аппарат для изготовления и ремонта съемных зубных протезов под давлением. В настоящее время проходит апробацию и внедрение новая безметалловая керамика «Керомаж». Все это способствует качественной высокоэффективной работе поликлиники. Благодаря внимательному отслеживанию новинок, врачам – стоматологам удается своевременно реагировать на перемены и внедрять все лучшее из того, что может предложить сегодняшняя стоматологическая наука.

Здесь работает высокопрофессиональный коллектив, стремящийся к применению новейших достижений стоматологии в повседневной практике.

В целом по поликлинике из 35 врачей квалификационные категории имеют 50% а из 48 средних медработников – более 80%. У нас трудятся 6 отличников здравоохранения Российской Федерации, 21 отличник здравоохранения Республики Саха (Якутия), 13 ветеранов труда.

На базе поликлиники проходят производственную практику врачи – интерны, студенты стоматологических факультетов ВУЗов страны, медицинские сестры стоматологического профиля, зубные техники. (ф.9)

Коллектив поликлиники неоднократно отмечался почетными грамотами Министерства здравоохранения РС(Я), Комитета здравоохранения г. Якутска, ТФ ОМС РС(Я). По итогам 2004г. поликлиника признана лучшим коллективом среди амбулаторно-поликлинических учреждений, работающих в системе ОМС, в 2007г. заняли 2 место среди лечебных учреждений г. Якутска. Врачи и медсестры постоянно принимают участие в республиканских и городских конкурсах «Лучший по профессии». В 2004г. лучшим стоматологом республики признан В.А. Вознюк, а в 2008г. – Л.М. Большухина. В 2003 и 2007гг. наши медсестры занимали второе место в городском конкурсе медсестер – Т.С. Заболотная (2003г.) и Н.В. Сатьянова (2007г.).

По итогам 2006 г. поликлиника получила почетную грамоту Международного благотворительного фонда «Меценаты столетия»- «За вклад в великую победу во имя мира на земле» за предоставление бесплатного протезирования для льготных категорий населения за счет собственных средств.

Руководители подразделений - заместитель главного врача по медицинской части М.Ю. Пупелене, заведующие отделениями Т.М. Козьмина, Л.М.

Большухина, У.П. Трубина, С.В. Лубнин, заведующий производством А.А. Баговиев - делают упор на повышение качества и объема оказания стоматологической помощи населению, внедрение новых технологий, укрепление трудовой дисциплины в коллективе. Под руководством молодого главного врача, отличника здравоохранения РС(Я) и РФ, главного внештатного стоматолога МЗ РС(Я) Т.С. Иванова поликлиника старается продолжать заложенные традиции и продвигаться вперед, совершенствовать деятельность всей ее системы – организована работа смотрового кабинета, открыта центральная стерилизационная, вводится пристрой к зданию поликлиники, устанавливается новое оборудование – все это качественно меняет организацию работы, делает ее более эффективной, дает старт новому этапу развития городской стоматологической поликлиники.

Мы гордимся нашими ветеранами, проработавшими в стенах родной поликлиники более 40 лет: Г.А.Скрябина, первая главная медсестра ГСП, в настоящее время на заслуженном отдыхе; врачи – В.И. Столбова, С.Н. Пахомова, С.И. Герасимова, С.И. Скрябина, медицинские сестры Т.Е. Данилова, В.Д. Кузьмина, М.М. Ляцук.

Впереди у стоматологической службы республики большие перспективы, и в этом процессе стоматологическая поликлиника г. Якутска по-прежнему занимает передовые позиции.

*Зам. гл. врача МУ «Городская стоматологическая поликлиника г. Якутска» по медицинской части  
М.Ю. Пупелене*

