

Главный редактор
ГИНТЕР Е.К.
академик РАМН

Ответственный секретарь
редакции
ИЖЕВСКАЯ В.Л.
д.м.н.

Редакционная коллегия

БАРАНОВ В.С.
чл.-корр. РАМН
ДУРНЕВ А.Д.
чл.-корр. РАМН
ИЛЛАРИОШКИН С.Н.
д.м.н., профессор
КОЗЛОВА С.И.
д.м.н., профессор
ЛИМБОРСКАЯ С.А.
д.б.н., профессор
МИХАЙЛОВА Л.К.
д.м.н., профессор
НАЗАРЕНКО Л.П.
д.м.н., профессор
НОВИКОВ П.В.
д.м.н., профессор
ПУЗЫРЕВ В.П.
академик РАМН
РУБЦОВ Н.Б.
д.б.н., профессор
ХУСНУТДИНОВА Э.К.
д.б.н., профессор

Редакционный совет

АРЧАКОВ А.И.
академик РАМН
БАРАНОВ А.А.
академик РАМН
КОПНИН Б.П.
д.б.н., профессор
ЛАЗЮК Г.И.
чл.-корр. РАМН
СВЕРДЛОВ Е.Д.
академик РАН
СЕРЕДЕНИН С.Б.
академик РАМН
СМИРНОВ В.Н.
чл.-корр. РАН, академик РАМН
ЧУЧАЛИН А.Г.
академик РАМН

Издатель:
ООО Издательство «Гениус Медиа»

Адреса редакции:

1. 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1, Федеральное государственное бюджетное учреждение Медико-генетический научный центр РАМН
Тел. (499) 612-81-07, факс: 324-07-02
2. 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8.
Тел. (495) 518-14-51, 601-23-74.
E-mail: genius-media@mail.ru

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

© Российское общество медицинских генетиков
© Российская академия медицинских наук
© Медико-генетический научный центр РАМН
© ООО Издательство «Гениус Медиа»

Тираж 200 экз.

Медицинская ГЕНЕТИКА

Ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал

2013 г. Том 12. №12 (138)

СОДЕРЖАНИЕ

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

- Капранов Н.И., Кондратьева Е.И., Ашерова И.К., Петрова Н.В., Каширская Н.Ю.*
Молекулярные основы создания новых лекарственных средств при муковисцидозе3

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Рудко А.А., Гараева А.Ф., Брагина Е.Ю., Бабушкина Н.П., Колоколова О.В., Липаенкова О.Н., Фрейдин М.Б.*
Скрининг мутаций генов атипичных семейных микобактериозов 14
- Костюк С.В., Ершова Е.С., Конорова И.Л., Вейко Н.Н.*
Хроническое действие ионизирующего излучения вызывает увеличение содержания рибосомного повтора в составе циркулирующей ДНК плазмы крови20
- Васильева Т.А., Бессонова Л.А., Шиманский В.Н., Зинченко Р.А., Козлова В.М., Любченко Л.Н., Хлебникова О.В., Скоблов М.Ю., Петрова Н.В., Гинтер Е.К.*
Клинико-молекулярно-генетическое исследование нейрофиброматоза 2 типа28
- Гончарова И.А., Горбунова Е.В., Голубенко М.В., Салахов Р.Р., Макеева О.А.*
Полиморфизм генов *VKORC1* и *CYP2C9* у больных с протезированными клапанами сердца Кузбасса42

ИНФОРМАЦИЯ

- Содержание журнала «Медицинская генетика» в 2013 г.48
- Алфавитный указатель авторов журнала «Медицинская генетика» в 2013 г.52
- VI Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров55
- Правила оформления статей в журнале «Медицинская генетика»56

Editor-in-Chief
GINTER E.K.

Secretary
IZHEVSKAYA V.L.

Editorial Board
BARANOV V.S.
DURNEV A.D.
ILLARIOSHKIN S.N.
KOZLOVA S.I.
LIMBORSKAYA S.A.
MIKHAYLOVA L.K.
NAZARENKO L.P.
NOVIKOV P.V.
PUZYREV V.P.
RUBTSOV N.B.
KHUSNUTDINOVA E.K.

Editorial Council
ARCHAKOV A.I.
BARANOV A.A.
KOPNIN B.P.
LAZYUK G.I.
SVERDLOV E.D.
SEREDENIN S.B.
SMIRNOV V.N.
CHUCHALIN A.G.

Publisher: Genius Media, LLC

Medical GENETICS

Monthly reviewed scientific and practical journal

2013. Volume 12. №12 (138)

Content

REVIEWS

*Kapranov N.I., Kondrateva E.I., Asherova I.K.,
Petrova N.V., Kashirskaya N.Y.*

The molecular fundamentals
of new remedies creation for cystic fibrosis3

ARTICLES

*Rudko A.A., Garaeva A.F., Bragina E.Iu., Babushkina N.P.,
Kolokolova O.V., Lipaenkova O.N., Freidin M.B.*

Screening for mutations
in genes causing familial atypical mycobacteriosis..... 14

Kostyuk S.V., Ershova E.S., Konorova I.L., Veiko N.N.

Chronic exposure to ionizing radiation results
in an increase of ribosomal repeat fraction
in the total plasma cell-free DNA.....20

*Vasilyeva T.A., Bessonova L.A., Shimansky V.N.,
Zinchenko R.A., Kozlova V.M., Lubchenko L.N.,
Khlebnikova O.V., Skoblov M.Y., Petrova N.V., Ginter E.K.*

Clinical and molecular genetics study
of neurofibromatosis type 228

*Goncharova I.A., Gorbunova E.V., Golubenko M.V.,
Salakhov R.R., Makeeva O.A.*

Polymorphism of *VKORC1* and *CYP2C9* genes
in patients with cardiac valve prostheses42

INFORMATION

The content of Journal «Medical Genetics» in 2013.....48

Authors index in 2013.....52

VI Congress
of the Vavilov Society of Geneticists and Breeders55

Guidelines for Authors56

Молекулярные основы создания новых лекарственных средств при муковисцидозе*

Капранов Н.И.¹, Кондратьева Е.И.¹, Ашерова И.К.², Петрова Н.В.¹, Каширская Н.Ю.¹

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1; e-mail: mgnc@med-gen.ru

² — ГУЗ ЯО Детская клиническая больница №1, Ярославль, Российская Федерация

В обзоре рассматриваются классификация мутаций в гене *CFTR* и их последствия для синтеза белка трансмембранного регулятора муковисцидоза (МВТР), его доставки к апикальной мембране и функции хлорного канала. Исходя из молекулярных нарушений обсуждаются возможные подходы к разработке новых лекарственных препаратов. Проводится анализ результатов клинических исследований различных классов модуляторов (потенциаторы и корректоры, аталурен, активаторы альтернативных хлорных каналов, регуляторы осмотического градиента).

Ключевые слова: муковисцидоз, мутации, модуляторы, потенциаторы, корректоры

Введение

Достижения в создании новых технологий терапии хронических болезней лёгких микробно-воспалительного характера, цирроза и других осложнений и проявлений муковисцидоза (МВ) позволили значительно увеличить продолжительность жизни больных МВ и перевели МВ из разряда «фатальных» в разряд хронических болезней. Медиана продолжительности жизни колеблется от 20 до 40 лет и выше в развитых странах.

Интенсивные исследования гена муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости (*CFTR*), его продукта и функции привели к созданию новых подходов к терапии МВ (в зарубежной литературе — *cystic fibrosis*). Ген *CFTR* был идентифицирован в 1989 г. в результате генетического анализа и позиционного клонирования двумя группами учёных из Канады и США под руководством Fr. Collins и L.-Ch. Tsui [47]). Расположен ген *CFTR* на длинном плече хромосомы 7 в области q31, имеет протяжённость около 250 т.п.н. и включает 27 экзонов (рис. 1).

Продукт гена *CFTR* относится к суперсемейству АТФ-связывающих кассетных протеинов (ABC — *ATP-binding cassette*), является трансмембранным белком, располагающимся на поверхности большинства эпителиальных клеток, и функционирует как цАМФ-зависимый хлорный канал.

МВТР состоит из двух мембрансвязанных доменов (MSD1 и MSD2), двух нуклеотидсвязывающих доменов (NBD1 и NBD2) и центрального внутриклеточного регуляторного домена (R-домен) и участвует в процессах регуляции других ионных каналов и мембранного транспорта [3, 40, 47].

МВТР осуществляет следующие функции:

1. Секреция жидкости железами подслизистой оболочки, располагающейся под поверхностным эпителием дыхательных путей. Баланс между двумя транспортными функциями — абсорбцией ионов хлора (Cl^-) вслед за абсорбцией натрия (Na^+) — необходим при поддержании оптимального объёма поверхностной жидкости дыхательных путей для обеспечения цилиарного клиренса от слизи и бактерий;
2. Регуляция транспорта ионов калия (K^+) и кальция (Ca^{2+}) в тканях как лёгких, так и органов желудочно-кишечного тракта;
3. Секреция иона HCO_3^- в поджелудочной железе [32];
4. Участие в процессе воспаления вследствие повышения уровня синтеза малонил-КоА, что нарушает метаболизм жирных кислот [41];
5. Выведение глутатиона (внутри- и внеклеточный антиоксидант — GSH), необходимого для защиты лёгочной ткани при воздействии высокореактивных оксигенных микроорганизмов, из клеток дыхательного эпителия [38].

К настоящему времени мутации обнаружены как в кодирующих, так и в интронных, и в регуляторных частях гена *CFTR*. В нуклеотидсвязанных доменах и регуляторном домене мутации выявляются чаще.

Классификация мутаций в гене *CFTR* в зависимости от функциональных последствий

В зависимости от механизма, нарушающего функцию белка, мутации в гене *CFTR* подразделяют на 5 классов (таблица) [14, 33, 41, 61, 65]. Некоторые ис-

* Статья написана по материалам доклада на научной конференции «Актуальные проблемы клинической генетики редких болезней», Москва, 5–6 декабря 2013 г.

следователи выделяют ещё один, шестой, класс [41, 50, 63, 65, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>].

В гене *CFTR* обнаружено около 2000 мутаций, из них около 200—300 дают патологический эффект (<http://www.genet.sickkids.on.ca>). Мутации разных классов приводят к разным изменениям белка МВТР, что приводит к различной выраженности клинических проявлений. Мутации I—III классов гораздо более серьёзно нарушают функцию белка, чем мутации IV или V классов, и ассоциированы с классическим МВ. При мутациях IV—VI классов функция хлорных каналов поджелудочной железы может быть сохранена, что приводит к поздним манифестациям клинических проявлений и диагностике заболевания [2, 33, 41, 50, 61, 63].

Класс I. Нарушение синтеза протеина. Это мутации, результатом которых является нарушение транскрипции мРНК. К этому классу относятся мутации с наиболее серьёзными фенотипическими проявлениями. В результате этих мутаций либо нарушается синтез стабильного протеина, либо происходит продукция аномального укороченного протеина вследствие образования кодона терминации трансляции. Это нонсенс-мутации, мутации сдвига рамки вследствие делеций или инсерций и мутации, приводящие к альтернативному сплайсингу мРНК [41]. Укороченные молекулы белка обычно не-

стабильны, узнаются белками-шаперонами в эндоплазматическом ретикулуме и быстро деградируют [2]. Для российской популяции характерна высокая частота так называемой славянской мутации *CFTR*dele2,3(21kb) — 1,4—6,8% [3, 4, 6], для московского региона (по данным регистра 2010 г.) — 9,02% [5], что может быть предметом поиска модификаторов для данной мутации.

Класс II. Нарушение процессинга или транспорта. Мутации II класса приводят к неправильному сворачиванию молекулы белка и нарушению её транспорта к апикальной мембране клетки. В результате происходит деградация молекул МВТР в эндоплазматическом ретикулуме: молекула белка не достигает эпителиальной мембраны. Самая распространённая мутация этого типа — мутация F508del. В российской популяции она составляет 33,8—53,5% [3, 4, 6], в московской — 52,96% [5] и встречается реже, чем в популяциях других стран, — 66% (Обследовано 89 116 хромосом больных МВ (WHO, 2004)). Разработка лекарственных препаратов для коррекции работы хлорного канала при данной мутации наиболее перспективна, учитывая её распространённость. Различные миссенс-мутации также приводят к нарушению свёртывания молекулы белка. В рекомбинантных клетках не происходит созревания молекулы МВТР до полностью гликозилированной формы или её выхода из эндоплаз-

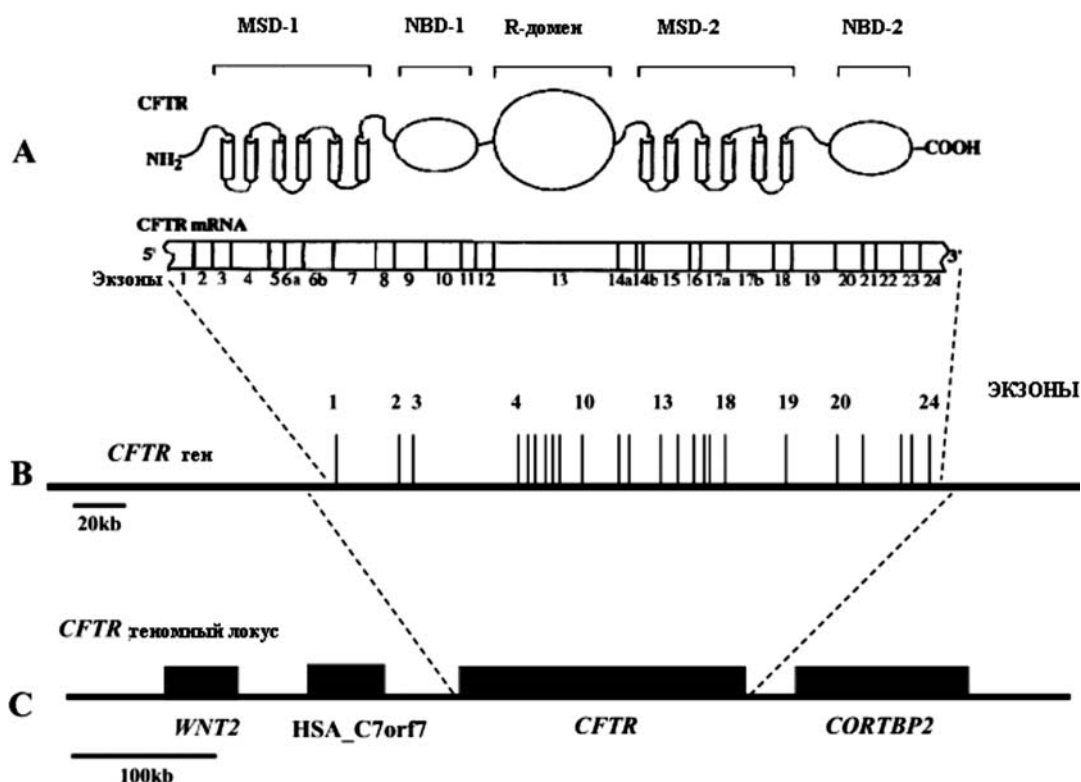


Рис. 1. Структура локуса, гена, мРНК и белка CFTR:

А — мРНК и белок CFTR; MSD1 и MSD2 — мембрансвязанные домены; NBD1 и NBD2 — нуклеотидсвязывающие домены;

В — ген *CFTR*; экзоны обозначены вертикальными линиями;

С — геномный локус; гены обозначены горизонтальными блоками [50].

матического ретикулума. Эта неправильно сформированная молекула МВТР разрушается посредством внутриклеточного «механизма контроля качества», детали которого пока только изучаются [2, 10, 23]. Показано, что у белка МВТР с мутацией F508del локализация одинаково нарушена и в эпителиальных клетках дыхательных путей, и в клетках протоков потовых желёз. Таким образом, протеин либо отсутствует, либо количество его чрезвычайно снижено в апикальной мембране. В интестинальном, респираторном и гепатобилиарном эпителии больных, гомозиготных по мутации F508del, весьма незначительная доля белка МВТР всё-таки локализована на апикальной мембране. Некоторые мутации, например P574H, приводят к менее серьёзному дефекту в сворачивании, чем мутация F508del, и в таком случае белок достигает плазматической мембраны и сохраняет некоторую функцию. На основе полученных данных перспективно воздействие в двух направлениях: на процессы со-

зревания белка в эндоплазматическом ретикулуме и на его продвижение через плазматическую мембрану.

Класс III. Нарушение регуляции хлорного канала. Мутации этого класса приводят к синтезу белка МВТР, который транспортируется к клеточной мембране, но не отвечает на стимуляцию цАМФ [41, 50]. Мутации класса III локализованы в нуклеотидсвязанных и регуляторном доменах белка МВТР. Поскольку внутриклеточный АТФ регулирует открытие хлорных каналов МВТР через прямое взаимодействие с нуклеотидсвязанными доменами, мутации в этих доменах могут изменять функцию каналов. В результате мутаций III класса, приводящих к дефектной активации белковых молекул из-за нарушений связывания АТФ или гидролиза в нуклеотидсвязывающих доменах (NBD), на клеточной мембране образуется нормальное количество нефункционального белка. К этому типу относится мутация G551D, распространённая в Северной Европе. При мутации G551D

Классы мутаций в гене *CFTR* и мишени для разработки лекарственных препаратов

Класс	Класс I	Класс II	Класс III	Класс IV	Класс V	Класс VI
Нарушение в молекуле белка CFTR*	Нарушение синтеза протеина	Нарушение процессинга или транспорта	Нарушение регуляции	Снижение проводимости	Снижение количества нормальных молекул белка или РНК	Снижение стабильности протеина
Мутации в гене CFTR	G542X W1282X R553X 621+1C>T 2143delT 1677delTA CFTRdele2,3(21kb)	F508del N1303K I507del S549I S549R	G551D G1244E S1255P	R334W R347P R117H	3849+10kbC>T A455E IVS8(5T) 1811+1,6kbA>G	S1455X
Клинические проявления	С рождения тяжёлое течение, полиорганность поражения			Поздняя манифестация, сохранена функция каналов поджелудочной железы		
Мишень для лекарственной терапии	Синтез белка.	Мутация F508del. Синтез белка. Продвижение белка по хлорному каналу.	Мутации в нуклеотид-связанных доменах. Восстановление ионной проводимости хлорного канала и увеличение времени открытия каналов и ионного потока.	Миссенс-мутации, располагающиеся в мембран-связанных и регуляторном доменах белка CFTR. Восстановление ионной проводимости хлорного канала и увеличение времени открытия каналов и ионного потока.	Увеличение количества нормального транскрипта, или повышение уровня функционального белка, или уровня транспорта молекул белка CFTR.	Восстановление синтеза С-концевых аминокислотных остатков.
Молекулы и препараты	Гентамицин PTC124 (Аталурен) — 3-я фаза.	Корректоры + потенциаторы VX-770 и VX-809 — 3-я фаза; VX-770, VX-661 — 2-я фаза.	Потенциатор VX-770, в клинической практике.	Потенциаторы хлорных и альтернативных каналов.	Исследования не опубликованы или не ведутся.	
Воздействие на общие механизмы нарушений мукоцилиарного клиренса	Активаторы альтернативных хлорных каналов — кальцийзависимый (денуфозол) и P2Y — рецептор (Ланковутид (Moli1901) — клинические испытания приостановлены. Средства, регулирующие осмотический градиент (гипертонический раствор натрия хлорида, маннитол) — используются в клинической практике (уровень доказательности В).					
Примечание. * — на основе данных литературы [14, 33, 41, 59, 61, 63, 65].						

Примечание. * — на основе данных литературы [14, 33, 41, 59, 61, 63, 65].

остаточная функция канала МВТР минимальна, тогда как при мутации S1255P она сохраняется в большей мере. Функция белка МВТР также регулируется процессами фосфорилирования регуляторного домена, но, по-видимому, мутаций, относящихся к III классу, в этом домене меньше, чем в других частях гена.

Создание препаратов для этой группы мутаций должно быть направлено на регуляцию связывания белка МВТР с АТФ и гидролиза в нуклеотидсвязывающих доменах с целью восстановления функции хлорного канала.

Класс IV. Нарушение проводимости хлорного канала. К этому классу в большей мере относятся миссенс-мутации, располагающиеся в мембрансвязанных доменах. Ген *CFTR*, содержащий эти мутации, кодирует протеин, который нормально транспортируется к клеточной мембране и правильно отвечает на стимуляцию, но генерирует пониженный хлорный поток. Мутации класса IV изменяют ионную проводимость хлорного канала и таким образом уменьшают время открытия каналов и ионный поток. Примерами мутаций этого класса служат замены аргинина на гистидин в положении 117 (R117H), на триптофан в положении 334 (R334W) и на пролин в положении 347 (R347P). Когда эти мутантные белки МВТР экспрессируются в гетерологических эпителиальных клетках, все три правильно претерпевают процессинг, встраиваются в апикальную мембрану, но генерируют сниженный ток за счёт снижения ионного потока через единственный открытый канал. Кроме того, по крайней мере, для мутации R117H время, в течение которого канал открыт, также снижено. В зависимости от комбинации всех факторов фенотипический эффект варьирует от практически полного отсутствия клинических проявлений до тяжёлой недостаточности функции поджелудочной железы. Согласно исследованиям A. Vankeerberghen с соавторами [58], ряд мутаций, локализованных в экзоне 13, кодирующем регуляторный домен, может по-разному влиять на уровень проводимости хлорида. Так, уровни активности хлорных каналов с мутациями G622D, R792G, E822K снижены по сравнению с МВТР дикого типа, тогда как у мутантов H620Q и A800G активность повышена. Различий в проводимости каналов у мутантов T665S и E826K по сравнению с белком дикого типа не выявлено. Несколько мутаций в экзоне 18, кодирующем трансмембранный хеликс 12 и соответствующую внутрицитоплазматическую петлю, также относятся к классу IV. Для протеинов с мутациями M1137V, I1139V, M1140del, D1152H, D1154G показан значительно сниженный цАМФ-активированный ток хлоридов [58]. Мишенью для препаратов при мутациях данного класса может быть активация тока ионов хлора как через хлорные, так и через альтернативные каналы.

Класс V. Снижение количества функционального белка. К классу V относятся мутации, при которых продуцируется пониженное количество нормального транскрипта или функционального белка, или понижен уровень транспорта молекул белка МВТР. Мутации этого класса

нарушают механизм сплайсинга, и транскрипты образуются в результате как aberrантного, так и нормального сплайсинга. Уровень нефункциональных и нормальных молекул МВТР варьирует у разных пациентов и в разных тканях одного и того же больного. Примерами мутаций класса V являются миссенс-мутация A455E (замена аланина на глутаминовую кислоту); мутация 3849+10kbC-T (образование скрытого сайта инициации транскрипции, в результате чего происходит синтез мРНК с дополнительным экзоном, кодирующим 38 аминокислотных остатков); политимидиновая последовательность и полиморфные TG повторы в интроне 8, IVS8Tn(TG)m (регулирующая сплайсинга экзона 9). Поскольку во всех этих случаях небольшое количество полноразмерной мРНК продолжает синтезироваться, эти мутации приводят к мягкому фенотипу. Предполагаемые мутации в промоторе гена *CFTR* могут обладать сходным эффектом, снижая уровень транскрипции [50]. Воздействие на процесс сплайсинга потенциально может использоваться для корректировки нарушений при данном виде мутации.

Класс VI. Сниженная стабильность протеина. Этот относительно новый класс мутаций был выделен и описан J. Zielenski [65]. Этот класс включает мутации, приводящие к синтезу протеина с изменённой стабильностью в результате потери С-концевых 70—98 аминокислотных остатков. Хотя С-конец не является необходимым для биогенеза и функционирования хлорного канала МВТР, авторы указывают, что он важен для поддержания стабильности полностью гликозилированной молекулы белка МВТР. Наименьшее укорачивание протеина, приводящее к МВ с панкреатической недостаточностью и хронической лёгочной инфекцией, описано при мутации Q1412X, при этом происходит потеря 70 последних аминокислотных остатков. Панкреатическая недостаточность служит маркёром тяжёлой формы МВ, к сходной тяжёлой клинической картине приводят делеции последних 81, 97 и 101 аминокислотных остатков в результате мутаций сдвига рамки считывания (4326delTC, 4279insA и 4271delC соответственно) [12]. Было показано, что уровень экспрессии и локализация мутантных протеинов с потерей С-концевых аминокислот не отличается от МВТР-протеина дикого типа. Более того, цАМФ-стимулированный ток через укороченные белки сохраняет характеристики МВТР дикого типа, что показывает отсутствие действия последних 26 аминокислотных остатков на функцию хлорного канала МВТР [30]. Анализ биосинтетического процессинга показал, что последние 82 аминокислотных остатка молекулы МВТР не имеют существенного значения для посттрансляционного сворачивания (фолдинга), но время полужизни полностью гликозилированного укороченного белка МВТР снижено в 5—6 раз. Предполагается, что именно пониженная стабильность укороченных вследствие мутаций VI класса молекул МВТР приводит к фенотипу МВ [30]. Примером мутации этого класса является мутация S1455X, описанная R. Epaud с соавторами в 2005 г., первым симптомом

МВ у больного с этой мутацией была стойкая гипонатриемия в течение жаркого лета 2003 г. во Франции.

Таким образом, мутации разных классов оказывают разные эффекты на белок МВТР. В общем, мутации I—III классов гораздо более серьёзно нарушают функцию МВТР, чем мутации IV или V классов. Следует отметить, что одна и та же мутация может приводить более чем к одному механизму нарушения функции канала МВТР: так, мутация G551D как мутация III класса нарушает активацию хлорного канала, а как мутация IV класса — свойства МВТР регулировать другие ионные каналы [33, 41, 50, 61, 63]. Всё вышесказанное определяет следующие подходы к созданию лекарственных препаратов:

1. Генная терапия: цель — восстановить функцию МВТР путём введения нормальной копии гена *CFTR* в клетки дыхательных путей реципиента посредством векторов;

2. Приоритет поиска определяется тяжёлыми мутациями, предрасполагающими к тяжёлому течению заболевания;

3. Частота мутации F508del во всех популяциях определяет стратегию разработки лекарственных средств для коррекции нарушений при данной мутации;

4. С учётом того факта, что при ряде мутаций имеет место нарушение нескольких механизмов от синтеза белка до нарушения проходимости хлорных каналов, разрабатываются как потенциаторы, так и корректоры, а также создаются комбинированные препараты с различными точками приложения их действия (сочетание потенциаторов и корректоров);

5. Терапия, направленная на другие патофизиологические механизмы заболевания при всех видах мутаций: воздействие на ионный транспорт через эпителиальный натриевый канал для коррекции жидкостных и ионных нарушений, минуя каналы МВТР; использование осмотических средств для улучшения гидратации поверхности дыхательных путей путём изменения осмотического градиента.

Таким образом, в настоящее время новые терапевтические стратегии, основанные на понимании функции хлорного канала и белка МВТР, продолжают активно развиваться и описаны ниже.

Опыт создания новых лекарственных средств для терапии муковисцидоза

Следует отметить, что базисная терапия МВ фокусируется в настоящее время на компенсации нарушений функционирования системы пищеварения и замедлении прогрессирования патологических изменений в респираторной системе вследствие снижения активности МВТР. Панкреатическая недостаточность хорошо компенсируется заместительной терапией ферментами, потреблением высококалорийной, богатой жирами диетой. Внимательное отношение к питанию больного во все периоды жизни ведёт к улучшению здоровья больных, в целом. Постоянное лечение болезни лёгких, обусловленной МВ, нацелено на улучшение клиренса бронхиального дерева,

подавление хронической бактериальной инфекции и местного хронического воспаления.

МВ стал одним из первых заболеваний, для которого начались разработки генной терапии. Вскоре после идентификации гена *CFTR* появилась надежда, что инсерция нормальной копии гена *CFTR* восстановит функцию МВТР у больных МВ [17]. Наиболее вероятной тканью-мишенью служит респираторный эпителий. Нормализация активности МВТР должна быть осуществлена до развития необратимых функциональных и структурных изменений. Однако на пути реализации этой задачи есть ряд серьёзных ограничений. Патофизиологические последствия нарушения МВТР в различных органах реализуются в разные сроки. Так, фиброз экзокринной части поджелудочной железы происходит внутриутробно и к рождению практически завершён. Поэтому восстановление функции МВТР даже в неонатальном периоде вряд ли приведёт к сохранению функции поджелудочной железы в последующем. В то же время респираторный тракт к рождению остаётся относительно сохранным и восстановление активности МВТР у младенцев могло бы иметь отчётливый эффект на развитие поражения лёгких [25].

Генная терапия

Разрабатывалось несколько систем переноса генов — эффективных векторов: рекомбинантный аденовирусный вектор, аденоассоциированные вирусные векторы (парвовирусы), катионный липидный комплекс (липосомы). Однако оказалось, что в респираторном тракте существует значительно больше препятствий для успешной генной терапии, нежели в большинстве других органов. Надежды, связанные с генотерапией, не оправдались в связи с низким уровнем переноса генной конструкции в эпителиальные клетки, невысоким уровнем и преходящим характером экспрессии гена, развитием иммунного ответа на белок вектора, а также вследствие местных и системных воспалительных реакций [1].

В то же время, на сегодня ясно, что транспорт гена *CFTR* возможен и частичная коррекция его дефекта в дыхательных путях также может быть осуществлена без серьёзных нежелательных явлений [29]. Теперь требуются доказательства, что транспорт гена *CFTR* в лёгкие приведёт к клиническому улучшению. Консорциум по генной терапии Великобритании был образован в 2001 г., в него вошли: Оксфордский университет (Gene Medicine Group), Эдинбургский университет (Centre for Molecular Medicine and Roslin Institute), Лондонский колледж (Department of Gene Therapy National Heart and Lung Institute). Консорциум создан для оптимизации ведения исследований в данном направлении. Начато исследование первого продукта консорциума для клинических исследований GL67A/pGM169, который является комбинацией липосомы (cationic liposome) (GL67A) и плазмиды *DNA* expressing *CFTR* (pGM169). В настоящее время идёт набор пациентов для клинического исследования (слепое, плацебо-контролируемое). Препарат или плацебо будут вводиться 1 раз в месяц через небулай-

зер, результаты ожидаются к середине 2014 г. (<http://www.cfgenetherapy.org.uk/>).

Модификаторы последствий мутаций в гене *CFTR*

Хотя в настоящее время задача полной замены мутантного гена нормальной копией — сложная и продолжаются поиски в данном направлении, но идентифицированы малые молекулы, способные модифицировать мутантный белок МВТР. Поиск молекул, способных стимулировать синтез, транспорт или функции неполноценного белка МВТР представляется более перспективным. Возможность терапевтических мероприятий способами, определяемыми классом мутации, в настоящее время служит горячей темой для обсуждения.

Известно, что мутации классифицируются в зависимости от основного дефекта (нарушение синтеза, процессинга, регуляции, проводимости канала). Однако эта градация не является высокоспецифичной и ряд мутаций может быть отнесён к нескольким группам [15].

Препараты для I группы мутаций

Специфический тип мутаций, называемый *нон-сенс-мутациями* (образование преждевременного кодона терминации в результате замены азотистого основания ДНК), приводит к сокращению количества белка МВТР на поверхности клеточной мембраны. Для пациентов, имеющих нонсенс-мутации (мутации I класса), требуются вещества, способствующие «прочитыванию» стоп-кодонов в *CFTR*-mRNA и предотвращению преждевременной терминации синтеза молекулы белка. Среди больных МВ нонсенс-мутации встречаются в 10% случаев [55]. В Израиле этот тип мутаций обуславливает большинство случаев МВ. Аминогликозидные антибиотики были первыми препаратами, продемонстрировавшими *in vitro* восстановление продукции белка МВТР. Назальная инстиляция гентамицина показала достоверное улучшение базальной разности потенциалов и секреции хлоридов в сравнении с группой плацебо [62]. Однако этот результат был строго специфичен для больных с мутациями I класса. В этом исследовании преобладала так называемая еврейская мутация W1282X. В контрольной группе больных, гомозигот по мутации F508del, подобных изменений получено не было. I. Sermet-Gaudelus с соавторами сообщили о сходных результатах системного применения гентамицина у шести из девяти пациентов, носителей мутации Y122X [52]. Однако в обоих исследованиях были пациенты, которые не ответили на терапию гентамицином. Ответ на гентамицин был обнаружен только у пациентов с высоким уровнем транскриптов [39].

В настоящее время компанией PTC Therapeutics, Inc активно исследуется молекула PTC124 (Аталурен), способствующая «прочитыванию» стоп-кодонов в *CFTR*-mRNA и предотвращению преждевременной терминации синтеза молекулы белка. Молекула PTC124 предназначена для лечения пациентов, имеющих нон-

сенс-мутации (мутации I класса). В отличие от гентамицина она не обладает антибактериальной активностью и биодоступна при приёме через рот. Во второй фазе клинических исследований было продемонстрировано достоверное изменение транспорта хлоридов, оцениваемое по изменению разности назальных потенциалов у половины больных [39]. Эти изменения были сопряжены со скромным, но достоверным улучшением лёгочной функции и прибавкой массы. Результаты недавнего 12-недельного исследования аталурена (PTC124) у 19 пациентов, носителей как минимум одной нонсенс-мутации, показали времязависимое повышение активности МВТР, улучшение клинико-функциональных показателей и хорошую переносимость [36, 51]. В 2010 г. закончен набор пациентов 6 лет и старше в 48-недельное исследование, проведённое в США и Израиле, целью которого служит подтверждение улучшения функции лёгких при его применении. Продемонстрированы безопасность и улучшение биологических показателей (http://www.cff.org/research/DrugDevelopmentPipeline/#CFTR_MODULATION).

На Конференции Европейского общества муковисцидоза в Дублине (Ирландия) 8 июня 2012 г. компания PTC Therapeutics, Inc. объявила результаты 3-го этапа клинических исследований аталурена (ataluren) у пациентов с нонсенс-мутацией в гене *CFTR*. Этап 3 проводился в 11 странах в виде двойного слепого, плацебо-контролируемого исследования по сравнению данных в группе принимавших аталурен ($n = 116$) с группой плацебо ($n = 116$) у пациентов с нонсенс-мутацией в гене *CFTR*. Первичной точкой контроля было относительное изменение объёма форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ1) по сравнению с исходным уровнем в процентах в течение 48 недель. Была показана позитивная динамика в пользу аталурена по сравнению с плацебо; ещё больший эффект наблюдался у больных, не получающих хронически ингаляционные антибиотики изначально, на начальном этапе исследования. Эффект ингаляционных антибиотиков был в значительной степени связан с использованием ингаляционных аминогликозидов. В популяции предполагаемого лечения была отмечена 3%-ная разница в относительном изменении от исходного уровня в процентах прогнозируемого ОФВ1 между группами на 48-й неделе ($p = 0,124$). Значительный эффект лечения был замечен в подгруппе больных, не получающих постоянно ингаляционные антибиотики в начале исследования; у этой части пациентов на 48-й неделе разница между группами «аталурен» и «плацебо» по ОФВ1 составила 6,7%. Вторичный показатель — уровень лёгочных осложнений (число лёгочных осложнений за 48 недель) — также показал положительную тенденцию с темпом развития осложнений в группе аталурена на 23% ниже, чем в группе плацебо ($p = 0,0992$). Зарегистрировано, что у пациентов, не получающих постоянно ингаляционные антибиотики, уровень обострений процесса в лёгких в группе получавших аталурен был на 43% ниже, чем в группе плацебо. Показан стойкий эффект ле-

чения аталуреном как на изменение функции лёгких, так и на уровень развития лёгочных обострений (<http://www.medpoisk.ru/cf/ataluren.html>).

*Модуляторы доставки белка МВТР
к апикальной мембране и функции хлорного канала*

Для фармакологического моделирования ионного транспорта разрабатываются так называемые корректоры и потенциаторы [34, 43]. Корректоры — лекарственные вещества, позволяющие мутантному белку МВТР пройти через систему внутриклеточного «контроля качества» и занять правильное расположение на апикальной мембране при мутациях II класса (4-фенилбутират/генистин, аналог силденафила-КМ11060, куркумин, VX-809, VX-661).

Мишенью для потенциаторов являются молекулы мутантного белка МВТР, располагающиеся в апикальной мембране. Действие потенциаторов направлено на восстановление (активацию) функции ионного канала, образованного мутантным белком МВТР (мутации III—IV классов). Примерами таких препаратов служат генистин; VX-770. Оценка эффективности модуляторов МВТР основана на определении их способности увеличивать количество белка МВТР на поверхности эпителиальной клетки и/или усиливать его функцию.

Созданием препаратов с моделирующими функциями занимается компания Vertex Pharmaceuticals Incorporated (Nasdaq: VRTX) при участии Фонда помощи больным муковисцидозом (Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics — CFFT). Цели компании Vertex — поиск, разработка и производство новых терапевтических препаратов, улучшающих жизнь людей при таких тяжёлых заболеваниях, как МВ (www.vrtx.com). Vertex была основана более 20 лет назад в Кембридже, шт.Массачусетс, и проводит исследования в США, Великобритании и Канаде.

Первый одобренный к применению потенциатор — ивакафтор (калидеко, VX-770) — показан пациентам со специфической мутацией G551D, приводящей к ограничению способности открытия канала МВТР. При данной мутации количество белка МВТР достаточно, но работа канала нарушена. Ивакафтор потенцирует работу канала, увеличивая его способность к открытию [56]. Препарат выпускается в таблетированной форме по 150 мг, принимается 1 раз в день, что способствует compliance пациентов и сокращению многокомпонентной терапии. Клинические исследования пациентов, имеющих хотя бы одну мутацию G551D, демонстрировали снижение уровня хлоридов пота в среднем со 100 mEq/L до 51 mEq/L [44]. Что более важно, отмечено существенное клиническое улучшение, сопровождающееся увеличением ОФВ1 на 10,6% должных значений, снижение риска лёгочных обострений на 55%, прибавку массы и улучшение качества жизни [44]. Эффективность сохранялась в течение 48 недель по стабильности содержания Cl^- в поте, количеству обострений, массе и ОФВ1 (<http://clinicaltrials.gov> (NCT00909532)).

Сходные результаты были достигнуты и в педиатрической практике, в результате чего ивакафтор был одобрен для пациентов шести лет и старше Американским управлением по контролю за продуктами и лекарствами (FDA). 29 августа 2012 г. FDA уведомило о потенциальной возможности развития катаракты у детей, больных МВ, которые получают препарат «калидеко» (Kalydeco™). Пока остаётся открытым вопрос, можно ли использовать препарат у младенцев и будет ли он активным при других мутациях, регулирующих функцию хлорного канала, а также будет ли эффективен в отношении других проявлений заболевания, таких, как малая абсорбция, риносинусит, воспаление в дыхатель-

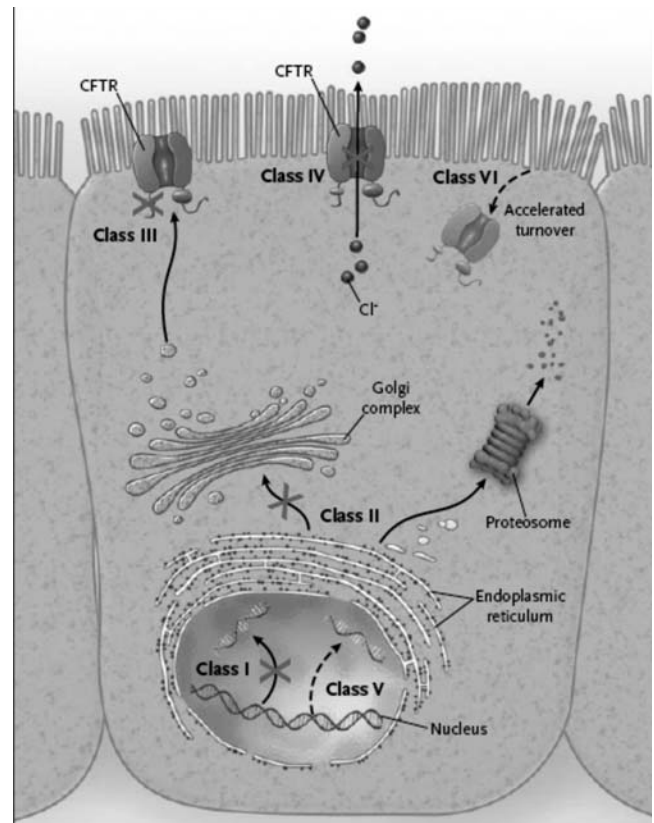


Рис. 2. МВТР-модуляторы [Rowe S.M. et al., New Engl. J. Med. — 2005]:
1. *Потенциаторы* — мишенью данных препаратов являются молекулы мутантного белка МВТР, располагающиеся в апикальной мембране. Действие потенциаторов направлено на восстановление (активацию) функции ионного канала, образованного мутантным белком МВТР (мутации III—IV классов). Препараты: генистин, калидеко (VX-770);
2. *Корректоры* — лекарственные средства, позволяющие мутантному белку МВТР пройти через систему внутриклеточного контроля качества и занять правильное расположение на апикальной мембране (мутации II класса). Препараты: 4-фенилбутират/генистин, аналог силденафила-КМ11060, куркумин, VX-809;
3. *Вещества, способствующие «прочитыванию» стоп-кодонов* в CFTR-mRNA и предотвращению преждевременной термации синтеза молекулы белка, используются при лечении пациентов, имеющих нонсенс-мутации (мутации I класса). Препарат аталурен (PTC124).

ных путях. Следует отметить, что в базе данных мутаций у российских больных данная мутация не содержится.

К сожалению, ивакафтор не эффективен у больных, гомозиготных по мутации F508del [24]. Впрочем, это не стало неожиданностью, так как мутация F508del нарушает процессинг МВТР, существенно снижая его количество на поверхности эпителиальных клеток. С увеличением доставки белка МВТР на поверхность клетки с помощью корректоров ивакафтор как потенциатор смог бы повысить его активность. Многообещающим агентом, позволяющим корригировать дефект процессинга МВТР, вызванный мутацией F508del, являются молекулы VX-809 и VX-661 [13, 57]. Логика комбинации молекулы VX-770 с VX-809 или VX-661 понятна, так как белок МВТР перемещается к апикальной поверхности эпителиальной клетки и затем активируется потенциатором.

Фаза испытаний 2 корректора VX-809 была начата весной 2009 г. с целью оценить безопасность, толерантность, фармакокинетику и фармакодинамику препарата у лиц с мутацией F508del. Препарат VX-809, представляющий собой биодоступный при приёме *per os* F508del-корректор, прошёл вторую фазу плацебо-контролируемого исследования в группе пациентов, гомозиготных по мутации F508del. В результате был продемонстрирован рост активности МВТР и снижение хлоридов в потовой жидкости в группе, получающей препарат [51].

В рамках сотрудничества Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics (CFFT) — некоммерческая компания по разработке лекарств, аффилированная с Фондом помощи больным муковисцидозом (CF Foundation) предоставил в 2011 г. компании Vertex до 75 млн долл. США для поддержки научно-исследовательских работ в течение 5 лет. Компания Vertex начала клиническое испытание фазы 2 для VX-661 с 2011 г. В исследование были включены больные с мутацией F508del.

Кроме того, в рамках этого сотрудничества предполагается производить ускоренный поиск и ранние этапы исследований корректоров следующего поколения, направленных на лечение причины МВ у больных с мутацией F508del.

В рамках предыдущих программ сотрудничества CFFT имеет право на получение отчислений от выручки, полученной от будущих продаж VX-770, VX-809 и VX-661. Права на препараты VX-770, VX-809 и VX-661 по всему миру сохраняются за Vertex.

В настоящее время комбинация VX-809 и VX-661 с ивакафтором (VX-770) исследуется у больных с мутацией F508del [53, 54]. На 26-й Ежегодной Североамериканской конференции по муковисцидозу в Орландо были представлены подробные данные испытания фазы 2 (2009–2012), подтверждающие положительное влияние комбинации VX-809 и Kalydeco (VX-770) на функцию лёгких. Найдена наиболее эффективная доза препарата (VX890 — 600 мг и VX-770 — 250 мг), при которых достигнуто максимальное улучшение показателя ОФВ1 в группе терапии на 3,4% и снижение в группе плацебо на 3,3% за 56 дней терапии.

В 2013 г. начинается фаза 3 исследований для групп: F508del / F508del и F508del / любая другая мутация.

В настоящее время идёт набор пациентов для фазы 2 исследования корректора VX-661 в сочетании с Kalydeco (VX-770) для пациентов с мутациями F508del / F508del.

Таким образом, следует ожидать, что в ближайшее время может быть сделан существенный прорыв в изменении подходов к терапии МВ и повышении её эффективности.

Активаторы альтернативных хлорных каналов

МВТР не единственный канал эпителиальной клетки, ответственный за поддержание уровня и состава жидкости, покрывающей эпителий. Существуют альтернативные хлорные каналы, включая кальцийзависимый и P2Y — рецептор, активируемый АТФ [16, 22]. Два препарата оказались в поле зрения исследователей: денуфозол, стимулирующий секрецию хлоридов [7], и ланковутид (Moli1901), продемонстрировавший улучшение разности назальных потенциалов при нанесении на слизистую носа [27].

Ранние исследования уридин-5-трифосфата, аналога АТФ, выявили короткий период полужизни, ограничивающий его клиническое применение [37]. Другой аналог денуфозол показал большую стабильность, и ранние исследования были многообещающими. Помимо исправления дефекта ионного транспорта вследствие усиления секреции хлоридов через Са-активируемые хлорные каналы дефуназол ингибирует абсорбцию натрия, воздействуя на эпителиальные Na⁺-каналы, стимулирует усиление частоты биения ресничек. Исследование TIGER1 (Transport of Ions to Generate Epithelial Rehydration study) продемонстрировало улучшение лёгочной функции. В данном исследовании приняли участие 352 пациента с МВ старше 5 лет (средний возраст 14,6 года) с ОФВ1 $\geq 75\%$ (в среднем 92% от должного). Часть из них получала ингаляции денуфозола 60 мг 3 раза в день в течение 48 недель [8]. В то же время второе, плацебо-контролируемое, исследование TIGER2, в которое были включены 466 пациентов, средний возраст которых составил 15,1 года, не подтвердило полученные результаты и дальнейшие испытания препарата были приостановлены [45]. Фармакокинетические данные показали, что денуфозол имел относительно короткий период полужизни (17 мин), значительно короче ожидаемого в ходе изучения *in vitro*. Возможно, с этим связана неудача исследования. В то же время не исключено, что денуфозол способен снизить скорость падения лёгочной функции без её улучшения (<http://www.medpagetoday.com/Pulmonology/GeneralPulmonary/24154>).

Ланковутид увеличивает уровень внутриклеточного кальция и активирует альтернативные хлорные каналы [42]. Клинические испытания продемонстрировали улучшение проводимости хлоридов путём измерения разности назальных потенциалов у больных МВ, и одноцентровое клиническое исследование 24 пациентов с МВ по-

казало безопасность препарата и эффективность относительно лёгочной функции [28]. Тем не менее, дальнейших исследований этого препарата не последовало.

Ингибировать абсорбцию натрия — ещё одна функция белка МВТР. Его отсутствие приводит к избыточной абсорбции натрия и воды через эпителиальные натриевые каналы. Уменьшение абсорбции натрия является альтернативным методом лечения. В связи с этим, определённые надежды возлагались на аэрозоль амилорида, блокатора эпителиальных натриевых каналов. Однако подтвердить его клиническую эффективность не удалось [12]. Не исключено, что другие каналы имеют большее значение в формировании болезни лёгких при МВ или причина — в низкой стабильности препарата.

В целом, в настоящее время вопрос об эффективности и безопасности активаторов альтернативных хлорных каналов остаётся открытым.

Средства, регулирующие осмотический градиент

Другим возможным терапевтическим подходом может быть восстановление объёма жидкости на поверхности эпителия дыхательных путей. В основе повышения эффективности мукоцилиарного клиренса — улучшение гидратации поверхности дыхательных путей за счёт изменения осмотического градиента [20]. Ингаляция гипертонического раствора (ГР) хлорида натрия приводит к увеличению концентрации ионов в жидкости, покрывающей реснитчатый эпителий, способствует гидратации слизи, улучшая клиренс дыхательных путей. Поскольку эффект от ингаляции ГР отмечается в первые 60 минут вследствие быстрой абсорбции, увеличение объёма жидкости, покрывающей эпителий дыхательных путей, а соответственно и улучшение мукоцилиарного клиренса — краткосрочное явление [48]. Ещё в 2005 г. Cochrane Systematic Review сообщало о недостатке доказательств для использования ГР в рутинной практике [60]. Однако в 2010 г. появились сообщения о других эффектах ГР: способности разрушать комплекс ДНК/мукопротеин, увеличивать содержание glutathione (GSH) и thiocyanate (SCN) — протективных антиоксидантных CFTR-зависимых тиолов [26]. Небулизация ГР нарушает взаимодействие ИЛ-8 с глюкозаминогликанами, делая его доступным для протеолиза, уменьшая хемотаксис нейтрофилов, способствуя тем самым разрешению воспаления [46].

ГР демонстрирует и другие клинические преимущества. Ингаляция 7–8%-ного ГР хлорида натрия улучшает неравномерность вентиляции у больных МВ с нормальными показателями спирометрии, снижает уровень маркёров воспаления в мокроте, риск лёгочных обострений, незначительно улучшает лёгочную функцию [11, 19, 46, 59]. Частота и концентрация могут влиять на результаты ингаляций. В то же время, недавнее большое рандомизированное 48-недельное мультицентровое исследование у детей младше 6 лет не показало уменьшения числа обострений в группе лечения [49]. Серьёзным недостатком ГР считается низкая толерантность из-за

усиления кашля и бронхоспазма [21]. Ингаляции ГР у ряда пациентов должно предшествовать введению ингаляционных бронходилататоров.

Другим альтернативным осмотическим агентом, способным накапливать воду в жидкости, выстилающей эпителий дыхательных путей и присутствовать на поверхности более длительное время, является маннитол. Недавно была изучена эффективность ингаляционной формы маннитола в виде сухой пудры у больных с МВ и бронхоэктазами иного происхождения. Как и в случае с ГР хлорида натрия, улучшение клиренса дыхательных путей отмечено в первые 45 мин, после чего его показатели оставались неизменными при всех тестируемых дозах [18]. Результатами клинических исследований стали достоверное повышение ОФВ1, уменьшение обострений в группе больных, получавших маннитол, что было подтверждено и в открытой фазе исследования; 14% пациентов исключены из исследования из-за нежелательных явлений (кашель, кровохарканье, бронхоспазм, фарингеальная боль) [31]. Опасения относительно того, что маннитол способствует росту *B. cepacia*, не подтвердились.

Ещё один представитель сахаров с низкой трансэпителиальной проницаемостью, ксилитол, также действует как осмолярный агент, сходный с маннитолом. Ранние исследования показали безопасность у мышей, здоровых добровольцев и стабильных пациентов с МВ при однократной назначении в день [64]. В настоящее время проводятся сравнительные исследования безопасности и эффективности ингаляционного ксилитола с ГР [65].

Респираторная инфекция, воспаление, мукоцилиарный клиренс, нутритивный статус, уменьшение обострений, состояния, напрямую связанные с лёгочной функцией, являются также целями лечения МВ. Однако поликомпонентная терапия дорогостоящая, значительно влияет на качество жизни больного, не лишена побочных эффектов. Улучшение клинического статуса, выживаемости больных МВ является результатом развития терапевтических стратегий и в будущем связывается с пониманием молекулярных механизмов развития заболевания и возможностью их коррекции.

Список литературы

1. Гинтер Е.К., Капранов Н.И., Петрова Н.В., Каширская Н.Ю. Генетика бронхолёгочных заболеваний. — М.: Атмосфера, 2010. — С. 51–78.
2. Гуськова А.А., Скоблов М.Ю., Баранова А.В. Жизнь и смерть белка CFTR // Медицинская генетика. — 2007. — Т. 6, №2 (56). — С. 3–9.
3. Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. — СПб.: Интермедика, 2002. — 256 с. — ISBN 5-89720-043-2.
4. Корытина Г.Ф., Викторова Т.В., Байкова Г.В., Хуснутдинова Э.К. Анализ спектра мутаций и полиморфных локусов гена трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза в Башкортостане // Генетика. — 2002. — Т. 38, №9. — С. 1270–1275.

5. Красовский С.А., Никонова В.С., Каширская Н.Ю., Кондратьева Е.И. и др. Клинико-генетическая, микробиологическая и функциональная характеристика больных муковисцидозом, проживающих в Москве и Московской области // Вопросы современной педиатрии. — 2013. — Т. 12, №1. — С. 17–23.
6. Руковичкин Д.В. Клинико-генотипический полиморфизм муковисцидоза среди населения Краснодарского края: Дисс. на соискание учёной степени к.м.н.: 03.00.15. — Краснодар, 2007. — 27 с.
7. Accurso F. The Tiger-1 clinical trial on denufosol in cystic fibrosis // *Ped. Pulmonol.* — 2008. — №31. — P. 191.
8. Accurso F.J., Moss R.B., Wilmott R.W., Anbar R.D., Schaberg A.E., Durham T.A., Ramsey B.W. TIGER-1 Investigator Study Group: Denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis and normal to mildly impaired lung function // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2011. — Vol. 183(5). — P. 627–634.
9. Aerosolized hypertonic xylitol versus hypertonic saline in cystic fibrosis (CF). [<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00928135?term=cystic+fibrosis+xylitol&rank=1>].
10. Amaral M.D. Processing of CFTR: Traversing the cellular maze- how much CFTR needs to go through to avoid cystic fibrosis? // *Pediatr. Pulmonol.* — 2005. — Vol. 39. — P. 479–491.
11. Amin R., Subbarao P., Jabar A., Balkovec S., Jensen R., Kerrigan S., Gustafsson P., Ratjen F. Hypertonic saline improves the LCI in paediatric patients with CF with normal lung function // *Thorax.* — 2010. — Vol. 65(5). — P. 379–383.
12. Burrows E., Southern K., Noone P. Sodium channel blockers for cystic fibrosis // *Cochrane Database Syst. Rev.* — 2006. — 3. — CD005087.
13. Cain C. Cystic fibrosis two-step // *SciBX.* — 2012. — 5(8), doi:101038/scibx2012192.
14. Castellani C., Cuppens H., Macek M. Jr. et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice // *J. Cyst. Fibr.* — 2008. — Vol. 8. — P. 179–196.
15. Castellani C., Cuppens H., Macek M. Jr., Cassiman J.J., Kerem E., Durie et al. Использование и интерпретация анализа мутаций при муковисцидозе в клинической практике. — Европейский консенсус, 2009. — С. 1–28.
16. Chan H.C., Goldstein J., Nelson D.J. Alternate pathways for chloride conductance activation in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells // *Am. J. Physiol.* — 1992. — Vol. 262 (5 Pt 1). — C1273–C1283.
17. Collins F.S. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications // *Science.* — 1992. — 256(5058). — P. 774–779.
18. Daviskas E., Anderson S.D., Eberl S., Chan H.K., Bautovich G. Inhalation of dry powder mannitol improves clearance of mucus in patients with bronchiectasis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1999. — Vol. 159. — P. 1843–1848.
19. Dmello D., Nayak R.P., Matuschak G.M. Stratified assessment of the role of inhaled hypertonic saline in reducing cystic fibrosis pulmonary exacerbations: a retrospective analysis // *BMJ Open.* — 2011. — 1(1). — e000019.
20. Donaldson S.H., Bennett W.D., Zeman K.L., Knowles M.R., Tarran R., Boucher R.C. Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline // *N. Engl. J. Med.* — 2006. — Vol. 354(3). — P. 241–250.
21. Elkins M.R., Robinson M., Rose B.R., Harbour C., Moriarty C.P., Marks G.B., Belousova E.G., Xuan W., Bye P.T. National Hypertonic Saline in Cystic Fibrosis (NHSCF) Study Group: A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis // *N. Engl. J. Med.* — 2006. — Vol. 354(3). — P. 229–240.
22. Erlinge D. P2Y receptors in health and disease // *Adv. Pharmacol.* — 2011. — Vol. 61. — P. 417–439.
23. Farinha C.M., Amaral M.D. Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin // *Mol. Cell. Biol.* — 2005. — Vol. 25, №12. — P. 5242–5252.
24. Flume P.A., Liou T.G., Borowitz D.S., Li H., Yen K., Ordonez C.L., Geller D.E. Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation // *Chest.* — 2012.
25. Flume P.A., Van Devanter D.R. State of progress in treating cystic fibrosis respiratory disease // *BMC Medicine.* — 2012, <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/10/88>
26. Gould N.S., Gauthier S., Kariya C.T., Min E., Huang J., Day B.J. Hypertonic saline increases lung epithelial lining fluid glutathione and thiocyanate: two protective CFTR-dependent thiols against oxidative injury. <http://respiratory-research.com/content/11/1/119>.
27. Grasemann H., Stehling F., Brunar H. et al. Inhalation of moli1901 in patients with cystic fibrosis // *Chest.* — 2007. — Vol. 131. — P. 1461–1466.
28. Grasemann H., Stehling F., Brunar H., Widmann R., Lalierte T. et al. Inhalation of moli1901 in patients with cystic fibrosis // *Chest.* — 2007. — Vol. 131(5). — P. 1461–1466.
29. Griesenbach U., Alton E.W. Progress in gene and cell therapy for cystic fibrosis lung disease // *Curr. Pharm. Des.* — 2012. — 18(5). — P. 642–662.
30. Haardt M., Benharouga M., Lechardeur D. et al. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274. — P. 21873–21877.
31. Hebestreit H.U., Lapey A., Schou I.M., Zuckerman J.B., Charlton B. Long-term inhaled dry powder mannitol in cystic fibrosis: an international randomized study // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2012. — Vol. 185. — P. 645–652.
32. Jentsch T.J., Maritzen T., Zdebik A.A. Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function // *J. Clin. Invest.* — 2005. — Vol. 115. — P. 2039–2046.
33. Kerem B.S., Kerem E. The molecular basis for disease variability in cystic fibrosis // *Eur. J. Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 4. — P. 65–73.
34. Kerem E. Mutation specific therapy in CF // *Paediatr. Respir. Rev.* — 2006. — Vol. 7, №1. — P. 166–169.
35. Kerem E., Armoni S., Hirawat S. et al. Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial // *Lancet.* — 2008. — Vol. 372. — P. 719–727.
36. Kerem E., Hirawat S., Armoni S., Yaakov Y., Shoseyov D., Cohen M., Nissim-Rafinia M., Blau H., Rivlin J., Aviram M. et al. Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial // *Lancet.* — 2008. — Vol. 372 (9640). — P. 719–727.
37. Knowles M.R., Clarke L.L., Boucher R.C. Activation by extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with cystic fibrosis // *N. Engl. J. Med.* — 1991. — Vol. 325(8). — P. 533–538.
38. Kogan I., Ramjeesingh M., Li C. et al. CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux // *The EMBO J.* — 2003. — Vol. 22, №9. — P. 1981–1989.
39. Linde L., Boelz S., Nissim-Rafinia M. et al. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin // *J. Clin. Invest.* — 2007. — Vol. 117. — P. 1–9.

40. Loubieres Y., Grenet D., Simon-Bouy B. et al. Association between genetically determined pancreatic status and lung disease in adult cystic fibrosis patients // *CHEST*. — 2002. — Vol. 121, №1. — P. 73–80.
41. Mishra A., Greaves R., Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era // *Clin. Biochem. Rev.* — 2005. — Vol. 26. — P. 135–153.
42. Pettit R.S., Johnson C.E. Airway-rehydrating agents for the treatment of cystic fibrosis: past, present, and future // *Ann. Pharmacother.* — 2011. — Vol. 45(1). — P. 49–59.
43. Proesmans M., Vermeulen F., De Boeck K. What's new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction of the basic defect // *Eur. J. Pediatr.* — 2008. — Vol. 167, №8. — P. 839–849.
44. Ramsey B.W., Davies J., McElvaney N.G., Tullis E., Bell S.C., Drevinek P., Griese M., McKone E.F., Wainwright C.E., Konstan M.W. et al. CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation // *N. Engl. J. Med.* — 2011. — Vol. 365. — P. 1663–1672.
45. Ratjen F., Durham T., Navratil T., Schaberg A., Accurso F.J., Wainwright C., Barnes M., Moss R.B. The TIGER-2 Study Investigator Group. Long term effects of denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis // *J. Cyst. Fibros.* — 2012.
46. Reeves E.P., Williamson M., O'Neill S.J., Grealley P., McElvaney N.G. Nebulized hypertonic saline decreases IL-8 in sputum of patients with cystic fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2011. — Vol. 183(11). — P. 1517–1523.
47. Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B.S. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and the characterization of complementary DNA // *Science*. — 1989. — Vol. 245. — P. 1066–1073.
48. Robinson M., Hemming A.L., Regnis J.A., Wong A.G., Bailey D.L., Bautovich G.J., King M., Bye P.T. Effect of increasing doses of hypertonic saline on mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis // *Thorax*. — 1997. — Vol. 52. — P. 900–903.
49. Rosenfeld M., Ratjen F., Brumback L., Daniel S., Rowbotham R., McNamara S., Johnson R., Kronmal R., Davis S.D. ISIS Study Group: Inhaled hypertonic saline in infants and children younger than 6 years with cystic fibrosis: the ISIS randomized controlled trial // *JAMA*. — Vol. 307(21). — P. 2269–2277.
50. Rowntree R.K., Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations // *Ann. Hum. Genet.* — 2003. — Vol. 67. — P. 471–485.
51. Sermet-Gaudelus I., Boeck K.D., Casimir G.J., Vermeulen F., Leal T., Mogenet A., Roussel D., Fritsch J. et al. Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2010. — Vol. 182(10). — P. 1262–1272.
52. Sermet-Gaudilus I., Renouil M., Fajac A. et al. In vitro prediction of stop codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study // *B.M.C. Med.* — 2007. — Vol. 5. — P. 5.
53. Study of VX-661 alone and in combination with VX-770 in subjects homozygous to the F508del-CFTR mutation. [http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01531673?term=ivacaftor&intr=ivacaftor&rank=2].
54. Study of VX-809 alone and in combination with VX-770 in cystic fibrosis (CF) patients homozygous or heterozygous for the F508del-CFTR mutation. [http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT0125211?term=ivacaftor&intr=ivacaftor&rank=4].
55. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium: Population variation of common cystic fibrosis mutations // *Hum. Mutat.* — 1994. — 4(3). — P. 167–177.
56. Van Goor F., Hadida S., Grootenhuys P.D., Burton B., Cao D., Neuberger T., Turnbull A., Singh A. et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2009. — Vol. 106(44). — P. 18825–18830.
57. Van Goor F., Hadida S., Grootenhuys P.D., Burton B., Stack J.H., Straley K.S., Decker C.J., Miller M., McCartney J. et al. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2011. — Vol. 108(46). — P. 18843–18848.
58. Vankeerberghen A., Wei L., Jaspers M. et al. Characterization of 19 disease-associated missense mutations in the regulatory domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator // *Hum. Mol. Genet.* — 1998. — Vol. 7. — P. 1761–1769.
59. Wark P., McDonald V.M. Nebulised hypertonic saline for cystic fibrosis // *Cochrane Database Syst. Rev.* — 2009. — 2. — CD001506.
60. Wark P.A.B., McDonald V., Jones A.P. Nebulised hypertonic saline for cystic fibrosis // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. — 2005, Issue 3. Art. No.: CD001506. DOI: 10.1002/14651858.CD001506.pub2.
61. Welsh M.J., Smith A.E. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis // *Cell*. — 1993. — Vol. 73. — P. 1252–1254.
62. Wilschanski M., Yahav Y., Yaakov Y., Blau H. et al. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations // *N. Engl. J. Med.* — 2003. — Vol. 349. — P. 1433–1441.
63. Witt H. Chronic pancreatitis and cystic fibrosis // *Gut*. — 2003. — Suppl. 2. — P. 1131–1141.
64. Zabner J., Seiler M.P., Launspach J.L., Karp P.H., Kearney W.R., Look D.C., Smith J.J., Welsh M.J. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2000. — Vol. 97(21). — P. 11614–11619.
65. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis // *Respiration*. — 2000. — Vol. 67, №2. — P. 117–133.

The molecular fundamentals of new remedies creation for cystic fibrosis

Kapranov N.I.¹, Kondrateva E.I.¹, Asherova I.K.², Petrova N.V.¹, Kashirskaya N.Y.¹

¹ — Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics» under Russian Academy of Medical Sciences, 115478, Russia, Moscow, Moskvorechye st., 1

² — Children's Clinical Hospital №1, Yaroslavl, Russian Federation

This review examines the molecular basis of mutations of the *CFTR* gene and protein cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR). We present a classification of CFTR mutations in 6 classes and their consequences in the form of disruption of protein synthesis, CFTR delivery to the apical membrane and chloride channel function. Based on the molecular disorders possible approaches to the development of new drugs are discussed. The results of the recent clinical trials of various classes of modulators (potentiators and correctors, ataluren, activators of alternative chloride channels, regulators of the osmotic gradient) are described.

Key words: cystic fibrosis mutations, modulators, potentiators, correctors

Скрининг мутаций генов атипичных семейных микобактериозов*

Рудко А.А.¹, Гараева А.Ф.¹, Брагина Е.Ю.¹, Бабушкина Н.П.¹, Колоколова О.В.², Липаенкова О.Н.², Фрейдин М.Б.¹

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук; 634050, г.Томск, ул. Набережная р.Ушайки, д. 10; тел.: (3822)-51-22-28; факс: (3822) 51-37-44. E-mail: valery.puzyrev@medgenetics.ru

² — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; 634050, г.Томск, Московский тракт, 2; тел.: (3822)- (3822)-532304; факс: (3822) 53-33-09. E-mail: office@ssmu.ru

В двух сибирских популяциях (русские и тувинцы) проведено изучение генов *IL12B*, *IL12RB1*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IKBK*G, приводящих к развитию «синдрома атипичных семейных микобактериозов» (MIM 209950). При исследовании распространенности 12 наиболее часто встречающихся мутаций генов установлен мономорфизм по аллелям «дикого типа». Методом секвенирования генов мутации, приводящие к развитию синдрома менделирующей подверженности микобактерийным заболеваниям (МПМЗ), также не выявлены, однако идентифицированы 15 известных ранее полиморфных вариантов. При поиске ассоциаций этих вариантов с туберкулезом (ТБ) в исследуемых популяциях методом «случай—контроль» впервые обнаружена связь полиморфизма rs2066797 гена *STAT1* с заболеванием ($p = 0,02$).

Ключевые слова: туберкулез, генетическая подверженность, полиморфизм, ассоциация, атипичные семейные микобактериозы

Введение

ТБ остаётся одной из наиболее распространённых и опасных инфекций в мире, от которой ежегодно умирает более 2 млн чел. Влияние наследственных факторов человека на развитие ТБ не вызывает сомнений, свидетельством чему служат данные эпидемиологических, близнецовых и молекулярно-генетических исследований [3, 13]. В современной генетике подверженности ТБ можно выделить два основных направления исследований: являющийся наиболее распространённым анализ полигенной подверженности в эндемичных регионах и изучение семей с редкими формами подверженности микобактерийной инфекции с моногенным (менделевским) характером наследования, обозначенных в базе данных OMIM синдром атипичных семейных микобактериозов, или синдром менделирующей подверженности микобактерийным заболеваниям (МПМЗ) (MIM 209950) [10, 14].

Сегодня МПМЗ определяется как тяжёлое заболевание, диссеминированное или локализованное, рекуррентное, вызванное слабовирулентными видами бактерий, такими, как *M. bovis BCG*, *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. avium*, *Salmonella enterica* и другими, у в остальном относительно здоровых индивидов. Заболевание является редким врождённым синдромом, который впервые описан в 1951 г. как диссеминированное заболевание, вызванное вакциной БЦЖ [12]. Установлено, что МПМЗ обусловлено мутациями в шести генах: *IL12B* (ген субъ-

единицы р40 интерлейкина-12 — ИЛ-12), *IL12RB1* (субъединицы $\beta 1$ рецептора к ИЛ-12), *IFNGR1*, *IFNGR2* (кодирующие первый и второй домены рецептора к ИФН- γ), *STAT1* (ИФН- γ -ассоциированного сигнального трансдуктора и активатора транскрипции), а также ген *IKBK*G (*NEMO*) — основного модулятора NF- κ -B [8, 9]. Эффект этих мутаций имеет общий патогенетический механизм и проявляется в ослаблении сигнала ИФН- γ — ключевого активатора антимикобактерийной активности макрофагов (рисунк) [10].

Описано более 450 пациентов из 44 стран мира, имеющих данный синдром. Возраст пациентов не превышает 14 лет, большинство из них проживает в неэндемичных для ТБ регионах, в странах и популяционных группах с высокой частотой близкородственных браков: Саудовской Аравии, Тунисе, Турции, Иране, Марокко, а также среди эмигрантов из данных регионов [5, 16]. Наиболее частыми причинами формирования синдрома атипичных микобактериозов являются мутации в генах *IL12RB1* и *IFNGR1* (около 80% всех зарегистрированных случаев). В основном описанные в литературе мутации наследуются по аутосомному типу (за исключением X-сцепленного дефекта гена *IKBK*G) с полной или частичной пенетрантностью.

Неполная пенетрантность ряда мутаций, приводящих к этому синдрому, послужила основанием для предположения о том, что эти генетические дефекты могут быть

* Исследование выполнено при поддержке грантов Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашения №8042 (НОЦ), №8156.

распространены в общей популяции с достаточно высокой частотой (<1%). В свою очередь, это даёт основание предполагать, что редкие полиморфизмы в этих генах с сильным эффектом в отношении развития ТБ и низкой пенетрантностью могут быть существенной причиной подверженности ТБ в общей популяции, а не только в отдельных семьях. Результаты теоретического расчёта доли менделевских случаев среди детского диссеминированного ТБ показали, что частота МПМЗ может составлять от 3 до 45% [4]. То есть до половины случаев детского ТБ может быть обусловлено наличием менделевской предрасположенности. Кроме того, эти мутации могут играть значительную роль в восприимчивости к ТБ и у взрослого населения. Систематический скрининг данных мутаций в России ранее не проводился.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение в популяциях Сибирского региона и у больных ТБ распространённости мутаций в генах, вызывающих атипичные семейные микобактериозы (*IL12B*, *IL12RB1*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IKBK*).

Материалы и методы

Материалом для настоящего исследования послужила ДНК неродственных между собой русских жителей Томской области ($n = 331$; 113 женщин, 218 мужчин, средний возраст $\pm S.D.$ составил $31,7 \pm 15,4$ года) и 238 коренных жителей Республики Тыва (116 женщин, 122 мужчины, средний возраст $\pm S.D.$: $33,5 \pm 12,9$ года), больных первичным ТБ лёгких и тяжёлыми формами ТБ вторичного генеза (диссеминированная форма, фиброзно-кавернозный ТБ и др.). Контрольные выборки составили 279 русских (208 женщин, 71 мужчина, средний возраст $\pm S.D.$: $45,4 \pm 21,7$ года) и 265 тувинцев (63 женщины и 202 мужчины, средний возраст $\pm S.D.$: $33,1 \pm 8,5$ года), не болевших ТБ, по анамнестическим данным.

Для поиска новых мутаций и редких полиморфизмов генов, вовлечённых в патогенез синдрома атипичных семейных микобактериозов на базе детского лёгочно-туберкулёзного отделения Железнодорожной больницы г.Томска, при участии сотрудников кафедры фтизиатрии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России была сформирована группа из 10 детей в возрасте от 2 до 18 лет с генерализованными формами ТБ и тяжёлыми осложнениями БЦЖ-вакцинации.

Генотипирование осуществляли методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПДРФ-анализа. Для проведения ПЦР использовали структуры праймеров и параметры температурных циклов, описанные ранее в литературе и подобранные самостоятельно посредством программы Primer3 v.0.4.0. Поиск новых мутаций исследуемых генов проводили путём секвенирования экзонов и участков интрон-экзонных стыков генов по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3130xl.

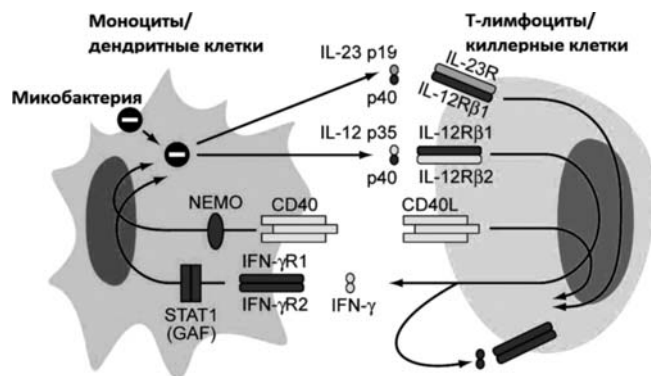
Анализ результатов секвенирования проводили с использованием программ BioEdit и Sequence Scanner v.1.0.

Частоты генотипов по исследованным полиморфизмам проверяли на соответствие ожидаемым при равновесии Харди—Вайнберга с помощью точного теста Фишера [1]. Поиск ассоциации маркёров исследуемых генов с ТБ проводили путём сравнения частот аллелей и генотипов между группами больных и здоровых индивидов, используя критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность. При ожидаемых численностях генотипов менее пяти использовали точный тест Фишера. О степени ассоциации разных генотипов (или их комбинаций) и аллелей с заболеванием судили по величине отношения шансов (odds ratio, OR) [15].

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования из выборок больных ТБ русских и тувинцев была сформирована группа с тяжёлым течением заболевания ($n = 76$ и 38 соответственно), в которой проведено скрининговое исследование распространённости наиболее часто встречающихся мутаций в генах *IL12RB1*, *IFNGR1*, *IFNGR2* и *STAT1*, связанных, по данным литературы, с синдромом атипичных семейных микобактериозов. Для этого по доступным базам данных и публикациям в научной литературе были выбраны 12 мутаций, обнаруженные ранее хотя бы в двух независимых случаях в мире: *IL12RB1* Gln32Ter, Gln376Ter, Arg213Trp; *IFNGR1* Ile87Thr, 4-bp Del NT818, 1-bp Del NT818; *IFNGR2* 2-bp Del 278AG, Thr168Asn, 663Del27; *STAT1* Leu706Ser, Gln463His, Glu320Gln.

В результате в исследованной группе больных ТБ по всем изученным мутациям установлен мономорфизм по аллелям «дикого типа», что свидетельствует об отсутствии в исследованных группах больных с синдромом МПМЗ, обусловленным перечисленными мутациями, но не исключает возможного наличия других причинных мутаций, предрасполагающих к развитию данного синдрома. Это подтверждается данными о том, что генетическая основа



Белки цитокинового каскада Th-1 типа, вовлечённые в развитие менделевской подверженности микобактерийным заболеваниям [9]

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

примерно 50% случаев МПМЗ остаётся невыясненной [5]. Одним из подходов для решения этой задачи является прямое секвенирование первичной последовательности генов, связанных с синдромом атипичных семейных микобактериозов, у больных редкими формами ТБ.

На втором этапе исследования для поиска мутаций и полиморфизмов у пациентов с генерализованными формами ТБ и осложнениями БЦЖ-вакцинации ($n = 10$) использовали секвенирование по методу Сэнгера. Для сиквенса были выбраны только транслируемые экзоны, при этом с целью обнаружения возможных мутаций сплайсинга праймеры были подобраны таким образом, чтобы продукты амплификации перекрывали интрон-экзонную область. Всего просеквенировано 40 локусов. В результате секвенирования не выявлены мутации, приводящие к развитию МПМЗ, однако идентифицированы 15 известных полиморфных вариантов, локализованных в различных регионах исследуемых генов (табл. 1). Среди выявленных полиморфизмов 9 расположены в интронных областях, 3 полиморфизма приводят к синонимичной замене нуклеотидов и не отражаются на строении белка, а 3 полиморфизма известны как миссенс-мутации, 2 из них расположены в гене *IL12RB1* и один — в гене *IFNGR1* (табл. 1).

На третьем этапе исследования в контрольных выборках и у больных ТБ русских и тувинцев методом ПДРФ-анализа проведено генотипирование полиморфных вариантов исследуемых генов, выявленных секвенированием. При этом из исследования были исключены синонимичные замены, так как они не приводят к изменению структуры конечного белкового продукта и, следовательно, к изменению его функции. Кроме того, исключены полиморфизмы генов *IFNGR1* rs11754268, rs11575936 и *IFNGR2* rs17883129 вследствие того, что в первичной последовательности локусов, несущих мутации, отсутствовали известные участки связывания эндонуклеаз рестрикции, представленные в каталогах производителей (НПО «Сибэнзим», New England Bio Labs» и др.), в связи с чем не представлялось возможным подобрать условия для ПДРФ-анализа. Таким образом, в третий этап работы были включены 9 полиморфных вариантов.

Частоты генотипов практически всех изученных полиморфных вариантов в контрольных выборках и у больных ТБ соответствовали ожидаемым при равновесии Харди—Вайнберга. Отклонение выявлено лишь у тувинцев для rs2066797 гена *STAT1* (в группе контроля и у больных ТБ) и rs12461312 гена *IL12RB1* (в контрольной выборке).

Таблица 1

Полиморфные варианты генов атипичных семейных микобактериозов, обнаруженные при секвенировании ДНК детей с генерализованным ТБ и осложнениями БЦЖ-вакцинации

Тип замены	мРНК		Протеин	
	Позиция	Замена аллеля	Позиция	Замена аминокислоты
<i>IL12RB1</i>				
Синонимичная rs11086087	451 (экзон 5)	CTG → GTA GTG → GTC	129	V[Val] → V[Val] V[Val] → V[Val]
Миссенс rs11575934	705 (экзон 7)	CAG → CGG	214	Q[Gln] → R[Arg]
Синонимичная rs17852635	748 (экзон 7)	CCC → CCT	228	P[Pro] → P[Pro]
Миссенс rs401502	1196 (экзон 10)	GGG → CGG	378	G[Gly] → R[Arg]
rs12461312	32041 (интрон 13)	A/C	—	—
rs17882555	32018 (интрон 13)	C/T	—	—
rs3746190	2087 (3'UTR)	C/T	—	—
<i>IL12B</i>				
rs919766	14918 (интрон 3)	A/C	—	—
<i>IFNGR1</i>				
rs2234711	48 (5'UTR)	C/T	—	—
rs7749390	5198 (интрон 1)	A/G	—	—
rs11754268	5233 (интрон 1)	C/T	—	—
Миссенс rs11575936	143 (экзон 1)	GTG → ATG	14	V[Val] → M[Met]
Синонимичная rs11914	153 (экзон 7)	TCT → TCG	350	S[Ser] → S[Ser]
<i>IFNGR2</i>				
rs17883129	34996 (интрон 6)	C/T	—	—
<i>STAT1</i>				
rs2066797	29554 (интрон 9)	A/G	—	—

Таблица 2

Частоты генотипов и аллелей больных ТБ и здоровых лиц (русские, тувинцы)

Ген (полиморфизм)	Генотип / Аллель	Русские, n (%)		Тувинцы, n (%)	
		Больные ТБ	Здоровые	Больные ТБ	Здоровые
<i>IL 12 RB1</i> (rs11575934)	AA	134 (43,51)	103 (40,87)	65 (36,11)	72 (34,12)
	AG	138 (44,81)	126 (50,00)	80 (44,44)	97 (45,97)
	GG	36 (11,69)	23 (9,13)	35 (19,44)	42 (19,91)
	G	34,1	34,1	41,7	44,2
χ^2 (p) *		1,884 (0,390)		0,170 (0,918)	
χ^2 (p) #		0,003 (0,960)		0,074 (0,785)	
<i>IL 12 RB1</i> (rs17882555)	TT	57 (19,06)	50 (21,37)	48 (25,67)	48 (21,62)
	TC	132 (44,15)	112 (47,86)	87 (46,52)	116 (52,25)
	CC	110 (36,79)	72 (30,77)	52 (27,81)	58 (26,13)
	T	41,1	45,3	48,9	47,7
χ^2 (p) *		2,136 (0,344)		2,268 (0,322)	
χ^2 (p) #		1,690 (0,194)		0,768 (0,381)	
<i>IL 12 RB1</i> (rs401502)	CC	33 (11,38)	23 (9,66)	41 (19,52)	35 (16,06)
	CG	122 (42,07)	105 (44,12)	94 (44,76)	107 (49,08)
	GG	135 (46,55)	110 (46,22)	75 (35,71)	76 (34,86)
	C	32,4	31,7	41,9	40,6
χ^2 (p) *		0,493 (0,781)		1,172 (0,557)	
χ^2 (p) #		0,030 (0,863)		0,102 (0,749)	
<i>IL 12 RB1</i> (rs3746190)	CC	118 (35,87)	80 (32,92)	59 (29,06)	54 (28,13)
	CT	154 (47,81)	117 (48,15)	99 (48,77)	87 (45,31)
	TT	57 (17,33)	46 (18,93)	45 (22,17)	51 (26,56)
	T	40,7	43,0	46,6	49,2
χ^2 (p) *		0,603 (0,781)		1,065 (0,587)	
χ^2 (p) #		0,505 (0,477)		0,461 (0,497)	
<i>IL 12 RB1</i> (rs12461312)	GG	96 (30,48)	74 (30,45)	46 (22,12)	64 (25,91)
	TG	155 (49,21)	124 (51,03)	105 (50,48)	107 (43,32)
	TT	64 (20,32)	45 (18,52)	57 (27,40)	76 (30,77)
	T	44,9	44,0	52,6	52,4
χ^2 (p) *		1,445 (0,485)		2,353 (0,308)	
χ^2 (p) #		0,982 (0,322)		0,000 (0,998)	
<i>STAT1</i> (rs2066797)	AA	184 (92,00)	192 (84,21)	116 (64,44)	116 (67,05)
	AG	16 (8,00)	35 (15,35)	47 (26,11)	45 (26,01)
	GG	0 (0)	1 (0,44)	17 (9,44)	12 (6,94)
	G	4,0	8,1	22,5	19,9
χ^2 (p) *		6,444 (0,040)		0,767 (0,681)	
χ^2 (p) #		5,521 (0,019)		0,545 (0,460)	
<i>IFN GR1</i> (rs2234711)	CC	47 (16,79)	27 (16,27)	19 (10,00)	16 (8,84)
	TC	147 (52,50)	71 (42,77)	85 (44,74)	64 (35,36)
	TT	86 (30,71)	68 (40,96)	86 (45,26)	101 (55,80)
	C	43,0	37,7	32,4	26,5
χ^2 (p) *		5,206 (0,074)		4,204 (0,122)	
χ^2 (p) #		2,281 (0,131)		2,774 (0,096)	
<i>IFN GR1</i> (rs7749390)	AA	73 (29,32)	82 (35,19)	77 (40,53)	63 (43,15)
	AG	122 (49,00)	110 (47,21)	91 (47,89)	64 (43,84)
	GG	54 (21,69)	41 (17,60)	22 (11,58)	19 (13,01)
	G	46,2	41,2	35,5	34,9
χ^2 (p) *		2,394 (0,302)		0,571 (0,752)	
χ^2 (p) #		2,230 (0,135)		0,006 (0,937)	

Примечание. χ^2 Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность; p — уровень значимости различий; * — при сравнении частот генотипов; # — при сравнении частот аллелей

Сравнение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов *IL12RB1*, *IFNGR1*, *IL12B* между выборками больных ТБ и контрольной группой не привело к выявлению ассоциации с заболеванием в обеих исследуемых этнических группах ($p > 0,05$; табл. 2).

Для полиморфного варианта rs2066797 гена *STAT1* у русских обнаружена ассоциация с ТБ при сравнении как частот генотипов, так и частот аллелей ($\chi^2 = 6,444$, $p = 0,040$; $\chi^2 = 5,521$, $p = 0,019$ соответственно). Частота аллеля А в группах больных и контроля составила 96 и 91,9% соответственно. Для данного гена рисковыми в отношении развития ТБ являются частый аллель А (OR = 2,12; 95% CI: 1,12–4,05; $p = 0,018$) и генотип АА (OR = 2,16; 95% CI: 1,11–4,22; $p = 0,014$). Величина OR для аллеля G составила 0,47 (95% CI: 0,25–0,89; $p = 0,019$), что свидетельствует о его протективной роли в отношении ТБ. Частота минорного аллеля G у русских, больных ТБ, составляла 4%, в контрольной группе он встречался в 2 раза чаще (8,1%), что согласуется с мировыми базами данных. По данным базы данных проекта «1000 геномов», частота минорного аллеля G у европеоидов, в среднем, составляет 6% (<http://www.1000genomes.org/>).

Продукт гена *STAT1* (OMIM 600555) играет ключевую роль в активации клеточного звена иммунитета. Активируясь в ответ на взаимодействие ИФН- γ и ИФН- α/β с рецепторами на поверхности клетки, он участвует в передаче сигнала внутри клетки и активации транскрипции генов иммунного ответа [2]. Учитывая двойственность рецепции (ИФН- γ и ИФН- α/β) пациенты с мутациями в гене *STAT1* чувствительны не только к микобактерийным, но и к вирусным инфекциям: помимо развития МПМЗ они склонны и к тяжёлым вирусным инфекциям (вирус простого герпеса-1, вирус Эпштейна–Барр), заканчивающимся летальным исходом [10]. В доступной литературе и базах данных не обнаружено информации о связи полиморфных вариантов гена *STAT1* с ТБ. Таким образом, ассоциация rs2066797 с ТБ выявлена впервые. Данный полиморфный вариант расположен в интроне 9 и его связь с заболеванием у русских, вероятнее всего, обусловлена неравновесием по сцеплению с другим, действительно причинным вариантом гена.

Заключение

В ходе проведённой работы у детей с тяжёлыми формами ТБ и осложнениями после БЦЖ-вакцинации не обнаружено редких мутаций шести исследованных генов (*IL12B*, *IL12RB1*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IKBK*), вызывающих развитие синдрома атипичных семейных микобактериозов.

При поиске ассоциаций с ТБ полиморфных вариантов генов *IL12RB1*, *IFNGR1* и *STAT1*, выявленных при секвенировании, впервые обнаружена связь rs2066797 гена *STAT1* с заболеванием. В связи с этим, особый интерес представляет дальнейшее изучение ассоциации

данного полиморфизма с ТБ в других этнических группах с высокой распространённостью ТБ. Обнаруженная ассоциация подтверждает значимую роль кодируемого геном белка в антимикобактерийном иммунитете.

В целом, выдвинутое предположение о вкладе мутации шести изученных генов в восприимчивость к ТБ не подтвердилось. Однако полученный результат не исключает возможного влияния на развитие ТБ других генов, ответственных за развитие синдрома атипичных семейных микобактериозов. В последние годы опубликованы данные об обнаружении ещё трёх генов, мутации которых вызывают развитие синдрома: *IRF8* — гена интерферонового регуляторного фактора 8, *ISG15* — гена интерферон-индуцированного протеина 15 и гена *CYBB*, кодирующего β -субъединицу цитохрома b_{558} [6, 7, 11]. Таким образом, необходимо продолжение данной работы, включая поиск мутаций в генах *IRF8*, *ISG15* и *CYBB* и их связи с развитием МПМЗ и подверженностью ТБ.

Список литературы

1. Вейр Б. Анализ генетических данных / Пер. с англ. — М.: Мир, 1995. — 400 с.
2. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н. Современные представления о JAK-STAT системе как новой сигнальной системе и её нарушениях при иммунной патологии. Часть I // Аллергология. — 2005. — №4. — С. 38–44.
3. Рудко А.А., Фрейдин М.Б., Пузырев В.П. Наследственная подверженность туберкулёзу // Молекулярная медицина. — 2011. — №3. — С. 3–10.
4. Alcais A., Fieschi C., Abel L., Casanova J.L. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases // J. Exp. Med. — 2005. — Vol. 202. — P. 1617–1621.
5. Al-Muhsen S., Casanova J.L. The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases // J. Allergy Clin. Immunol. — 2008. — Vol. 122. — P. 1043–1051.
6. Bogunovic D., Byun M., Durfee L. et al. Mycobacterial disease and impaired IFN- γ immunity in humans with inherited ISG15 deficiency // Science. — 2012. — Vol. 337. — P. 1684–1688.
7. Bustamante J., Picard C., Boisson-Dupuis S. et al. Genetic lesson learnt from X-linked Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2011. — Vol. 1246. — P. 92–101.
8. Dorman S.E., Holland S.M. Interferon- γ and interleukin-12 pathway defects and human disease // Cytokine Growth Factor Rev. — 2000. — №11. — P. 321–333.
9. Filipe-Santos O., Bustamante J., Haverkamp M.H. et al. X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production // J. Exp. Med. — 2006. — Vol. 203. — P. 1745–1759.
10. Fortin A., Abel L., Casanova J.L., Gros P. Host genetics of mycobacterial diseases and men: forward genetic studies of BCG-osis and tuberculosis // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. — 2007. — №8. — P. 163–192.
11. Hambleton S., Salem S., Bustamante J. et al. Mutation in IRF8 and human dendritic cell immunodeficiency // N. Eng. J. Med. — 2011. — Vol. 365. — P. 127–138.
12. Hamosh A., Scott A.F., Amberger J.S. et al. McKusick, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders // Nucl. Acids Res. — 2005. — Vol. 33. — D514–D517.

13. Moller M., de Wit E., Hoal E.G. Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 2009. — Vol. 2. — P. 1–24.

14. Ottenhoff T.H.M., Verreck F.A.W., Hoeve M.A., van de Vosse E. control of human host immunity to mycobacteria // Tuberculosis. — 2005. — Vol. 85. — P. 53–64.

15. Pearce N. What does the odds ratio estimate in a case-control study? // Int. J. Epidemiol. — 1993. — Vol. 26(6). — P. 1189–1192.

16. Salem S., Gros P. Genetic determinants of susceptibility to mycobacterial infections: IRF8, a new kid on the block // Adv. Exp. Med. Biol. — 2013. — Vol. 783. — P. 45–80.

Screening for mutations in genes causing familial atypical mycobacteriosis

Rudko A.A.¹, Garaeva A.F.¹, Bragina E.Iu.¹, Babushkina N.P.¹,
Kolokolova O.V.², Lipaenkova O.N.², Freidin M.B.¹

¹ — Research Institute for Medical Genetics of the Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences;
Nabereznaya r.Ushayki, 10, Tomsk, 634050, Russia; Tel.: +7-3822-51-22-28; Fax: +7-3822-51-37-44.
E-mail: valery.puzyrev@medgenetics.ru

² — Siberian State Medical University;
Moskovsky tr., 3, Tomsk, 634050, Russia; Tel.: +7-3822-53-23-04; Fax: +7-3822-53-33-09.
E-mail: office@ssmu.ru

The *IL12B*, *IL12RB1*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, and *IKBKG* genes responsible for the development of the syndrome of atypical familial mycobacteriosis (MIM 209950) were studied in two Siberian populations (Russians and Tuvinians). Twelve sites with most common mutation variants of the genes appeared to be monomorphic for «wild-type» allele. Also, direct sequencing did not reveal any mutations causing atypical familial mycobacteriosis; however, 15 previously established single nucleotide polymorphisms were identified. Using «case-control» analysis for the association of these polymorphisms with tuberculosis in the studied populations, an association between the rs2066797 variant of the *STAT1* gene and the disease was found for the first time ($p = 0,02$).

Key words: tuberculosis, polymorphism, association, familial atypical mycobacteriosis

Хроническое действие ионизирующего излучения вызывает увеличение содержания рибосомного повтора в составе циркулирующей ДНК плазмы крови*

Костюк С.В.¹, Ершова Е.С.¹, Конорова И.Л.², Вейко Н.Н.¹

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1; e-mail: mgnc@med-gen.ru

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение «центр неврологии» Российской академии медицинских наук, Москва

Однократное действие ионизирующего излучения (ИИ) на организм сопровождается увеличением концентрации циркулирующей внеклеточной ДНК (вкДНК) в плазме крови. В данном случае концентрация вкДНК может быть маркером гибели клеток организма. Однако хроническое воздействие ИИ на организм вызывает снижение общей концентрации вкДНК в плазме крови облучённых лиц. В этом случае общая концентрация вкДНК уже не может быть маркером уровня гибели клеток облучённого организма. Мы предположили, что пул циркулирующей вкДНК облучённых лиц содержит фрагменты ДНК, которые устойчивы к возникновению двойных разрывов и могут накапливаться в плазме крови. Было определено содержание GC-богатой последовательности транскрибируемой области рибосомного повтора (рДНК) в вкДНК 285 чел. Установлено, что хроническое действие на человека ИИ в малых дозах стимулирует увеличение содержания рДНК в составе циркулирующей вкДНК по сравнению с вкДНК необлучённых лиц. Таким образом, рДНК можно рекомендовать в качестве маркера хронических процессов в организме, при которых имеет место стабильное увеличение уровня гибели клеток.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, малые дозы ионизирующего излучения, гамма-нейтронное излучение, бета-излучение трития, рибосомный ген

Введение

Циркулирующую вкДНК рекомендуют в качестве одного из маркеров ряда заболеваний и физиологических состояний организма [12, 15, 16]. Во всех исследованиях, в которых анализировали концентрации вкДНК у облучённых людей и животных, было показано, что количество циркулирующей ДНК в кровотоке существенно возрастает при действии ИИ на организм в первые часы/дни после воздействия [9, 17, 18]. У лиц, которые по роду работы подвергаются хроническому действию ионизирующего излучения в небольших дозах, напротив, происходит снижение концентрации циркулирующей ДНК [6]. В этих условиях тотальная циркулирующая вкДНК плазмы крови уже не может рассматриваться в качестве маркера, который отражает реальный уровень гибели клеток в организме.

С другой стороны, вкДНК отличается от клеточной ДНК по нуклеотидному составу. Давно замечено, что вкДНК облучённого организма значительно обогащена GC-парами по сравнению с геномной ДНК, которая функционирует в клеточном ядре [16]. Мы предположили, что GC-богатая последовательность генома в составе вкДНК, устойчивая к фрагментации в присутствии эндонуклеаз, может служить маркером гибели клеток облучённого организма в условиях повышенной эндонуклеазной активности плазмы крови. Увеличение содержания такой последовательности в составе вкДНК могло бы потенциально указы-

вать на хронический процесс, который сопровождается повышенным уровнем гибели клеток. В качестве такой последовательности была выбрана транскрибируемая область рибосомного повтора человека (рДНК). Участки транскрибируемой области рДНК содержат от 60 до 85% GC-пар, что позволяет предположить высокую температуру плавления этой структуры даже при наличии множественных односторонних разрывов в двойной спирали ДНК.

Для того, чтобы доказать, что рДНК может рассматриваться в качестве потенциального биомаркера гибели клеток в облучённом организме, мы, *во-первых*, определили устойчивость фрагментов рДНК к действию эндонуклеаз плазмы крови; *во-вторых*, выбрали наиболее приемлемый метод, позволяющий анализировать содержание повреждённой повторяющейся последовательности в составе вкДНК, и, *в-третьих*, определили в составе вкДНК содержание рДНК в двух выборках людей, которые работали на протяжении длительного времени с источниками внешнего γ -нейтронного и внутреннего β -излучения трития, и в выборке людей, проживающих в той же местности, но не работающих с источниками ИИ. Мы обнаружили значительное увеличение содержания рДНК в вкДНК плазмы крови облучённых людей. Полученные данные позволяют рассматривать рДНК как дополнительный маркер радиочувствительности человека к хроническому действию небольших доз ИИ.

* Работа выполнена в рамках Государственного контракта №14.512.11.0090 (27 июня 2013 г.) Министерства образования и науки РФ.

Материалы и методы

Описание обследованных когорт

Для обследования были отобраны 2 когорты из числа лиц, подвергающихся профессиональному хроническому воздействию γ -нейтронного ионизирующего излучения (ГН-когорта, 88 чел.) и β -излучения трития (Т-когорта, 88 чел.). В контрольную когорту вошли лица, не имевшие контакта с ионизирующим облучением (К-когорта, 109 чел.). Все 3 когорты состояли из лиц мужского пола, проживающих в одинаковых экологических и сопоставимых социальных условиях вблизи предприятия атомной промышленности. Общий объём выборки — 285 чел. Средний возраст обследованных — $48,46 \pm 16,28$ года в диапазоне от 17 до 86 лет. Кроме возраста на момент обследования, учитывались профессиональная индивидуальная эквивалентная доза, накопленная к моменту обследования, и суммарная доза от рентгенодиагностических процедур (RD-доза) (для контроля — только доза от рентгенодиагностических процедур; эта доза учтена, чтобы не сбрасывать со счетов возможные эффекты диагностического облучения). От каждого донора крови было получено письменное согласие на забор крови.

Опыты с крысами

Эксперименты проводили в зимний период в соответствии с международными правилами Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Животные содержались при естественном освещении и неограниченном доступе к корму и воде. Двенадцати крысам Вистар, самцам массой 320—380 г, находившимся под общей анестезией (Pentobarbital sodium, 45 мг/кг внутривенно), внутривенно вводили раствор гомологичной геномной ДНК ($n = 6$) или линейаризованной плазмиды ($n = 6$) в изотоническом физиологическом растворе (10^{-4} г/мл) со скоростью 0,06 мл/мин через катетер, введённый в бедренную вену. Дозу рассчитывали для каждой крысы индивидуально до получения конечной концентрации 2×10^{-6} г/мл крови (объём вводимого раствора 0,15—0,20 мл), в зависимости от массы тела. Плазма имела длину 11,3 т.п.н. и содержала фрагмент транскрибируемой области рДНК длиной 5,8 т.п.н. в векторе pBR322 (pHRGEE-B). До и через 0,25, 0,5 и 24 ч после инъекции у животных через катетер, введённый в бедренную артерию, брали пробы крови по 0,3 мл, отделяли плазму центрифугированием (450g), замораживали и хранили при температуре -70°C вплоть до выделения ДНК. Электрофорез фрагментов вкДНК проводили в 1,5%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

Выделение вкДНК из плазмы крови

К 800 мкл плазмы крови, очищенной от клеток центрифугированием, добавляли: 1%-ный лаурилсаркозинат натрия (Sigma, США), 0,02 моль/л ЭДТА («ПанЭко», Россия) и 75 мкг/мл РНКазы А (Sigma, США). Далее образец инку-

бировали при 37°C в течение 45 мин, после чего в неё вносили протеиназу К (200 мкг/мл, Sigma, США) и оставляли на 24 ч при 37°C для окончательного гидролиза белков. Далее дважды проводили экстракцию ДНК насыщенным раствором фенола и затем осаждали её двумя объёмами этанола в присутствии насыщенного раствора (2 моль/л) ацетата аммония. Осадок 2 раза промывали 75%-ным этанолом, высушивали и растворяли в стерильной деионизованной воде. Концентрацию ДНК измеряли с использованием ДНК-связывающегося красителя Quant-iT TMRiboGreen RNA reagent (Molecular Biology, США), на люминесцентном спектрометре LS 55 (Perkin Elmer, Англия).

Образцы окисленной ДНК

и ДНК культивируемых фибробластов кожи человека

Образцы окисленной геномной ДНК человека были получены ранее [13] путём реакции ДНК с пероксидом водорода или путём фотореакции ДНК с метиленовым синим. Уровень маркера окисления 8-охо-dG в этих образцах был определён в предыдущем нашем исследовании методом ESI-MS/MS на приборе AB SCIEX 3200 Qtrap machine [13]. Образцы геномной ДНК культивируемых фибробластов кожи были любезно предоставлены Е.М. Малиновской, эта культура очень подробно охарактеризована ранее [7].

Нерадиоактивная дот-гибридизация

Для определения рибосомного повтора использовали зонд pHRGRR-28S (фрагмент гена 28S рРНК длиной 2,4 т.п.н.), клонированный в вектор pBR322 [2]. Биотинирование ДНК-зондов осуществляли с использованием фотореагента, как подробно описано ранее [2]. Методика количественной нерадиоактивной гибридизации подробно описана там же [2]. Денатурированные пробы ДНК наносили на фильтр (мембрана ExtraC). Для каждой пробы наносили 5—10 параллельных точек. На этот же фильтр наносили стандартные образцы геномной ДНК с известным содержанием повторов для построения калибровочной зависимости сигнала от количества повтора в пробе. Гибридизацию проводили 16 ч, при 42°C . Биотин выявляли с использованием конъюгата стрептавидина со щелочной фосфатазой. В качестве субстратов для фермента использовали NBT и BCIP. Реакцию проводили в темноте при 37°C , контролируя визуальное появление окрашенных фиолетовых пятен. Высушенный фильтр сканировали. Для количественного анализа результата гибридизации использовали программу (Image6, МГНЦ РАМН). Программа определяет местонахождение пятна, близлежащий фоновый сигнал и площадь и интегральную интенсивность пятна. Сигналы для одного образца усредняются, приводятся значение среднего и стандартная ошибка. Концентрация повтора в конкретном образце рассчитывается по уравнению калибровочной прямой. Все концентрации для рДНК приводятся в расчёте на всю транскрибируемую область рибосомного повтора длиной 13 314 п.н.

ПЦР в реальном времени

Для измерения количества рДНК использовали метод ПЦР в реальном времени, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), прибор Step One Plus instrument (Applied Biosystems). Количество рДНК анализировали в нескольких независимых опытах с помощью программного обеспечения прибора; ошибка метода составляла 2%. В качестве гена внутреннего стандарта использовали *TBP* (TATAA-box binding protein). Используемые праймеры («Синтол», РФ):

- рДНК (F5'-GGACATCTAAGGGCATCACAGACC-3';
- R: 5'-TGACTCAACACGGGAAACCTCAC-3');;
- TBP (F: GCCCGAAACGCCGAATAT,
- R: CCGTGGTTCGTGGCTCTCT).

Статистические методы

Применили методы непараметрической статистики Манна—Уитни и Колмогорова—Смирнова. Значения $p < 0,05$ говорили о достоверности различия между анализируемыми выборками.

Для анализа использовали программу StatPlus2007 (<http://www.analystsoft.com>).

Результаты*Устойчивость рДНК в составе вкДНК к фрагментации*

Как было показано ранее, концентрация вкДНК в плазме крови облучённых людей значительно снижена [6]. Таким образом, чтобы использовать фрагменты вкДНК в качестве маркера гибели клеток облучённого организма необходимо определять не общую концентрацию вкДНК, а содержание в вкДНК последователь-

ностей, которые обладают повышенной устойчивостью к возникновению двунитевых разрывов при накоплении одонитевых разрывов, вносимых эндонуклеазами. В этом случае, несмотря на одонитевые разрывы, фрагмент будет циркулировать в крови в виде высокомолекулярной структуры, которая труднее выводится из кровотока. Поскольку энергия GC-пары выше, чем AT-пары, то устойчивая к фрагментации последовательность должна быть GC-богатой. Желательно также, чтобы маркерный фрагмент был представлен в геноме многими копиями, что значительно облегчает количественный анализ. Этим условиям удовлетворяет рибосомный повтор человека, который локализован в геноме на пяти парах акроцентрических хромосом в виде tandemных повторов. Геном человека содержит 300—700 копий рибосомного повтора (среднее 420 копий на диплоидный геном) [2]. Общая длина рибосомного повтора — 42 999 п.н., при этом он состоит из двух частей — транскрибируемой области длиной 13 314 п.н., содержащей гены 18S, 5,8S, 28S рРНК (rDNA), и нетранскрибируемого спейсера, который не отличается высоким содержанием GC-пар. Различные участки транскрибируемой области рибосомного повтора содержат от 60 до 85% GC-пар.

Мы определили уровень фрагментации рДНК в составе вкДНК методом нерадиоактивной саузерн-лот-гибридизации. В качестве зонда на рДНК применили биотинилированную плазмиду pHRGRR-28S, содержащую вставку длиной 2413 т.п.н. — фрагмент гена 28S рРНК [2]. На рис. 1А приводятся данные блот-гибридизации циркулирующей вкДНК, выделенной из плазмы крови больного инсультом. Даже при высоком уровне фрагментации тотальной циркулирующей ДНК, рибосомный повтор представлен длинными фрагментами (10—15 т.п.н.).

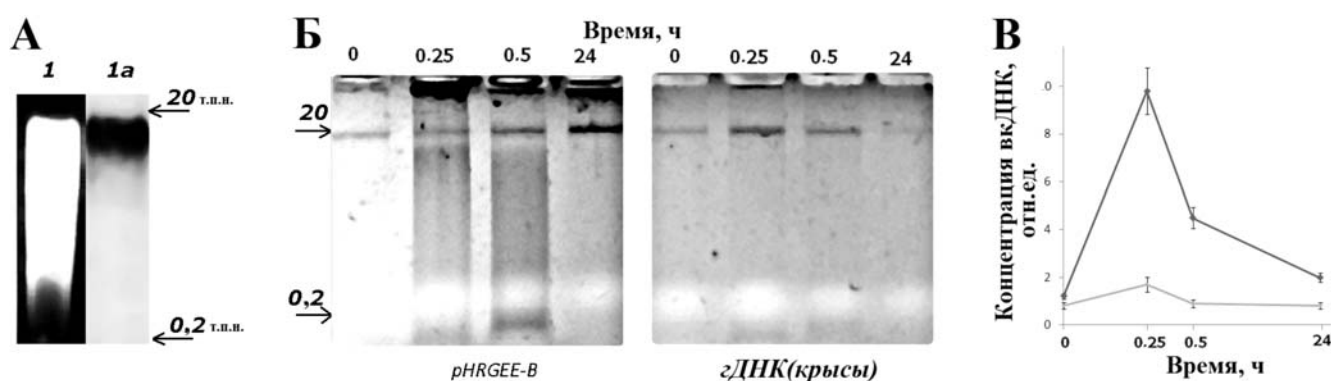


Рис. 1. Доказательство устойчивости рДНК к двунитевым разрывам при накоплении одонитевых разрывов в ДНК:

А — из плазмы крови больного инсультом выделили циркулирующую вкДНК и анализировали методом электрофореза (дорожка 1) и методом блот-гибридизации с зондом на 28SpДНК (дорожка 1а);

Б — раствор ДНК плазмиды, содержащей фрагмент рДНК (pHRGEE-B), или раствор геномной ДНК крысы, вводили в вену крысам, отбирали небольшие аликвоты крови и анализировали размер фрагментов вкДНК. Цифрами сверху указано время от момента введения ДНК в кровоток крысы;

В — изменение концентрации вкДНК у крыс, которым вводили ДНК крысы (серая линия) или плазмидур HRGEE-B (чёрная линия). Для каждого образца ДНК приводятся средние значения концентраций для шести подопытных крыс.

Мы проверили устойчивость GC-богатой плазмиды, содержащей вставку рДНК, в опытах на крысах, которые обладают повышенной активностью ДНКазы 1 в плазме крови по сравнению с плазмой человека, достигающей значений 20—30 ед. акт./мл [3]. Крысам вводили в кровотоки GC-богатую плазмиду длиной 11,3 т.п.н. (pHRGEE-B), которая содержала фрагмент транскрибируемой области рДНК длиной 5,8 т.п.н. в векторе pBR322. Другим крысам вводили геномную ДНК крысы примерно той же длины и в том же количестве. Далее отбирали аликвоты плазмы крови и определяли концентрацию вкДНК и размер её фрагментов (рис. 2Б,В). Мы обнаружили, что геномная ДНК достаточно быстро гидролизует до коротких фрагментов, при этом в крови детектируются и длинные фрагменты, защищённые от фрагментации. Плазида, содержащая рДНК, фрагментируется медленнее. Концентрация вкДНК у крыс, которым вводили плазмиду, была значительно выше, чем у крыс, которым ввели геномную ДНК в той же концентрации. В условиях высокой нуклеазной активности крови крыс GC-богатые фрагменты ДНК проявляют более высокую устойчивость к фрагментации, чем фрагменты с более низким содержанием GC-пар.

Таким образом, было показано, что рДНК устойчива к фрагментации на низкомолекулярные фрагменты. Эта устойчивость объясняется, вероятнее всего, устойчивостью двойной спирали рДНК к фрагментации при накоплении однонитевых разрывов в цепях ДНК. Одной из причин такой устойчивости может быть высокое содержание GC-пар, которые обеспечивают конкатемерным структурам ДНК повышенную температуру плавления двойной спирали.

Выбор метода количественного анализа содержания рДНК в вкДНК плазмы крови облучённых лиц

В настоящее время основным методом анализа содержания в геноме определённых последовательностей является метод ПЦР в реальном времени. Однако при анализе внеклеточной ДНК, особенно выделенной из плазмы с высокой эндонуклеазной активностью, возникают проблемы. Метод ПЦР чувствителен к однонитевым разрывам ДНК и к другим повреждениям матрицы ДНК, например таким, как окислительная модификация оснований и сшивки с белками. Ранее мы обнаружили, что при одинаковой концентрации вкДНК в культуральной среде необлучённых и облучённых клеток определяемые концентрации вкДНК могут различаться в несколько раз [10]. Выбор внутреннего стандарта для проведения ПЦР-анализа также проблематичен. В отличие от геномной ДНК, содержание даже уникальных последовательностей в составе вкДНК не является постоянным и может изменяться в разных образцах вкДНК [14]. По-видимому, перечисленные факторы служат причиной того, что концентрации вкДНК, определяемые методом ПЦР, как минимум, на порядок ниже, чем концентрации, определяемые другими методами [12].

С целью оценки применимости метода ПЦР для анализа вкДНК с повышенным уровнем окислительной модификации мы проанализировали содержание рДНК в модельных образцах окисленной ДНК. На рис. 2А приводятся данные ПЦР-анализа образцов ДНК, содержащих различные количества маркера окисления, которые соответствуют содержанию 8-oxodG в образцах

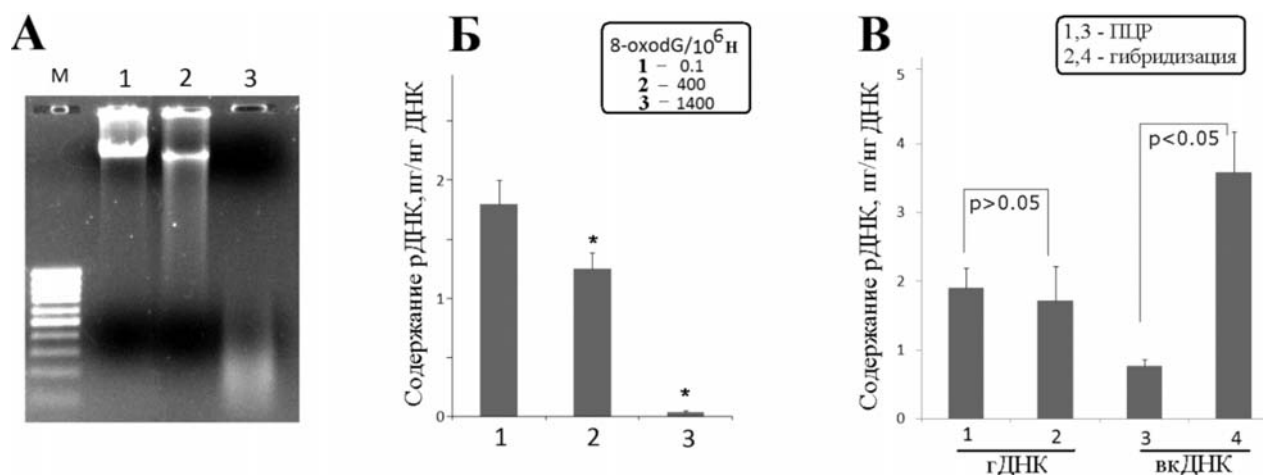


Рис. 2. Сравнение двух методов количественного анализа содержания рДНК в повреждённых образцах ДНК:

А — длины фрагментов модельных образцов гДНК. Контрольный образец (дорожка 1), ДНК окислена метиленовым синим (дорожка 2) и пероксидом водорода при облучении 321 нм (дорожка 3);

Б — определение содержания рДНК (фрагмент 270 п.н.) в составе модельных образцов 1—3 методом реал-ПЦР. В рамке приводится содержание в образцах маркера окисления 8-oxodG, определённое ранее методом масс-спектрометрии [26, 37];

В — определение содержания рДНК в геномной ДНК и в вкДНК 10 чел. из ГН-когорты. Приводятся средние значения для 10 образцов и ошибка среднего. В рамке указан метод.

* — p < 0,05 вероятность различия с контролем (образец 1).

вкДНК при патологии [13]. Высокое содержание маркера окисления в этих образцах ДНК коррелировало с высоким уровнем фрагментации ДНК, который был оценен электрофоретически (рис. 2А). Увеличение содержания маркера окисления сопровождалось значительным снижением определяемого количества рДНК (рис. 2Б). С похожей проблемой мы столкнулись при ПЦР-анализе содержания рДНК в клеточной ДНК трёх линий старых фибробластов, которые перестали делиться после 60-го пассажа культуры [7]. При одинаковой концентрации ДНК в пробах определяемое содержание рДНК в ДНК старых клеток было на порядок ниже, чем в ДНК молодых клеток, что, по-видимому, связано с повреждением рДНК в старых клетках. Таким образом, метод ПЦР в реальном времени даёт заниженные результаты при анализе повреждённой ДНК с высоким уровнем окислительной модификации.

До изобретения метода ПЦР количественный анализ содержания последовательностей генома проводили методом дот- или блот-гибридизации ДНК-мишени, иммобилизированной на мембране, с ДНК-зондом. Были разработаны варианты метода, которые предполагали использование нерадиоактивно меченных ДНК-зондов. Метод нерадиоактивной гибридинизации на мембранах мало подходит для анализа уникальных последовательностей генома вследствие более низкой чувствительности, чем ПЦР. Но при анализе повторов, таких, как рибосомный повтор, этот метод даёт хорошо воспроизводимые результаты [2]. Поскольку метод гибридинизации не предполагает применения фермента, то он гораздо менее чувствителен к окислительным повреждениям ДНК и к одонитевым разрывам ДНК. Современные мембраны удерживают фрагменты ДНК длиной от 30 нуклеотидов, а использование длинного зонда позволяет нивелировать наличие окисленных оснований в различных участках анализируемого фрагмента ДНК.

Ранее мы разработали специально для рДНК схему количественной гибридинизации с использованием биотинированных ДНК-зондов и нерадиоактивной детекции биотина [2]. Мы установили, что на уровень сигнала степень фрагментации ДНК мишени в широком диапазоне длин фрагментов практически не влияет, в отличие от метода ПЦР. Проводятся гибридинизация с биотинированным зондом рHRGRR-28S и нерадиоактивная детекция остатка биотина с применением конъюгата стрептавидина с щелочной фосфатазой. Для количественного анализа результата гибридинизации использовали программу, которая автоматически находит пятно, образуемое при гидролизе субстрата, определяет интегральную интенсивность сигнала, анализирует и учитывает возможный фон. Количество рДНК в образце определяли с использованием калибровочной зависимости.

На рис. 2В приводится сравнение двух методов (ПЦР и гибридинизация) в опыте по определению среднего содержания рДНК в образцах циркулирующей вкДНК, которую выделили из плазмы крови 10 чел., облучённых

γ-нейтронным излучением. Сравнение содержания рДНК дало два разнонаправленных результата. Согласно методу ПЦР, среднее содержание рДНК снижалось в вкДНК по сравнению с клеточной ДНК тех же образцов крови. Согласно методу гибридинизации, содержание рДНК в образцах возрастало по сравнению с геномной ДНК. Оба метода дали одинаковые значения содержания рДНК в образцах клеточной ДНК этих же лиц (рис. 2В, столбики 1 и 2). Данные, представленные на рис. 2, говорят о том, что при исследовании неповреждённой геномной ДНК оба метода дают примерно одинаковый результат. Однако при исследовании значительно повреждённых образцов вкДНК облучённых людей метод гибридинизации даёт большие значения содержания рДНК, чем метод количественной ПЦР.

Анализ содержания рДНК в циркулирующей вкДНК плазмы крови облучённых и необлучённых лиц

Мы исследовали 2 когорты людей подвергающихся профессиональному хроническому воздействию γ-нейтронного излучения (ГН-когорта, 88 чел.) и β-излучения трития (Т-когорта, 88 чел.). В контрольную когорту (К-когорта, 109 чел.) вошли лица, не имевшие контакта с ионизирующим излучением по роду деятельности, но получившие некоторую дозу радиации во время диагностических медицинских процедур (RD-доза). Все 3 когорты состояли из лиц мужского пола, проживающих в одинаковых экологических и сопоставимых социальных условиях. Выборки облучённых лиц ГН- и Т-когорт включали лиц, которые работали с источниками радиации на момент взятия крови, и лиц, которые прекратили работать более чем за год до того, как им провели анализ вкДНК.

Содержание рДНК в образцах циркулирующей ДНК плазмы крови 285 чел. и в образцах ДНК лейкоцитов тех же образцов крови были определены методом количественной нерадиоактивной дот-гибридизации. На рис. 3А приведены распределения в изученных выборках значений содержания рДНК в клеточной ДНК лейкоцитов (гДНК, кривые 1—3) и в циркулирующей вкДНК плазмы крови (кривые 1а—3а). В группе лиц, которые не работают с источниками радиации, содержание рДНК в гДНК варьировало от 0,82 до 2,99 пг/нг общей ДНК (среднее $1,72 \pm 0,50$ пг/нг), в группе ГН содержание рДНК варьировало от 0,83 до 2,83 пг/нг (среднее $1,71 \pm 0,45$ пг/нг) и в группе Т — от 1 до 3,98 пг/нг (среднее $1,76 \pm 0,52$ пг/нг). Все распределения не отличались от нормального и с высокой вероятностью не различались между собой ($p > 0,7$, критерий Стьюдента). Эти распределения также не отличались от полученного ранее распределения содержания рДНК в геномной ДНК жителей другого района РФ [25, 32].

Распределения содержания рДНК в вкДНК в трёх группах отличались от нормальных распределений, значительно отличались от соответствующих распределений содержания рДНК в геномной ДНК (статистика Колмо-

горова—Смирнова, $\alpha < 10^{-10}$) и различались между собой (рис. 3А, таблица на графике). В контрольной группе лиц содержание рДНК в циркулирующей вкДНК варьировало от 0,7 до 14 пг/нг общей ДНК (медиана 2,9 пг/нг), в группе ГН содержание рДНК варьировало от 0,5 до 76 пг/нг (медиана 3,2 пг/нг) и в группе Т — от 0,3 до 400 пг/нг (медиана 6,5 пг/нг). В выборках облучённых лиц ГН и Т две трети образцов вкДНК содержали значительно большие количества рДНК на единицу веса вкДНК, чем образцы вкДНК необлучённых лиц.

Поскольку содержание рДНК в вкДНК зависит, среди прочих причин, и от содержания рДНК в геноме, которое варьирует, то мы проанализировали также отношение содержания рДНК в вкДНК и в геномной ДНК (коэффициент обогащения вкДНК рибосомным повтором, R), рис. 3Б. В контрольной группе коэффициент обогащения варьирует от 0,3 до 9 (медиана 1,9), в группе ГН — от 0,4 до 36 (медиана 2,2) и в группе Т — от 0,1 до 140 (медиана 3,7). Соответственно у 7, 9 и 18% образцов вкДНК в группах К, ГН и Т содержание рДНК в вкДНК ниже, чем в геномной ДНК того же образца крови с учётом погрешности измерений. В остальных образцах содержание внеклеточной рДНК повышено по сравнению с клеточной рДНК. Снижение содержания рДНК в вкДНК ниже геномного уровня может быть объяснено двумя причинами: сильным повреждением ДНК, вследствие чего ухудшается гибридизация вкДНК по сравнению с тем же количеством клеточной ДНК (рис. 2) или изначально сниженным уровнем выхода рДНК из апоптотических ядер по сравнению с другими последовательностями генома. Сниженный выход рДНК из апоптотических ядер может быть связан и с описанным ранее свойством рДНК: проявлять устойчивость к возникновению двунитевых разрывов при накоплении одностебельных, вследствие чего рДНК присутствует в апоптотической клетке в виде длинных фрагментов (рис. 1).

Значимой корреляции между возрастом или суммарной дозой и содержанием рДНК в вкДНК для всех исследуемых групп не обнаружено ($\alpha > 0,1$). Выборки были разбиты на 2 подгруппы, в которые вошли люди младше и старше 65 лет или лица, получившие дозы радиации меньше (дозы, сравнимые с RD для контрольной когорты) или больше 4,5 бэр. Между этими подгруппами в составе одной и той же выборки также не было обнаружено статистически значимых различий между распределениями содержания рДНК в вкДНК ($\alpha > 0,1$).

Выборки облучённых лиц ГН- и Т-коhort включали людей, которые работали с источниками радиации на момент взятия крови, и людей, которые прекратили работать более чем за год до того, как им провели анализ вкДНК. То есть, мы имели возможность оценить, каким образом изменяется содержание рДНК спустя год и более после прекращения работы с источниками ИИ. Активно работающие с источниками радиации люди в выборке ГН составляли 62,4%, в выборке Т — 60,5%. Между этими подгруппами в составе одной и той же выборки также не было обнаружено статистически значимых различий между распределениями содержания рДНК в вкДНК ($\alpha > 0,1$).

Зависимость содержания рДНК от концентрации вкДНК

Мы проанализировали данные о содержании повторов в составе вкДНК в связи с ранее полученными значениями концентраций вкДНК тех же выборок. Такой анализ позволяет ещё больше прояснить картину формирования особых свойств циркулирующей ДНК облучённого человека, которые значительно отличаются от клеточной ДНК и являются причиной выраженной биологической активности циркулирующей ДНК.

На рис. 3В приводятся зависимости коэффициента обогащения R от концентрации циркулирующей ДНК

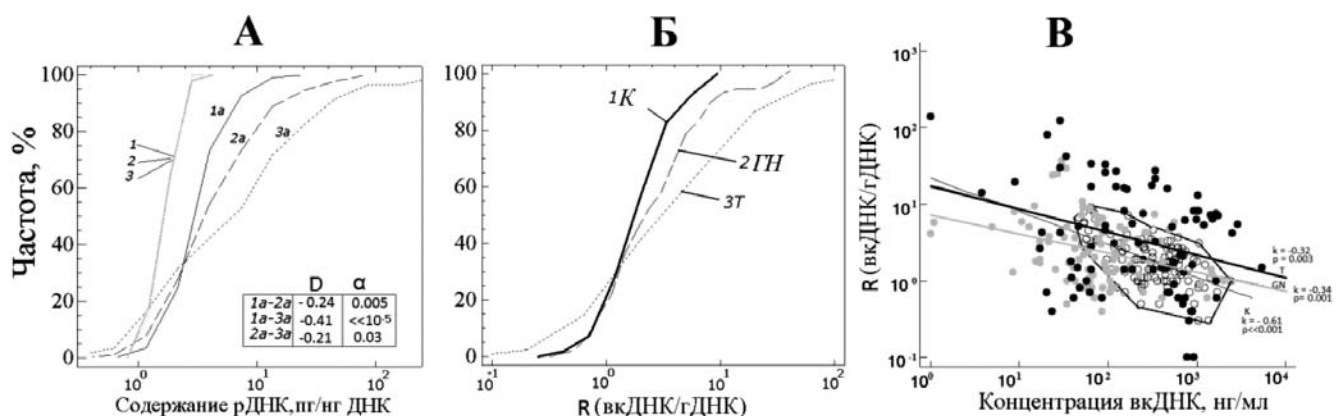


Рис. 3. Содержание рДНК в геноме и в составе циркулирующей ДНК плазмы крови:

А — распределение содержания рДНК в составе клеточной ДНК (кривые 1—3) и циркулирующей ДНК (кривые 1а—3а) для лиц трёх исследуемых когорт К(1), ГН (2) и Т (3). Распределения сравнили по методу Колмогорова—Смирнова (таблица в нижнем правом углу);

Б — распределение коэффициента обогащения R (отношение содержания рДНК в вкДНК и в геноме);

В — зависимость коэффициента обогащения R от концентрации циркулирующей ДНК.

Обозначения: К-выборка — белые кружки; ГН-выборка — серые; Т-выборка — чёрные. Приводятся данные линейной регрессии.

плазмы облучённых и необлучённых лиц. В контрольной группе и в группах облучённых лиц мы обнаружили отрицательную корреляцию между логарифмами концентраций циркулирующей вкДНК в плазме и степенью её обогащения рибосомным повтором, которая была наиболее значима в контрольной группе ($k = -0,61$; $p < 0,001$). Таким образом, в группе необлучённых лиц при уменьшении концентрации вкДНК хорошо выражен процесс изменения содержания GC-богатой последовательности.

Обсуждение

В данной работе мы исследовали изменение содержания в составе циркулирующей вкДНК плазмы крови облучённых и необлучённых людей GC-богатой последовательности генома. Основным источником вкДНК в организме являются гибнущие клетки. Ионизирующее излучение напрямую повреждает клеточную ДНК и вызывает увеличение уровня активных форм кислорода в клетках, что приводит к дополнительному повреждению ДНК и гибели части клеток. ДНК клеток, погибших в результате некроза или апоптоза, фрагментируется эндонуклеазами клеток и может диффундировать из погибших клеток в межклеточную среду. В качестве маркёрного повтора мы выбрали рДНК. В данной работе мы показали, что рДНК устойчива к фрагментации и циркулирует в виде высокомолекулярной структуры. В результате в плазме крови облучённых лиц, как правило, на фоне снижения общей концентрации вкДНК накапливаются фрагменты рДНК.

По-видимому, увеличенное содержание рДНК в циркулирующей вкДНК крови является маркёром любого хронического процесса, который сопровождается увеличенной гибелью клеток. Хронический процесс может быть вызван как внешним воздействием (ИИ), так и патологией. Например, ранее было показано, что при хроническом течении ишемической болезни сердца [1, 8], а также при хроническом ревматоидном артрите [4] в циркулирующей ДНК больных также значительно увеличивается содержание рДНК на фоне снижения общей концентрации вкДНК. Следует отметить, что накопление в циркулирующей ДНК GC-богатых фрагментов генома может значительно изменять её биологическую активность. В последние годы показано, что вкДНК среды культивирования облучённых клеток обладает биологической активностью [11]. Многочисленные модельные исследования на клеточных культурах, в среду культивирования которых вводили экзогенную ДНК с различным GC-составом или с различной степенью окисления оснований подтверждают выраженную биологическую активность такой ДНК. GC-богатые вкДНК взаимодействуют с рецепторами TLR9, стимулируя активацию фактора транскрипции NF- κ B [11]. В частности, GC-богатые фрагменты вкДНК больных сердечно-сосудистой патологией и модельный фрагмент

рДНК человека вызывали снижение частоты сокращений культивируемых кардиомиоцитов крысы, в то время как модельный AT-богатый фрагмент SatIII вызывал увеличение частоты сокращений кардиомиоцитов [8]. GC-богатые фрагменты вкДНК больных вызывают снижение количества окиси азота, которое продуцируется эндотелиальными клетками, что может влиять на артериальное давление [5]. Накопление GC-ДНК в составе вкДНК, очевидно, должно коррелировать с увеличением содержания продукта окислительной модификации — 8-охо-dG. Окисленные фрагменты ДНК, содержащие 8-охо-dG, вызывают в клетках повышение уровня активных форм кислорода, разрывы ДНК и адаптивный ответ, направленный на выживание клеток с повреждённой ДНК. Циркулирующая ДНК облучённого организма может являться одним из факторов, которые влияют на функционирование клеток организма на протяжении длительного времени даже после прекращения действия облучения [11].

Список литературы

1. Вейко Н.Н., Булычева Н.В., Рогинко О.А. и др. Фрагменты транскрибируемой области рибосомного повтора в составе внеклеточной ДНК-маркёр гибели клеток организма // Биомедицинская химия. — 2008. — Т. 54, №1. — С. 78—93.
2. Вейко Н.Н., Еголина Н.А., Радзивил Г.Г. и др. Количественное определение повторяющихся последовательностей в геномной ДНК человека // Молекулярная биология. — 2003. — Т. 37, №3. — С. 409—419.
3. Вейко Н.Н., Конорова И.Л., Неверова М.Е. и др. Влияние CpG-богатых фрагментов ДНК на формирование гипертензии у спонтанно-гипертензивных крыс SHR // Биомедицинская химия. — 2010. — Т. 56, №6. — С. 686—699.
4. Вейко Н.Н., Шубаева И.О., Иванова С.М. и др. ДНК сыворотки больных ревматоидным артритом значительно обогащена фрагментами рибосомных повторов, содержащих иммуностимулирующие CpG-мотивы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2006. — Т. 142, №9. — С. 282—285.
5. Ефремова Л.В., Алексеева А.Ю., Конькова М.С. и др. Внеклеточная ДНК влияет на количество NO в эндотелиальных клетках человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2010. — Т. 149, №2. — С. 156—160.
6. Костюк С.В., Замулаева И.А., Агапова Р.К. и др. Изменение свойств внеклеточной ДНК периферической крови и частоты TCR-мутантных клеток при действии на организм человека ионизирующей радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2008. — Т. 48, №1. — С. 5—13.
7. Малиновская Е.М., Смирнова Т.Д., Еголина Н.А. и др. Изменения комплекса рибосомных генов при старении // Медицинская генетика. — 2008. — Т. 7, №2. — С. 10—16.
8. Bulicheva N., Fidelina O., Mkrtumova N. et al. Effect of cell-free DNA of patients with cardiomyopathy and rDNA on the frequency of contraction of electrically paced neonatal rat ventricular myocytes in culture // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2008. — Vol. 1137. — P. 273—277.
9. Cheng C., Omura-Minamisawa M., Kang Y. et al. Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients

during radiation therapy // *Cancer Sci.* — 2009. — Vol. 100. — P. 303–309.

10. Ermakov A., Konkova M., Kostyuk S. et al. An extracellular DNA mediated bystander effect produced from low dose irradiated endothelial cells // *Mutat. Res.* — 2011. — Vol. 712. — P. 1–10.

11. Ermakov A., Konkova M., Kostyuk S. et al. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells // *Oxid. Med. Cell Longev.* — 2013. — 649747.

12. Gahan P., Stroun M. The biology of circulating nucleic acids in plasma and serum // *Extracellular Nucleic Acids* / Rykova E.Y., Kikuchi Y. (eds.). In Series «Nucleic Acids and Molecular Biology». — Berlin: Springer, 2010.

13. Kostyuk S., Tabakov V., Chestkov V. et al. Oxidized DNA induces an adaptive response in human fibroblasts // *Mutat. Res.* — 2013. — Vol. 747–748. — P. 6–18.

14. Puszyk W., Crea F., Old R. Unequal representation of different unique genomic DNA sequences in the cell-free plasma DNA of individual donors // *Clin. Biochem.* — 2009. — Vol. 42. — P. 736–738.

15. Swarup V., Rajeswari M. Circulating (cell-free) nucleic acids — a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases // *FEBS Lett.* — 2007. — Vol. 581. — P. 795–799.

16. van der Vaart M., Pretorius P. Circulating DNA: its origin and fluctuation // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2008. — Vol. 1137. — P. 18–26.

17. Vasilyeva I. Low-molecular-weight DNA in blood plasma as an index of the influence of ionizing radiation // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2001. — Vol. 945. — P. 221–228.

18. Vladimirov V., Belokhvostov A., Sherlina S. et al. Extracellular DNA level in the blood of irradiated rats // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1992. — Vol. 62. — P. 667–671.

Chronic exposure to ionizing radiation results in an increase of ribosomal repeat fraction in the total plasma cell-free DNA

Kostyuk S.V.¹, Ershova E.S.¹, Konorova I.L.², Veiko N.N.¹

¹ — Federal State Budgetary Institution Research Centre for Medical Genetics of the Russian Academy of Medical Sciences, Moskvorechie st., 1, Moscow, 115478, Russia; e-mail: mgnc@med-gen.ru

² — Federal State Budgetary Institution «Scientific Center of Neurology» of the Russian Academy of Medical Sciences

A single impact of ionizing radiation (IR) *in vivo* is accompanied by an increase in the circulating cell-free DNA (cfDNA) level in blood plasma. In this case, cfDNA concentration can be a marker of cell death. However, chronic exposure to IR *in vivo* results in reduced total level of cfDNA in blood plasma of the irradiated subjects. In that case, the total cfDNA concentration can not be used as a marker of cell death intensity in the irradiated body. We have suggested that the pool of circulating cfDNA in exposed individuals contains DNA fragments, which are resistant to double breaks in the DNA and can therefore accumulate in plasma. The contents of a fraction of the GC-rich sequence within the transcribed region of human ribosomal repeat (rDNA) in cfDNA of 285 subjects were determined. Chronic exposure to low-dose IR was found to stimulate an increase of the rDNA fraction of the total circulating cfDNA as compared with cfDNA from unexposed subjects. Thus, rDNA can be recommended as a marker of chronic pathological processes in the body, leading to a stable increase of cell death (apoptosis) rate.

Key words: cell-free DNA, low-dose irradiation, gamma-neutron radiation, tritium beta-radiation, ribosomal gene, apoptosis

Клинико-молекулярно-генетическое исследование нейрофиброматоза 2 типа*

Васильева Т.А.¹, Бессонова Л.А.¹, Шиманский В.Н.², Зинченко Р.А.¹, Козлова В.М.³, Любченко Л.Н.³, Хлебникова О.В.¹, Скоблов М.Ю.¹, Петрова Н.В.¹, Гинтер Е.К.¹

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, Москва, 115478, ул. Москворечье, д. 1; e-mail: vasilyeva_debrie@mail.ru

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко» Российской академии медицинских наук, Москва, 125047, 4-я Тверская-Ямская ул., д. 16; e-mail: vadim@shimansky.ru

³ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Российской академии медицинских наук, Москва, Каширское ш., д. 123

Впервые в России проведена ДНК-диагностика нейрофиброматоза 2-го типа (НФ2) в группе 20 больных из 15 семей. В ДНК, выделенной из лейкоцитов венозной крови и из опухолевой ткани, методами прямого секвенирования, MLPA-анализа и сравнительного анализа полиморфных STR-маркёров определены 20 мутаций (p.Glu278Ter, p.Arg196Ter, p.Lys284Ter, p.Arg198Ter, p.Glu378Ter, p.Gln121Ter, p.Ser87Ter, p.Tyr153Ter, p.Arg57Ter, p.Val219Met, p.Arg335Trp, p.Tyr244Asp, p.Ala247Glu, p.Arg447Lys, c.241-3C>T, c.1000-2C>T, dup upstr-ex1, dup ex11-17, del ex 4, потеря гетерозиготности по маркёрам хромосомы 22 D22S929 и D22S444), из которых 14 ранее не описаны. Проанализированы генофенотипические корреляции обнаруженных в гене *NF2* мутаций.

Ключевые слова: нейрофиброматоз 2-го типа, мутации в гене *NF2*, генофенотипические корреляции

Введение

НФ2 — аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся двусторонними вестибулярными шванномами (или невриномами) и менингиомами в сочетании с другими внутричерепными и спинальными опухолями (глиомы, астроцитомы, эпендимомы). Наблюдаются также опухоли периферических нервов, кожные неоплазии в виде невусов, подкожных шванном и нейрофибром. Среди клинических проявлений самыми яркими являются потеря слуха, шум в ушах, головокружение, головная боль, нарушение равновесия, парезы лицевого нерва, парестезии, слабость отдельных групп мышц в конечностях, нарушение пигментации кожи, заднекапсулярная катаракта. Для постановки клинического диагноза НФ2 используется Манчестерский критерий, подробно описанный в ряде статей [3, 7, 8] и в нашем обзоре, посвящённом НФ2 [1].

Ген онкосупрессор *NF2* — единственный ген, мутации (нонсенс-мутации, миссенс-мутации, небольшие инсерции/делеции, мутации сайтов сплайсинга, крупные дупликации/делеции и обширные хромосомные перестройки) в котором приводят к развитию заболевания. Ген *NF2* состоит из 17 экзонов и локализован на хромосоме 22q12.2, занимая 95 045 пар нуклеотидов. Учитывая высокую долю (более 20%) обширных дупликаций/делеций в гене, молекулярно-генетическое тестирование целесообразно проводить одновременно двумя методами: прямым

секвенированием и MLPA-анализом, — позволяющими в совокупности идентифицировать изменения в гене в 72% случаев без семейной истории и в 90% при отягощённом семейном анамнезе [7]. Диагностику осложняют значительное количество больных с мутациями *de novo* (более 50%), а также наличие мозаицизма (около 30% случаев) по вновь приобретённой мутации.

Необходимым условием для возникновения НФ2-ассоциированной опухоли является наличие двух мутаций в гене *NF2*: герминальной, наследуемой или возникшей *de novo*, и соматической. Среди соматических событий самые частые — точковые замены и потеря локуса хромосомы 22, т.е. потеря гетерозиготности по аллелю дикого типа (ПГ) [9]. Тип герминальной *NF2*-мутации является важной детерминантой количества ассоциированных с НФ2 внутричерепных менингиом, спинальных опухолей и опухолей периферических нервов [2, 4, 12]. В гене *NF2* официально зарегистрировано 398 мутаций: 93 миссенс-/нонсенс-мутации, 84 мутации сайта сплайсинга, 34 небольшие инсерции, 104 небольшие делеции, 8 ин/дел, 63 крупные делеции, 8 крупных дупликаций и 4 сложные перестройки [HGMD: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>].

Настоящая публикация посвящена клиническому описанию и молекулярно-генетической диагностике НФ2. Скрининг на мутации в гене *NF2* у больных НФ2 в России выполнен впервые.

* Работа выполнена при частичном финансировании РФФИ (11-04-00012, 12-04-00122, 13-04-10033к) и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 годы», соглашение 8065.

Материалы и методы*Материал исследования*

ДНК-исследование выполнено в лаборатории генетической эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук. Проведено медико-генетическое консультирование и клинико-генетическое обследование 20 больных из 15 неродственных семей, направленных из хирургических центров (13 семей с 17 больными из НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко и 2 семьи с тремя больными из РОНЦ им. Н.Н. Блохина), с предположительным диагнозом НФ2, прооперированных по поводу опухолей спинного и головного мозга. Особенностью рассматри-

ваемой выборки является классическое проявление заболевания в соответствии с Манчестерским критерием, характеризующееся тяжёлым течением болезни с необходимостью хирургического вмешательства. Среди рассматриваемой выборки 11 пробандов (из шести семей) с семейной историей, 9 единичных случаев. Пациент имеет семейную историю, если у него есть хотя бы один поражённый родственник первой степени родства. По просьбе больных и членов их семей обследование также проведено шести здоровым родственникам и детям с отягощённым семейным анамнезом. ДНК-диагностика у клинически здоровых родственников позволила установить патологическое действие найденных не описанных прежде мутаций.

Таблица 1

Данные о проанализированном биологическом материале по больным и здоровым индивидуумам

№	Обследованный	Клинически здоров/ болен	Опухоль			Кровь	
			Тип анализированной опухоли	Сиквенс	Анализ ПГ*	Сиквенс	MLPA
Наличие семейного анамнеза							
1	NF2.3	Болен	Менингиома	+	+	+	+
2	NF2.1	Болен	Менингиома, шванно- ма	+	+	—	—
3	NF6.3	Болен	Шваннома	+	+	+	+
4	NF6.4	Болен	Шваннома	+	+	+	+
5	NF6.2	Болен	—	—	—	+	+
6	NF6.3.3	Болен	—	—	—	+	+
7	NF6.3.4	Здоров	—	—	—	+	+
8	NF6.4.3	Здоров	—	—	—	+	+
9	NF7	Болен	Шваннома	+	+	+	+
10	NF10.3	Болен	—	—	—	+	+
11	NF10.4	Болен	—	—	—	+	+
12	NF11	Болен	Шваннома	+	+	+	+
13	NF11	Здоров	—	—	—	+	+
14	NF17	Болен	Шваннома	—	—	+	+
Единичные случаи							
15	NF3	Болен	Шваннома	+	+	+	+
16	NF5	Болен	Шваннома	+	+	+	+
17	NF8	Болен	Шваннома	+	+	+	+
18	NF9	Болен	Шваннома	+	+	+	+
19	NF12	Болен	Шваннома	+	+	+	+
20	NF13	Болен	Шваннома	+	+	+	+
21	NF14.3	Болен	Шваннома	+	+	+	+
22	NF14.1	Здоров	—	—	—	+	+
23	NF14.2	Здоров	—	—	—	+	+
24	NF15	Болен	Шваннома	+	+	+	+
25	NF16.3	Болен	Астроцитомы, шванно- ма	+	+	+	+
26	NF16.2	Здоров	—	—	—	+	—
Примечание. * — анализ ПГ проводили по трём STR-маркёрам длинного плеча хромосомы 22 для выявления потери аллеля дикого типа в опухоли							

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Собраны клинические данные: возраст манифестации первых симптомов и постановки диагноза, клинический и семейный анамнез, результаты МРТ, заключение офтальмолога, нейрохирурга, невропатолога и гистолога. Получены сведения о гистологическом и/или радиологическом исследованиях обнаруженных опухолей. Вместе с клиническим описанием получены образцы удалённых опухолей. Опухолевый материал (двусторонние и односторонние вестибулярные шванномы, менингиомы и астроцитомы) представлен фиксированными в формалине и заключёнными в парафиновые блоки удалёнными опухолями и в одном случае — замороженной опухолью. Тип опухоли определялся в результате непосредственного гистопатологического и/или радио-

логического исследования. Во всех случаях у пациентов и членов их семей получено письменное информированное согласие. В табл. 1 собраны и систематизированы данные о проанализированном материале по больным и здоровым индивидуумам. В большинстве семей с отягощённым анамнезом обследованы все доступные пациенты. В семье NF6 обнаружены и обследованы поражённые НФ2 в трёх поколениях.

Методы исследования

На первом этапе анализировалась опухоль, затем найденные мутации подтверждались в крови.

Поиск мутаций проведён методом прямого секвенирования всей кодирующей последовательности гена *NF2* с

Праймеры для экзонов гена *NF2*

Таблица 2

NF2-1f	5'-TGGCCCTGAGGCCTGTGCAGCAAC -3'
NF2-1r	5'-GAGAACCTCTCGAGCTTCCAC -3'
NF2-2f	5'-TGTCCTTCCCCATTGGTTTG -3'
NF2-2r	5'-CAGTTTCATCGAGTTCTAGCC -3'
NF2-3f	5'- GGG TAG CAC AGG AGG AAG T -3'
NF2-3r	5'- ACT CTG AGG CCA ACT CTG CA -3'
NF2-4f	5'- CCC TCA TTA GAA CGC CGT GA -3'
NF2-4r	5'- AAG ATA GGA GTG ATC CCA TGA -3'
NF2-5f	5'- GAA TGA GAT TGG TCC AGC TCT -3'
NF2-5r	5'- GTA CTT CCA ATA TTC CTT CAA GT -3'
NF2-6f	5'- CTA TCT CCC TGG GTG TAG CT -3'
NF2-6r	5'- AAA AGC CCA TAA AGG AAT GTA A -3'
NF2-7f	5'- CAG GGT CAG AAT GCT TGA TT -3'
NF2-7r	5'- TCG CCT TGG AAT GAA GAA GTA -3'
NF2-8f	5'- CAG ATT CTT TGG AAG GTT GAA T -3'
NF2-8r	5'- GGG CAG ACA GGG AAA GAT CT -3'
NF2-9f	5'- GGC CAG TGT GGT TGC GCA T -3'
NF2-9r	5'- CTT CAC AAG ATG TCA CTC TGA T -3'
NF2-10f	5'- CTG CTA CCT GCA AGA GCT CA -3'
NF2-10r	5'- CAG GTA TGT CCA CGG CCA A -3'
NF2-11f	5'- AGA ATG ACC CTG GCT ACC TA -3'
NF2-11r	5'- CAG GAG ACC AAG CTC CAG A -3'
NF2-12f	5'- TTG TCC CAT CTC AGT GTT CAA -3'
NF2-12r	5'- GAC AAC TGC TGT AGA GCT CA -3'
NF2-13f	5'- GGT GCC ATC CTC AGG GTT A -3'
NF2-13r	5'- GCC TGA ATG GTC ACC CTG A -3'
NF2-14f	5'- GAC CCG AGT TGT GCC CAT T -3'
NF2-14r	5'- GAA TGC TGA TCT GTT GTC CTT -3'
NF2-15f	5'- CCT GTG AGT GGC CAA GTA GA -3'
NF2-15r	5'- GAT GCC AAT AGT CTA GTG ACT -3'
NF2-16f	5'- CTG CAG TGT GAG AGC TGG A -3'
NF2-16r	5'- AAG CAT GCT GCG GCC AGT A -3'
NF2-17f	5'- CCT TTG AGG TGA GTC CAA GT -3'
NF2-17r	5'- AGT CAG GAA TCC CAC ATT AGA -3'

использованием 17 пар праймеров, покрывающих последовательность всех экзонов гена и фланкирующих их интронных областей, в образцах ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови и из материала опухолей. Праймеры собственного дизайна приведены в табл. 2.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови выполнено по стандартной методике, рекомендованной производителем (Wizard® Genomic DNA Purification Kit ()). Для выделения ДНК из фиксированного в формалине и заключённого в парафиновые блоки материала опухолей сначала использовали раствор протеиназы К (из Tritirachium album, 100 мкг/мл Amresco Am-0706-0,1) в буфере: 10 мМ трис-НСl, рН 8,0; 100 мМ NaCl; 50 мМ ЭДТА, рН 8,0; 0,5% SDS, инкубация 10–12 ч при 56°C, затем добавляли равный объём лизирующего буфера с гуанидинтиоцианатом — на 10 мин при 65°C, затем выделение ДНК проведено с помощью сорбента по методике, рекомендованной производителем (набор Diatom™ DNA Prep 400 ООО «Лаборатория Изоген»).

Для анализа количества копий гена *NF2* в ДНК крови использован метод мультиплексной лигазависимой амплификации зондов (MLPA), позволяющий амплифицировать сразу несколько целевых последовательностей с помощью одной пары меченых праймеров. MLPA-реакцию проводили по стандартному протоколу, рекомендованному производителем (<http://www.mrc-holland.com>). Капиллярный электрофорез проведён на 4-капиллярном Genetic Analyzer ABI 3730. Результаты интерпретированы с использованием программного обеспечения GeneMapper® Software. Последующий анализ данных электрофореза выполнялся с помощью программы Coffalyser.NET (<http://www.mlpa.com>).

Набор проб P044-B1 NF2MRC Holland SALSA® MLPA® содержит зонды для каждого экзона и, две пробы для области промотора гена *NF2*. В набор включены также 14 референсных зондов для нескольких генов на других хромосомах, а также пробы для гена *NIPSNAP1*, расположенного в 47,4 т.п.н. проксимальнее *NF2*, и для гена *CABP7* — в 34 т.п.н. дистальнее *NF2* (<http://www.mrc-holland.com>).

Для определения гетерозиготности гена *NF2* в ДНК опухолей исследованы три высокополиморфных STR маркера. В ДНК, выделенной из лейкоцитов крови и из ткани опухоли каждого из пробандов, проведён сравнительный ПДАФ-анализ (полиморфизм длин амплифицированных фрагментов) микросателлитных повторов: двух внутригенных маркеров, расположенных в интронах 1 и 10, и одного внегенного маркера вблизи теломеры длинного плеча хромосомы 22. ПДАФ-анализ проводился в 8%-ном ПААГ.

Один из исследованных STR — D22S92 — внутригенный маркер в (32,2 т.п.н.) интроне 1 гена *NF2*. Это динуклеотидный повтор с гетерозиготностью 83%. Маркер D22S444 — тетра nukлеотидный повтор, расположен в области 22q13.31 (теломерный конец длинного плеча хромосомы 22), т.е. вне локуса гена *NF2*. Гетерозиготность по D22S444 составляет 79% [11].

Третий исследованный STR-маркер — динуклеотидный повтор 18хCA chr22:30,060,361-30,060,396 — расположен в интроне 10 гена *NF2* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks>).

Результаты и обсуждение

Проведено ДНК-исследование для идентификации мутационных изменений в гене *NF2* 20 больным из 15 семей с клиническим диагнозом НФ2 и шести клинически здоровым членам обследованных семей. В табл. 3 приводятся сводные данные клинического и молекулярно-генетического обследования.

Далее делается попытка провести анализ изученного материала по основным характеристикам (табл. 3): возрасту дебюта заболевания и первому симптому, клиническим проявлениям и описанию опухолей, ДНК-исследованиям опухолевого материала и лейкоцитов крови и генофенотипическим корреляциям.

Возраст дебюта заболевания и первый симптом

В исследованной выборке больных диагноз установлен в возрасте от 5 до 56 лет, средний возраст постановки диагноза около 19 лет, тогда как средний возраст начала болезни 14 лет. У 15 чел. (из 20 больных, что составило 75%) из 12 семей первые признаки болезни появились до 15 лет (с 1 года до 15 лет).

Ранними клиническими проявлениями НФ2 в исследованной группе были: нарушение координации и шаткость походки — у двух больных (NF6.3, NF6.4) и различные кожные неоплазии — у 13 больных (65%). Среди кожных проявлений отмечены: нарушение пигментации, появление пятен и невусов у пяти больных (NF2.3, NF14, NF16, NF6.3.3, NF10.3), подкожные опухоли, в том числе шванномы и нейрофибромы в восьми случаях (NF5, NF7, NF8, NF9, NF10.4, NF11, NF12, NF13).

Учитывая, что пятна на коже при НФ2 часто визуализируются в виде нарушений пигментации различного размера и формы и чётко не дифференцируются в силу отсутствия универсального характера поражения, данный симптом был поводом обращения к врачу только в семьях с отягощённым анамнезом и настороженностью родителей. В семьях с единичными больными данный признак определялся как дебют заболевания пациентами только после постановки диагноза по другим симптомам. Это необходимо учитывать при постановке диагноза НФ2.

Однако неопределённость кожных нарушений не уменьшает значения данных признаков наряду с определением катаракты для пресимптоматической диагностики пациентов с НФ2 из группы риска [1]. У 13 из 15 больных с ранними дебютами установлены катаракта или отёчность и помутнение хрусталика, причём данные осмотра офтальмологом собраны не для всех обследованных на ранних стадиях.

Краткое описание проанализированных случаев НФ2

Пациент/ пол	Возраст дебюта, лет	Первый симптом	Клинические признаки НФ2 и результаты МРТ	Проис- хождение мутации	Семейный анамнез	Мутация герми- нальная	Мутация сомати- ческая	Эк- зон
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>С семейным анамнезом заболевания</i>								
NF2.1/ М	20	Пятна (в 20 лет), отклонение языка вправо (в 25 лет), шаткость походки, парестезия	Шаткость походки, парестезия, снижение слуха, головные боли, тошнота, рвота, эпи-приступы, множественные интракраниальные и 3 спинальные менингиомы, шваннома корешка тройничного нерва, ДВШ	<i>de novo</i>	Отягощён, умер к моменту обследования	Нет материала	p.Glu278Ter/ p.Ala247Glu	9, 8
NF2.3/ Ж	15	Пятна (15 лет), нарушения слуха (17 лет), координации, головная боль, парестезия	Глухота слева, нарушение координации, поперхивание, асимметрия мягкого нёба, приступы головной боли, тошнота, неукротимая рвота, парестезия, множественные интракраниальные менингиомы, ДВШ	Отцовская	Отягощён	p.Glu278Ter/ +	p.Glu278Ter/ ПГ	9, int1
NF6.2/ Ж	40	Невус с рождения, снижение слуха (в 40 лет)	Глухота, слепота, нарушение координации, мышечная гипотония, катаракта, частичная атрофия зрительных нервов, ДВШ, множественные интракраниальные опухоли	?	Отягощён	p.Arg196Ter/ +	Нет материала	6
NF6.3/ Ж	15	Нарушение координации	Нарушение координации (15 лет), подкожные нейрофибромы (20 лет), диффузная мышечная гипотония, катаракта, частичная атрофия зрительных нервов, лагофталм, глухота, ДВШ	Материнская	Отягощён	p.Arg196Ter/ +	p.Arg196Ter/ +	6
NF6.4/ Ж	15	Шаткость походки, поперхивание во время еды, изменение голоса	Шаткость походки, поперхивание во время еды, изменение голоса, катаракта, частичная атрофия зрительных нервов, экзофтальм, лагофталм, парез лицевых нервов, глухота, ДВШ, подкожные невриномы	Материнская	Отягощён	p.Arg196Ter/ +	p.Arg196Ter/ p.Lys284Ter	6, 7
NF6.3.3/ Ж	1	Пятна, помутнение эмбриональных швов хрусталика субкапсулярно, линейный невус	Первая степень родства с больным NF2, пятна, нарушение пигментации, помутнение эмбриональных швов хрусталика субкапсулярно, линейный невус, начальная стадия интракраниальных опухолей	Материнская	Отягощён	p.Arg196Ter/ +	Нет материала	6
NF7 Ж	1	Подкожная опухоль	Подкожные нейрофибромы, пятна (с 15 лет), снижение слуха, сильные головные боли, парез лицевого нерва, слабость мышц нижних конечностей, катаракта, частичная атрофия зрительных нервов, спинальные эпендимомы, шваннома, менингиомы, подкожные нейрофибромы, ДВШ	?	Отягощён	+ / +	+ / ПГ	int1
NF10.3 Ж	3	Линейный невус, пятна, снижение зрения с 3-4 лет, подкожная опухоль (9 лет), МШ (9 лет) интракраниальные и паравентральные	Линейный невус, пятна, слабость мышц нижних конечностей, интракраниальные и спинно-мозговые МШ, точечное помутнение хрусталика субкапсулярно, глиома зрительного нерва, подкожная шваннома	Материнская	Отягощён	p.Arg198Ter/ +	Нет материала	6

Таблица 3 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
NF10.4/ М	5	Подкожные шванномы	Снижение слуха и зрения справа, слабость мышц нижних конечностей, катаракта, ВШ справа, участок глиоза левой височной области, МШ подкожные	Материнская	Отягощён	p.Arg198Ter/+	Нет материала	6
NF11/ М	1	Подкожная нейрофиброма, невус, пятна	Пятна, снижение слуха, шум, недостаточность 5-й, 7-й и 9-й пар черепно-мозговых нервов, нарушение статики и походки, частичная атрофия зрительных нервов, ни-стагм, МШ спинно-мозговые и интракраниальные, ДВШ	Материнская ?	Отягощён	dup ex11-17/+	dup ex11-17/p.Arg335Trp	11—17, 11
NF17/ Ж	31	Снижение зрения, слуха, звон в правом ухе	Парез лицевого нерва, нарушение координации, атрофия зрительных нервов, нейрофиброма подъязычного нерва, ДВШ	Материнская ?	Отягощён	p.Arg447Lys/+	Нет материала	12
<i>Единичные случаи</i>								
NF3/ М	17	Снижение слуха	Снижение слуха слева, ВШ, приступы головокружения, пятна, множественные мелкие невусы	de novo	Не отягощён	+/+	p.Glu378Ter/+	12
NF5/ М	3	Снижение зрения, слабость в правых конечностях (с 3 лет), подкожная опухоль	Шаткость походки, парез лицевого нерва, полная глухота справа, снижение слуха слева, слабость мышц в конечностях справа, катаракта, гипоплазия хореоидеи, преретинальный фиброз с отложением пигмента, шваннома СЗ, ДВШ	de novo	Не отягощён	p.Gln121Ter/+	p.Gln121Ter/c.241-3C>T	3, int2
NF8/ Ж	7	Подкожная нейрофиброма (7 лет), боли в шейном отделе позвоночника (с 13 лет)	Глухота справа, головная боль, шум в ушах, головокружение, слабость мышц в конечностях справа, шаткость статики и походки, катаракта, полная атрофия зрительных нервов, слепота, спинальные шванномы шейного отдела, гигантская ВШ	de novo	Не отягощён	+/+	+/ПГ	int3
NF9/ М	1	Подкожная нейрофиброма, снижение слуха (с 3 лет)	Одностороннее повышение чувствительности тела, нарушение объёма движений, слабость мышц нижних конечностей, катаракта, полная атрофия зрительных нервов, множественные шванномы слуховых, зрительных нервов, МШ спинальные, подкожные на туловище, конечностях, в том числе ладонях и стопах, подкожные нейрофибромы	de novo	Не отягощён	p.Val219Met/+	p.Val219Met/+	7
NF12/ М	7	Подкожная нейрофиброма	10 подкожных нейрофибром, снижение слуха, головные боли, головокружение, шаткость походки, тошнота, нарушение координации правой руки, парез лицевого нерва, врождённая катаракта, частичная атрофия зрительных нервов, гипоплазия хореоидеи, интракраниальные и спинальная менингиомы, ДВШ	de novo	Не отягощён	dup upstr-ex1/+	dup upstr-ex1/ПГ	1, int1
NF13/ Ж	1	Подкожные шванномы (с 1 года), острый парез лицевого нерва (в 9 лет)	Подкожные шванномы, пятна, врождённая катаракта, парез лицевого нерва справа, снижение слуха, шум, затем глухота с двух сторон, интракраниальная, спинальная и краниовертебральная менингиомы, ДВШ, МШ спинальные	de novo	Не отягощён	p.Ser87Ter/+	p.Ser87Ter/+	3

Таблица 3 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
NF14.3/М	7	Пятна (7 лет), снижение, слабость в пальцах левой руки, шаткость походки, подкожная опухоль (с 22 лет)	Пятна, шаткость походки, слабость в пальцах левой руки, отсутствие слуха, парестезия правой половины лица, парез лицевого нерва, гипотрофия левой голени, лагофтальм, катаракта, частичная атрофия зрительных нервов, ДВШ, МШ интракраниальные и менингиомы, подкожная нейрофиброма	<i>de novo</i>	Не отягощён	p.Arg57Ter/+	p.Arg57Ter/+	2
NF15/М	17	Снижение слуха, парестезия, шаткость походки, режущая боль в левом ухе, тошнота, головокружение, головные боли	Парестезия левой половины тела, режущая боль в левом ухе, тошнота, головокружение, головные боли, шаткость походки, снижение слуха, ВШ слева, правосторонняя тугоухость первой степени	<i>de novo</i>	Не отягощён	+/+	p.Tyr153Ter/c.1000-2A>G	5, int10
NF16.3/Ж	1	Пятна (одни с 1 года, другие с 11 лет), снижение слуха (с 19 лет), шаткость походки, парестезия, остро развившаяся слабость в левой руке	Пигментные пятна, шаткость походки, парестезия, повышенный тонус, сгибательная контрактура пальцев правой руки, слабость в левой руке, парез лицевого нерва, катаракта, шум, снижение слуха, спинальные астроцитомы и 2 шванномы C1-C4, ДВШ	<i>de novo</i>	Не отягощён	+/+	p.Tyr244Asp/ПГ	8, локус всего гена
Примечание. ДВШ — двусторонняя вестибулярная шваннома; ВШ — односторонняя вестибулярная шваннома; МШ — множественные шванномы								

У оставшихся пяти больных (из 20) дебют заболевания отмечен с 17 до 40 лет, в среднем 25 лет. Необходимо отметить, что по дебюту заболевания наблюдался межсемейный клинический полиморфизм как по возрасту начала, так и по первым симптомам. Кроме того, в двух семейных случаях у младшего поколения выявлено более раннее начало и тяжёлое течение заболевания. В одной из них (семья 2) у отца определён мозаицизм по патологической мутации. Его дочь, унаследовавшая мутацию, имеет усугублённое течение заболевания с более ранним дебютом. Предположительно, во второй семье (NF6) мать, передавшая мутацию обеим дочерям, тоже мозаик. У мозаиков, по данным ряда авторов, тяжесть поражения и возраст начала определяются количеством поражённых клеточных линий [7]. Тяжесть течения НФ2 у детей мозаиков определяется присутствием унаследованной ими и ставшей для них герминальной мутации.

Анализ первых клинических проявлений у 20 больных позволил разделить материал на 2 группы:

1. Дебюты, связанные с ростом вестибулярных шванном у 11 больных. Первые симптомы — интенсивный шум со снижением слуха сначала в одном ухе, координаторные нарушения, шаткость походки, тошнота, головокружение, головные боли, парестезия и парез одной половины лица и тела, остро развившаяся слабость в одной конечности. У пяти из 11 больных признакам

роста двусторонней вестибулярной шванномы (ДВШ) предшествовало появление разной формы пигментных пятен, рост шванном обнаружился у разных больных через 2, 5, 14, 15 и 18 лет после появления пятен, в среднем, примерно с 10-летним интервалом;

2. Дебюты, связанные с ростом подкожных опухолей и невусов, у девяти больных, у троих из которых одновременно с подкожными опухолями обнаружались и первые признаки роста ДВШ. Средний возраст появления подкожных опухолей у больных NF2 в этой группе составил 3 года. У всех больных к 21 году констатировано снижение слуха и рост ДВШ, промежуток времени между появлением подкожной опухоли и падением слуха составил от 2 до 20 лет, в среднем, около 9 лет.

Отдельно хотелось бы остановиться на поражении хрусталиковых масс, выявленных у 80% обследованных больных с НФ2. Опалесценция и набухание хрусталиковых масс и катаракты обнаружены у 13 пациентов с ранним дебютом и у одного больного с поздним. Четверо больных не обследованы офтальмологом по разным причинам. В большинстве случаев больные не были осмотрены на предмет поражения глазного аппарата в раннем детстве, в связи с чем сложно говорить о возрасте начала данного симптома. По данным литературы, катаракты отмечаются у 83% всех пациентов с НФ2 (в 94% случаев с ранним дебютом и в 67% — с более поздним) [5].

Больные, у которых развивалось не менее трёх опухолей в раннем возрасте (обычно до 25 лет), могут быть классифицированы в клинический подтип Вишарта (17 больных). Больные с более поздним дебютом (после 30 лет) и не более чем с тремя опухолями могут рассматриваться как подтип Гартнера (одна больная NF17). Если развивалась только односторонняя ВШ до 20 лет, при этом в ткани опухоли выявлена хотя бы одна мутация, случай может быть классифицирован как мозаичный НФ2 (двое больных NF3, NF15) [7, 12]. Мозаицизм по мутации *de novo* предполагается ещё у двоих пробандов: NF2.1 и NF8. У пробанда NF8 потеря гетерозиготности по локусу гена *NF2* обнаружена только в опухоли, течение при этом довольно тяжёлое, хотя и с несимметричной ВШ. В случае NF2.1 терминальная мутация обнаружена только в одной опухоли, течение стремительное и тяжёлое, мутация передана дочери.

Описание клинических признаков у больных НФ2

У всех больных НФ2 проанализированы основные клинические проявления заболевания (табл. 3):

1. Снижение слуха, резкая боль, звон, шум в ушах вначале односторонние, определены у всех больных с установленным диагнозом, кроме одного ребёнка в пресимптоматическом периоде с определённой семейной герминальной мутацией;

2. Нарушения функции нервов определены у 18 больных (90%). Отсутствовали признаки очаговой и общей мозговой неврологической симптоматики у ребёнка в пресимптоматическом периоде и у одного больного с начальной стадией заболевания и односторонней ВШ. Кроме полного или частичного выпадения функции 8-й пары черепно-мозговых нервов выявлено изменение функции 5-й, 6-й, 7-й, 9-й, 10-й, 11-й, 12-й и 13-й пар черепно-мозговых нервов с одной или двух сторон. Определены также другие признаки, отражающие локальный рост опухолей: парез лицевого нерва (в том числе, острый), онемение или повышенная чувствительность лица, лагофтальм, косоглазие, птоз, горизонтальный нистагм, снижение рефлексов и торпидные рефлексы с нижних конечностей, признаки полинейропатии, повышенный тонус и онемение с парестезиями в верхних конечностях, сгибательные контрактуры пальцев, гипотрофия и слабость отдельных групп мышц (включая острое состояние), эпи-приступы, острое развитие мышечной слабости, заднестволовые и мозжечковые изменения, нарушение координации, шаткость походки, головокружение, головная боль, тошнота. Описанные признаки у большинства больных выявлены с одной стороны (табл. 4), однако при множественных опухолях возможно несимметричное двустороннее поражение;

3. Различные поражения органа зрения отмечались у 16 больных. У 14 больных в нашей группе обнаружены изменения хрусталиков: опалесценция и набухание хрусталиковых масс на периферии субкортикально и ката-

ракты. Катаракты выявлены в виде интенсивных помутнений неправильной формы в средних слоях, ближе к экватору, единичных или множественных на 6, 12, или 7 часах, а также точечных и веретенообразных помутнений в задних слоях хрусталика или эмбриональных швов. Отмечались асимметричные изменения хрусталиков обоих глаз. Характерная для НФ2 частичная атрофия зрительных нервов обоих глаз обнаружена у 10 больных, в восьми случаях она сочеталась с катарактой и другой патологией органа зрения: гипоплазией хориоидеи, преретинальным фиброзом с отложением пигмента. У пяти больных отмечаются косоглазие, экзофтальм, нистагм и у одного — паретический птоз верхних век обоих глаз 1—2-й степени. Таким образом, изменения хрусталиковых масс и атрофия зрительных нервов вносят основной вклад в снижение остроты зрения в обследованной группе больных НФ2 и являются одним из основных ранних диагностических критериев;

4. Пигментные пятна встретились у 10 больных (50%).

Паттерн кожных поражений при НФ2 имеет сложный неоднозначный характер, среди кожных и подкожных новообразований в исследованной группе больных НФ2 нам встретились:

- нейрофибромы и крупные подкожные шванномы, обычно единичные или немногочисленные, не более 10 штук, диаметром от 0,5 до 3 см различной локализации: на спине, ягодицах, голове, груди, конечностях (в том числе, на стопах и ладонях). На лице они существовали с рождения (у пяти больных) либо появлялись позже (у пяти больных). Необходимо отметить, что описанные врачами и не исследованные гистопатологически нейрофибромы не всегда на деле нейрофибромы; крупные подкожные шванномы легко принять за нейрофибромы [8], только некоторые из описанных как нейрофибромы подкожных опухолей имеют гистопатологическое подтверждение;

- мелкие шванномы в виде подкожных узелков на груди, лице и конечностях, существовавшие с рождения или подкожные шванномы в виде приподнятых над кожей бляшек с пигментированной поверхностью встретились у двоих больных;

- невусы и пигментация с оволосением — у четырёх больных, небольшие до 0,5 см в диаметре множественные образования, либо единичные, либо несколько довольно крупных, до 1,5 см, пятен, расположенных в ряд;

- пигментные пятна цвета кофе с молоком — либо в виде единичных или немногочисленных образований до 1,5 см в диаметре разной локализации: на конечностях, туловище, голове, — либо в виде множества мелких 0,5-см пятнышек, занимающих 6×5 см поверхности живота; наблюдались также обширные площади светло-кофейной пигментации на животе, внутренней поверхности локтевого сустава, обширные пятна цвета кофе с молоком, пятна светло-коричневого, коричневого и тёмно-кофейного цвета, небольшие депигментированные пятна.

*Описание типа опухолей
исследованной группы больных НФ2*

Проанализированы 18 прооперированных больных НФ2. У всех больных выявлены ВШ, как односторонние, так и двусторонние. У 11 пациентов ВШ сочетались с другими интракраниальными опухолями, у 11 больных обнаружены также различные спинальные опухоли и у 12 чел. — кожные.

В табл. 4 собраны данные о локализации и типе опухолей в исследованной группе больных с НФ2 на момент обследования. У всех пациентов после удаления различных опухолей отмечался продолженный рост, что видно по количеству перенесённых операций (табл. 4). В среднем, ДВШ увеличивается со скоростью 2 мм в год, однако наблюдаются периоды высокоагрессивного роста опухолей, механизм которого до конца не ясен.

В изученной выборке пациентов средний интервал между обнаружением шванном и ухудшением соматического состояния составил 4 года (с вариацией у отдельных больных от 2 до 10 лет). При обследовании больных НФ2 радиологически и гистопатологически определены следующие типы опухолей:

1. ДВШ в сочетании с другими опухолями определена у 15 пациентов (79%), у двоих — односторонняя ВШ в сочетании с подкожными, внутричерепными и спинальными опухолями, ещё у двоих — единственная опухоль, односторонняя ВШ, обнаруженная до 20 лет;

2. Опухоли нервной системы другой локализации: интракраниальные менингиомы, краниоспинальные менингиомы, множественные менингиомы шейного отдела, невринома с экстра-, интравентрикулярным ростом С1-С2, множественные невриномы черепно-мозговых нервов, интрамедулярные эпендимомы в шейном отделе С3-С7, невриномы в поясничном отделе позвоночника Th9-L4, множественные невриномы мосто-мозжечкового угла, интракраниальные и паравентрикулярные опухоли, с прорастанием в спинномозговой канал на уровне Th12-L1, интрамедулярная пилоидная астроцитома на уровне С1-С4 — всего у 17 пациентов (89,47%); опухоли обнаружены почти у всех больных одновременно со шванномами восьмой пары черепно-мозговых нервов, а у троих — на 2—3 года раньше;

3. Подкожные шванномы на туловище, конечностях, голове, а также подкожные нейрофибромы выявлены у 12 пациентов (63%).

Таблица 4

Данные о локализации и типе опухолей в исследованной группе больных с НФ2 на момент обследования

Больной	Год рождения	Опухоли внутричерепные	Спинальные	Кожные	Количество перенесённых операций
NF2.1	1970	ДВШ, мМ, Ш (корешка тройничного нерва слева)	3 СШ	—	8 операций
NF2.3	1993	ДВШ, мМ	2 СШ	—	1 операция
NF3	1983	ВШ	—	—	1 операция
NF5	1983	ДВШ, мМ	2 СШ	1 Н	3 операции
NF6.3	1976	ДВШ	Нет данных	5 Н	3 операции
NF6.4	1983	ДВШ	Нет данных	2 КШ	5 операций
NF6.2	1955	ДВШ, мМ	Нет данных	—	Нет операций
NF7	1990	ДВШ	мМ, 2Э, 1СШ	мН	2 операции
NF8	1989	ВШ	2СШ	1 Н	1 операция
NF9	1998	ДВШ, МИШ,	мСШ	мКШ	1 операция
NF10.3	1996	ДВШ, МИШ	мСШ	1 КШ	1 операция
NF10.4	1999	ВШ	—	мКШ	Нет операций
NF11	1987	ДВШ, МИШ	мСШ	мН	5 операций
NF12	1986	ДВШ, 3 М	1 М	мН	3 операции
NF13	1994	ДВШ, М	М, мСШ	мКШ	2 операции
NF14	1980	ДВШ, МИШ, мМ	Нет данных	1 Н	2 операции
NF 15	1990	ВШ	—	—	2 операции
NF 16	1988	ДВШ	2 СШ, 1А	—	2 операции
NF17	1980	ДВШ, Ш (корешка подъязычного нерва)	Нет данных	—	1 операция

Примечание. Ш — интракраниальные шванномы (они же невриномы); ВШ — односторонняя вестибулярная шваннома; ДВШ — двусторонняя вестибулярная шваннома; МИШ — множественные интракраниальные шванномы; СШ — шванномы спинальной локализации; мСШ — множественные спинальные шванномы; М — менингиома; мМ — множественные менингиомы; Э — спинальная эпендимома; А — астроцитома; Н — кожная нейрофиброма; мН — множественные кожные нейрофибромы; КШ — кожная шваннома; мКШ — множественные кожные шванномы

Молекулярно-генетическое исследование группы больных НФ2

Всего в результате прямого секвенирования экзонов гена *NF2*, анализа STR-маркёров и MLPA определены 20 разных герминальных и соматических мутаций у 20 больных из 15 семей. В табл. 3 представлены данные о выявленных герминальных и соматических мутациях, по каждому обследованному пациенту. В двух случаях семейная мутация не выявлена, в опухолях этих пациентов установлена потеря гетерозиготности по локусу гена *NF2*. Мутации p.Arg447Lys, p.Arg57Ter, p.Ser87Ter, p.Arg198Ter, p.Val219Met, p.Arg196Ter, p.Gln121Ter, p.Glu278Ter, dup upstr-ex1, dup ex11-17 определены в ДНК, выделенной из лейкоцитов венозной крови больных. Мутации p.Lys284Ter, p.Tyr153Ter, p.Ala247Glu, p.Tyr244Asp, p.Arg335Trp, c.1000-2A>G, c.241-3C>T, а также del ex4, ПГ по STR-маркёрам D22S444 и D22S929, сцепленным с геном *NF2*, определены в тканях удалённых опухолей.

Среди выявленных 20 мутаций 8 нонсенс-мутаций, приводящих к возникновению преждевременного стоп-кодона: p.Arg57Ter, p.Ser87Ter, p.Arg198Ter, p.Arg196Ter, p.Gln121Ter, p.Glu278Ter, p.Lys284Ter, p.Tyr153Ter, — и 3 мутации, затрагивающие сайты сплайсинга: c.1000-2A>G, c.241-3C>T, p.Arg447Lys. По данным литературы, мутации этих двух типов — самые частые среди определяемых изменений у больных НФ2, в данном исследовании на эти типы мутаций приходится более половины всех обнаруженных изменений в гене *NF2* [2].

Кроме того, определены 4 миссенс-мутации, приводящие к замене аминокислоты (p.Val219Met, p.Ala247Glu, p.Tyr244Asp, p.Arg335Trp), и две дупликации обширных регионов гена *NF2*, в одном случае удвоение 5'-области, включая экзон 1 (dup upstr-ex1), во втором — 3'-области, начиная с экзона 11 по 17 (dup ex11-17), точные границы нами пока не установлены, в базе данных о мутациях человека HGMD не упоминается о дупликациях данных областей.

Пять из обнаруженных в настоящем исследовании мутаций были описаны ранее другими авторами и/или зарегистрированы в базе HGMD: p.Tyr153Ter, p.Arg57Ter, p.Arg198Ter, p.Arg196Ter, p.Val219Met (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Мутации p.Tyr153Ter, p.Arg57Ter, p.Val219Met, описанные у больных из Канады, Великобритании и США [2], в нашей группе встретились как мутации *de novo*. Зарегистрированные или упоминавшиеся в литературе и ассоциированные с НФ2 мутации и в нашем исследовании считались патогенными.

Определение ПГ генов онкосупрессоров в ткани — важная составляющая молекулярно-генетического анализа опухолей. У четверых пациентов в исследованной группе на основе сравнения высокополиморфных STR-маркёров в ткани и опухоли определена ПГ по локусу гена *NF2*. ПГ по маркёру D22S929 определена в опухолях у троих пациентов (NF2.3, NF7, NF12), ПГ сразу по трём STR: D22S929, D22S444,

18xCachr22:30,060,361-30,060,396, — в ткани опухоли одной больной (NF16). У одной пациентки выявлена делеция участка гена, захватывающая, по крайней мере, один экзон 4, таким образом, ПГ по аллелю дикого типа выявлена у пятерых пациентов, т.е. в четверти группы. Это значение хорошо согласуется с данными литературы о частоте потери локуса хромосомы 22 в опухолях у больных НФ2 [1, 7, 9].

Пока неизвестным остаётся значение обнаруженных гетерозиготных замен в интронных областях гена *NF2*. Одинаковые редкие аллели в четырёх полиморфизмах некодирующих областей гена встретились у нескольких пациентов. Клиническое значение выявленных аллелей неизвестно, два из четырёх аллелей не зарегистрированы в базах данных, частота в выборке здоровых индивидов нами не определялась. Обнаружены гетерозиготные состояния в полиморфизмах rs2530664 в интроне 3 c.364-39A>C (встретился в двух случаях: NF8, NF13); rs13055076 в интроне 11 c.1123-51C>T (в одном случае: NF6); c.1446+80C>T в интроне 13 (в двух семьях: NF17 и NF12); и c.1446+86delT/in-sATCC в интроне 13 (в одном случае: NF17).

Обнаруженные герминальные и соматические мутации по возможному клиническому значению можно разделить на следующие типы:

- герминальные (нонсенс-мутации, миссенс-мутации, сайтов сплайсинга, дупликации);
- «двойные» соматические мутации (нонсенс-мутации, миссенс-мутации, сайтов сплайсинга, ПГ, ассоциированные с любой другой инактивирующей мутацией, т.е. обе обнаружены только в ткани);
- «вторая» соматическая инактивирующая мутация в сочетании с обнаруженной герминальной;
- «одиночные» соматические (потеря гетерозиготности по сцепленным с геном *NF2* маркёрам и единственная терминальная мутация).

В табл. 5 приводятся герминальные и соматические мутации, выявленные у обследованных пациентов по возможному клиническому значению.

Герминальные нонсенс-мутации, мутации сайтов сплайсинга, удвоения части гена — зарегистрированные и нет, — считались патологическими, приводящими к развитию синдрома НФ2, а диагноз — подтверждённым молекулярно-генетически, так как данные изменения приводят к нарушению синтеза мерлина. Единственная обнаруженная нами герминальная миссенс-мутация p.Val219Met (в семье 9) зарегистрирована и ассоциирована с тяжёлым течением.

Значение соматических мутаций нуждается в обосновании. Соматические изменения в гене *NF2* ассоциированы с несколькими фенотипами, такие изменения не наследуются, как не наследуется и второе мутационное событие, происходящее в ткани опухоли при НФ2. Однако при мозаичном варианте НФ2 оба инактивирующих ген мутационных события могут быть обнаружены только как соматические, если количество поражённых клеточных линий менее 10%. Небольшого

предпринятого исследования опухолевого материала явно недостаточно для определения значения «единственных» идентифицированных соматических мутаций. В этом отношении данная работа тоже может быть расширена. Эванс [7] считает диагноз подтверждённым, если в опухолевом материале обнаружены обе инактивирующие мутации или одинаковые мутации определены в разных опухолях (мозаицизм по повторяющейся мутации), в данной работе у возможных мозаиков мы исследовали только одну опухоль. Обнаруженные у них в качестве соматических терминальные мутации в сочетании со второй инактивирующей (NF15) или без неё (NF3) считались патологическими. Обнаружены три соматические миссенс-мутации (семьи 3, 11, 16), ни одна не описана ранее. Две из этих миссенс-мутаций сочетались с найденными герминальными изменениями, одна найдена только в опухоли у пациентки без семейной истории (NF 16). Данная мутация (p.Tyr244Asp) ассоциирована с обнаруженной в ткани опухоли второй инактивирующей мутацией — ПГ по аллелю дикого типа (определена потеря большей части длинного плеча хромосомы 22). Что же касается самой миссенс-мутации, замена тирозина в позиции 244 затрагивает функционально важную область мерлина, данная аминокислота высококонсервативна во всех белках семейства 4.1. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Клиническое значение мутации p.Tyr244Asp, таким образом, вполне определено.

Вторые инактивирующие, соматические, мутационные события встретились в виде одной нонсенс-мутации, двух миссенс-мутаций, одной мутации сайта сплайсинга и трёх случаев ПГ. Всего второе мутационное событие определено у восьми пациентов. У пациента NF15 (генотип опухоли p.Tyr153Ter/c.1000-2A>G) определить, какая из мутаций произошла первично и может быть передана потомкам, не представляется возможным, так как имеется материал только одной опухоли.

Таким образом, во-первых, очевидно, при NF2 встречается мозаицизм первичный и мозаицизм опухолевый, во-вторых, при дополнительном исследовании ДНК здоровых родственников и/или дополнительного опухолевого материала становится очевидным клиническое значение обнаруженных изменений, определяется «первичность» соматических мутаций и причина возникновения заболевания.

В семьях NF7 и NF8, однако, диагноз молекулярно-генетически подтвердить не удалось. Хотя в материале опухоли пробандов определена потеря части последовательности гена, данного исследования недостаточно, чтобы подтвердить диагноз. В подобном случае другие исследователи определяют, во-первых, такую же делецию в другой опухоли, и, во-вторых, наследование потомками аллеля с делецией и аллеля с неопределённой мутацией. В данный момент мы не располагаем необходимым для этого материалом.

Таблица 5

Типы обнаруженных герминальных и соматических мутаций по возможному клиническому значению

Случай	Герминальные мутации	Соматические мутации	
		"Двойная" и "вторая"	"Одиночная"
NF2.1	+/+	p.Glu278Ter/p.Ala247Glu	
NF2.3	p.Glu278Ter/+	ПГ	
NF6.2	p.Arg196Ter/+		
NF6.3	p.Arg196Ter/+		
NF6.4	p.Arg196Ter/+	p.Lys284Ter	
NF6.3.3	p.Arg196Ter/+		
NF7	+/+		ПГ
NF10.3	p.Arg198Ter/+		
NF10.4	p.Arg198Ter/+		
NF11	dup ex11-17/+	p.Arg335Trp	
NF17	p.Arg447Lys/+		
NF3	+/+		p.Glu378Ter
NF5	p.Gln121Ter/+	c.241-3C>T	
NF8	+/+		ПГ
NF9	p.Val219Met/+		
NF12	dup upstr-ex1/+	ПГ	
NF13	p.Ser87Ter/+		
NF14.3	p.Arg57Ter/+		
NF15	+/+	p.Tyr153Ter / c.1000-2A>G	
NF16.3	+/+	p.Tyr244Asp / ПГ	

Что касается локализации мутаций, то, согласно опубликованным данным, менее 10% всех обнаруживаемых небольших изменений приходится на нетерминальные мутации, причём они концентрируются в экзонах 2 и 3 [2]. В нашем исследовании из 16 обнаруженных точковых мутаций 5 приходится на экзоны 2 и 3. Остальные 11 локализованы в экзонах с 5-го по 9-й и в экзонах 11 и 12. Нами совсем не обнаружены точковые мутации в экзонах 1, 4, 10, 13, 14, 15, 16 и 17. Среди упоминавшихся удвоений части гена *NF2* одно захватывает 5'-область, включая экзон 1, второе — 3'-область, с экзонами с 11 по 17. ПГ по аллелю дикого типа в ткани опухоли определены по трём маркерам. В одном случае произошла делеция области гена с захватом экзона 4 (rs2530664), в трёх случаях потеряна часть последовательности в 5'-области (D22S92), ещё в одном — потеря всего гена и обширной области длинного плеча хромосомы 22 от локуса гена *NF2* 22q12.2 до 22q13.31 (D22S92 и D22S444).

Генофенотипические корреляции

Ассоциация классического НФ2 (клинического подтипа Вишарта) с нонсенс-мутациями ранее была показана многими авторами [2, 6, 7, 12].

По данным литературы, большинство случаев НФ2 с тяжёлым течением — с большим количеством опухолей и ранним началом — ассоциировано с нонсенс-мутациями и мутациями, приводящими к сдвигу рамки считывания. Среди случаев с более мягким течением преобладают ассоциации с миссенс-мутациями и мутациями сайтов сплайсинга. Бейзер ранее получил статистически значимые генофенотипические корреляции между типом мутации и количеством внутримозговых менингиом, спинальных опухолей и опухолей периферических нервов. Пациенты с герминальными миссенс-мутациями, мутациями сайтов сплайсинга, обширными делециями или соматическим мозаицизмом имеют значительно меньше опухолей, чем пациенты с герминальными нонсенс-мутациями и мутациями, приводящими к сдвигу рамки считывания [4].

В исследованной выборке на вышеупомянутые нами случаи с ранними дебютами и тяжёлым течением (9 пациентов) приходятся все обнаруженные герминальные нонсенс-мутации гена *NF2*.

Обе обнаруженные в качестве герминальных мутаций дупликации части гена в нашем исследовании ассоциированы с тяжёлыми случаями с ранними дебютами.

Наибольшее фенотипическое разнообразие отмечено в литературе для мутаций сайтов сплайсинга. Если такая мутация затрагивает экзоны 1–5, то течение — с большим количеством менингиом, других опухолей и ранним началом — гораздо тяжелее, чем в случае, если изменение сайта сплайсинга происходит в других экзонах [2]. Мы для сравнения имеем только три случая с мутациями сайтов сплайсинга. В одном из них соматическое изменение начала гена (интрон 2) в сочетании со второй, герминальной, нонсенс-мутацией, действительно, ассоцииро-

вано с тяжёлым течением. В остальных двух случаях изменения приходятся на интроны 10 и 12 и ассоциированы с мягким течением: у одной пациентки с герминальной мутацией донорного сайта сплайсинга определён клинический подтип Гарднера (p.Arg447Lys), другой больной имеет мозаичную форму НФ2 (соматические мутации p.Tyr153Ter/c.1000-2A>G).

Согласно данным литературы, при мозаичной форме соотношение типов мутаций примерно такое же, как и среди больных, имеющих тяжёлое течение НФ2, что говорит, в частности, о том, что в мозаичных случаях проявляются только «тяжёлые» мутации. В нашей выборке в трёх мозаичных случаях одна из обнаруженных соматических мутаций — это нонсенс-мутация.

Более частные фенотипические маркёры (например, скорость роста ВШ, глазные аномалии и другие), по данным литературы, не обнаруживают тесных ассоциаций с мутациями определённого типа или локализации [2].

Нами не проводилось сравнительное исследование разных опухолей в связи с небольшим объёмом рассматриваемой выборки, хотя расширение работы и в этом направлении могло бы быть полезным. Арновиц с соавторами выявили значительные различия между опухолями разного вида по локализации и типу соматических мутационных событий [2]. Так, для менингиом достоверно определено, что более характерны мутации, приходящиеся на начало гена: на 5'-концевой домен. В другой работе показано, что различия в природе соматических мутаций в гене *NF2* не связаны с показателями роста опухолей [10].

Среди герминальных мутаций, с которыми было бы правомерно искать ассоциации фенотипа в нашем исследовании, определены 6 разных нонсенс-мутаций (в семьях 2, 6, 10, 5, 13, 14), 2 удвоения части гена *NF2* (в случаях 11 и 12), одна мутация сайта сплайсинга (в семье 17) и одна миссенс-мутация (в семье 9). Учитывая однородность группы по тяжести течения, а также недостаточность исследованной выборки, представляется невозможным определение статистически достоверных корреляций тяжести течения с типом мутации в нашей группе больных. Только у одной пациентки с герминальной мутацией сайта сплайсинга диагностирован мягкий клинический подтип Гарднера, больные с мозаичной формой с относительно мягким течением имеют среди определённых соматических мутаций одну терминальную. Таким образом, оказалось невозможным набрать даже небольшую подгруппу больных с мягким течением и мутацией, отличной от терминальной. Для проверки гипотезы о внутригрупповой подразделённости нашей выборки в связи с типом герминальной мутации, например с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни необходимо хотя бы небольшое её расширение. При увеличении количества данных станет также возможной проверка гипотезы о равномерном распределении частот мутаций разного типа в двух под-

группах больных: с тяжёлым и мягким течением, — с помощью критерия χ^2 .

Внутрисемейное клинико-генетическое сравнение

Многими авторами констатируется гетерогенность проявлений НФ2 в разных семьях при однотипном внутрисемейном течении заболевания при наличии герминальных мутаций. В случае предположения/подтверждения мозаицизма у одного из членов семьи возможно более лёгкое течение заболевания у данного индивида, обусловленное процентным соотношением поражённых клеток. Нам удалось проанализировать клиническое течение и дебют заболевания в трёх семьях.

Семья NF2: отец и дочь больны, у обоих начало в виде появления пигментных пятен: в 20 лет у отца и в 15 лет у дочери. В 27 лет у отца появились шаткость походки, снижение слуха, отклонение языка вправо, головные боли, тошнота, рвота, определены ДВШ, шванномы другой локализации и множественные менингиомы. У дочери течение похожее, однако, дебют на несколько лет раньше — в 15 лет; спустя 2 года после появления пигментных пятен — бурное тяжёлое течение с резким снижением слуха, головными болями, тошнотой, головокружением, сильной рвотой. В это время определён рост ДВШ, затем множественных внутримозговых менингиом. Обнаружена нонсенс-мутация p.Glu278Ter, у дочери как герминальная, у отца как соматическая, только в клоне клеток в опухоли, очевидно, отец — мозаик, передавший мутацию дочери. Возможно, более поздний дебют заболевания обусловлен наличием мозаицизма у отца, что не противоречит данным литературы.

Семья NF6: у сибсов — девочек — дебют в 15 лет в виде нарушения координации, шаткости походки, у одной сестры дополнительно к первым симптомам поперхивание и изменение голоса, у другой — диффузная мышечная гипотония, в 22 и 23 года у обеих снижение слуха, определены ДВШ и семейная герминальная носенс-мутация p.Arg196Ter, переданная от больной матери. У матери дебют в 40 лет со снижения слуха, в крови обнаружена семейная мутация p.Arg196Ter. У матери операции по удалению опухолей не проводились, впервые обследована в 56 лет, что говорит о мягком течении заболевания. МРТ-исследование матери выявило ДВШ и множественные небольшого размера менингиомы, которые не влияли на качество жизни и не вызывали тяжёлой неврологической симптоматики, выявленной у обеих девочек. Лёгкая клиническая картина и более поздний дебют заболевания дают возможность предположить наличие у матери мозаицизма по мутации p.Arg196Ter более чем в 10% лейкоцитов крови, так как удалось идентифицировать герминальную мутацию.

Семья NF10: сибсы мальчик и девочка, у обоих множественные интракраниальные и паравертебральные опухоли, у мальчика начало с подкожных нейрофибром в раннем детском возрасте, у девочки — с линейного невуса, также появившегося в первые годы жизни. У обоих сибсов определена герминальная нонсенс-мутация p.Arg198Ter, очевидно, переданная им от больной матери. Мать не оперирована, клиническая картина более мягкая, опухолевого материала от детей также не удалось получить.

Полученные результаты в трёх проанализированных семьях показывают наличие межсемейного клинического полиморфизма и более поздний дебют и мягкое течение заболевания у старшего поколения пациентов в семьях, предположительно обусловленный мозаицизмом.

Заключение

В результате проведённого исследования описана клиническая картина НФ2 у больных и налажено молекулярно-генетическое тестирование.

Основная трудность ДНК-диагностики связана с выявлением «причинной» мутации у мозаиков, так как приходится различать мозаицизм «первичный» и «вторичный»: мозаицизм по мутации, возникшей вторично только в одной опухоли, и мутации, которая возникла первично в некотором клоне клеток организма больного НФ2 и может быть передана потомству, — такая мутация должна быть обнаружена хотя бы в двух опухолях.

НФ2 — очень тяжёлое заболевание, значительно сокращающее жизнь пациентов. Мультидисциплинарный подход к лечению больных НФ2, при обследовании группой врачей, включая невролога, генетика, нейрохирурга, отоларинголога, радиолога, офтальмолога, онколога, педиатра, ДНК-диагностика, и своевременная постановка диагноза являются существенным вкладом в улучшение качества жизни пациентов.

Всё чаще НФ2 диагностируется в детском возрасте до установления очевидного факта развития вестибулярных шванном, при том, что средний возраст манифестации НФ2 составляет 20 лет и он соответствует времени выявления первых опухолей (обычная манифестация с падения слуха). Детские проявления НФ2 могут значительно отличаться, часто это внезапные мононейропатии, периферические нейропатии [6, 13]. Важными диагностическими признаками у детей в отягощённых НФ2 семьях являются катаракта и кожные поражения.

Применяемые критерии позволяют довольно точно диагностировать НФ2, они учитывают высокую долю мутаций *de novo*, мозаицизма по вновь возникшей мутации, а также специфику детских проявлений НФ2.

Список литературы

1. Васильева Т.А., Зинченко Р.А. Нейрофиброматоз II типа. Распространённость, клиника, ДНК-диагностика // Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №8(134). — С. 15–25.
2. Ahronowitz I., Xin W., Kiely R., Sims K., MacCollin M., Nunes F.P. Mutational spectrum of the NF2 gene: a meta-analysis of 12 years of research and diagnostic laboratory findings // Hum. Mutat. — 2007. — Vol. 28(1). — P. 1–12.
3. Baser M.E., Friedman J.M., Joe H., Shenton A., Wallace A.J., Ramsden R.T., Evans D.G. Empirical development of improved diagnostic criteria for neurofibromatosis 2 // Genet. Med. — 2011. — Vol. 13(6). — P. 576–581.
4. Baser M.E., Kuramoto L., Joe H., Friedman J.M., Wallace A.J., Gillespie J.E., Ramsden R.T., Evans D.G.R. Genotype-phenotype correlations for nervous system tumors in neurofibromatosis 2: a population-based study // Am. J. Hum. Genet. — 2004. — Vol. 75. — P. 231–239.
5. Bosch M.M., Boltshauser E., Harpes P., Landau K. Ophthalmologic findings and long-term course in patients with neurofibromatosis type 2 // Am. J. Ophthalmol. — 2006. — Vol. 141(6). — P. 1068–1077.
6. Evans D.G.R., Birch J.M., Ramsden R.T. Paediatric presentation of type 2 neurofibromatosis // Arch. Dis. Child. — 1999. — Vol. 81(6). — P. 496–499.
7. Evans D.G.R. Neurofibromatosis type 2 (NF2): a clinical and molecular review // Orphanet J. Rare Dis. — 2009. — Vol. 19. — P. 4–16.
8. Gerber P.A., Antal A.S., Neumann N.J., Homey B., Matuschek C., Peiper M., Budach W., Bolke E. Neurofibromatosis // Eur. J. Med. Res. — 2009. — Vol. 14(3). — P. 102–105.
9. Hadfield K.D., Smith M.J., Urquhart J.E., Wallace A.J., Bowers N.L., King A.T., Rutherford S.A., Trump D., Newman W.G., Evans D.G. Rates of loss of heterozygosity and mitotic recombination in NF2 schwannomas, sporadic vestibular schwannomas and schwannomatosis schwannomas // Oncogene. — 2010. — Vol. 29(47). — P. 6216–6221.
10. Irving R.M., Harada T., Moffat D.A., Hardy D.G., Whittaker J.L., Xuereb J.H., Maher E.R. Somatic neurofibromatosis type 2 gene mutations and growth characteristics in vestibular schwannoma // Am. J. Otol. — 1997. — Vol. 18(6). — P. 754–760.
11. Pecina-Slaus N., Zeljko M., Pecina H.I., Nikuseva Martić T., Bacic N., Tomas D., Hrascan R. Frequency of loss of heterozygosity of the NF2 gene in schwannomas from Croatian patients // Croat. Med. J. — 2012. — Vol. 53(4). — P. 321–327.
12. Rutledge M.H., Andermann A.A., Phelan C.M., Claudio J.O., Han F.-Y., Chretien N., Rangaratnam S., MacCollin M., Short P., Parry D., Michels V., Riccardi V.M., Weksberg R., Kitamura K., Bradburn J.M., Hall B.D., Propping P., Rouleau G.A. Type of mutation in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) frequently determines severity of disease // Am. J. Hum. Genet. — 1996. — Vol. 59. — P. 331–342.
13. Tibussek D., Hubsch S., Berger K., Schaper J., Rosenbaum T., Mayatepek E. Infantile onset neurofibromatosis type 2 presenting with peripheral facial palsy, skin patches, retinal hamartoma and foot drop // Klin. Padiatr. — 2009. — Vol. 221(4). — P. 247–250.

Clinical and molecular genetics study of neurofibromatosis type 2

Vasilyeva T.A.¹, Bessonova L.A.¹, Shimansky V.N.², Zinchenko R.A.¹, Kozlova V.M.³, Lubchenko L.N.³, Khlebnikova O.V.¹, Skoblov M.Y.¹, Petrova N.V.¹, Ginter E.K.¹

¹ — Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics» under Russian Academy of Medical Sciences, 115478, Russia, Moscow, Moskvorechye st., 1; e-mail: vasilyeva_debrie@mail.ru

² — Federal Budgetary State Institution «Burdenko Science and Research Neurosurgery Institute» under Russian Academy of Medical Sciences, 125047, Russia, Moscow, 4-th Tverskaya-Yamskaya st.16

³ — Federal State Budgetary Institution «Blohin Russian Oncology Science Center» under Russian Academy of Medical Sciences, 115478, Russia, Moscow, Kashirskoye shosse st. 23

For the first time in Russia a molecular diagnostics of neurofibromatosis type 2 (NF2) is carried out (for 20 patients from 15 families). As NF2 tumors develop under two NF2 gene hits condition in tissue we firstly tumor tissue DNA and then leucocytes DNA with . We find 20 mutations: p.Glu278Ter, p.Arg196Ter, p.Lys284Ter, p.Arg198Ter, p.Glu378Ter, p.Gln121Ter, p.Ser87Ter, p.Tyr153Ter, p.Arg57Ter, p.Val219Met, p.Arg335Trp, p.Tyr244Asp, p.Ala247Glu, p.Arg447Lys, c.241-3C>T, c.1000-2C>T, dup upstr-ex1, dup ex11-17, del ex 4, LOH in loci of chromosome 22 STR markers D22S929 and D22S444. Fourteen of them are novel. Genotype-phenotype correlations for the revealed mutations in NF2 gene are analyzed.

Key words: neurofibromatosis type 2, mutations in NF2 gene, genotype-phenotype correlations

Полиморфизм генов *VKORC1* и *CYP2C9* у больных с протезированными клапанами сердца Кузбасса

Гончарова И.А.^{1,2}, Горбунова Е.В.², Голубенко М.В.^{1,2}, Салахов Р.Р.², Макеева О.А.^{1,2}

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 634050, г.Томск; e-mail: irina.goncharova@medgenetics.ru

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 650002, г.Кемерово; e-mail: reception@cardio.kem.ru

У больных с протезированными клапанами сердца г.Кемерова оценены частоты аллельных вариантов (SNP) генов *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910) и *VKORC1* (rs9923231) методом TaqMan-генотипирования. Было показано, что в группе больных наблюдается отклонение от равновесия Харди–Вайнберга для rs1799853 гена *CYP2C9* вследствие избытка гетерозигот СТ и отсутствия гомозигот по мутантному аллелю, ассоциированному со сниженной активностью фермента. В целом, частоты аллелей и генотипов по всем изученным полиморфным вариантам находятся в пределах величин, характерных для популяций европеоидного происхождения и больных с сердечно-сосудистой патологией, принимающих антикоагулянты. Все изученные SNP статистически значимо связаны с индивидуальной терапевтической дозой варфарина. Однако наиболее существенное значение при назначении антикоагулянтной терапии имеет определение SNP rs9923231 гена *VKORC1*, поскольку наблюдаются наибольшие различия в необходимой терапевтической дозе варфарина между носителями различных генотипов (AA — 3,61 мг, AG — 4,25 мг, GG — 5,94 мг ($p = 9,7 \times 10^{-16}$)).

Ключевые слова: полиморфизм генов *CYP2C9*, *VKORC1*, фармакогенетика, больные с протезированными клапанами сердца

Введение

Данные генетических исследований служат теоретической основой предиктивной медицины, целью которой является предсказание предрасположенности к различным патологическим состояниям, особенностей течения заболеваний, а также возможного ответа на лекарственную терапию для каждого конкретного человека.

Среди лекарственных препаратов особое место занимают антикоагулянты, которые назначаются более чем 30 млн пациентов в год для предотвращения тромботических осложнений при различных патологиях или после оперативного вмешательства [13]. Точное определение терапевтической дозы антикоагулянтов, которая определяется, в том числе, и генетическим статусом пациента, является критическим моментом, поскольку неправильно подобранная доза препарата может привести к тяжёлым последствиям, таким, как фатальные кровотечения или тромботические осложнения. Полиморфизм генов, вовлечённых в метаболизм антикоагулянтов, является фактором, влияющим на подверженность различным заболеваниям и существенно изменяющим индивидуальную терапевтическую дозу препарата. Для данной группы генов показана значительная межрасовая, межэтническая и межпопуляционная вариабельность в распределении частот аллелей и генотипов, что, в свою очередь, может отражать этно- и популяционно-специфические особенности чувствительности к лекарственным препаратам.

Исследования, проведённые на территории России, немногочисленны и во многих случаях ограничиваются выборками менее 100 чел. В связи с этим, в настоящем исследовании были оценены частоты аллелей и генотипов по полиморфным вариантам генов *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910), *VKORC1* (rs9923231) и изучены их ассоциации с фактической терапевтической дозой варфарина, подобранной на основе данных фармакогенетического тестирования после протезирования клапанов сердца у больных г.Кемерова и Кемеровской области.

Материалы и методы

Генетическое тестирование было выполнено в группе русских пациентов, которым проводилось протезирование клапанов сердца на базе ФГБУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН, г.Кемерово. Группа состояла из 219 чел. — 125 женщин и 94 мужчины, средний возраст которых составил $54,4 \pm 9,5$ года. Генетическое тестирование включало в себя определение частот аллельных вариантов генов *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910) и *VKORC1* (rs9923231) методом TaqMan-генотипирования в режиме реального времени на приборе ViiATM 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Рекомендованная терапевтическая доза варфарина была рассчитана на основании данных о генетическом статусе пациентов по исследованным вариантам генов и наличию других негенетических факторов (заболевания печени, приём амиодарона

и статинов), учитываемых в алгоритме расчёта дозы препарата, представленном на сайте <http://www.warfarindosing.org>. Фактическая терапевтическая доза для каждого пациента была установлена на основании рекомендованной с последующей коррекцией на основании контроля уровня МНО (международное нормализованное отношение — показатель системы свёртывания крови). Проверка соответствия наблюдаемых частот генотипов распределению Харди—Вайнберга проводилась с помощью критерия χ^2 . Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов между группами больных г.Кемерово и другими группами лиц (данные научных публикаций) был выполнен с помощью критерия χ^2 , или двустороннего точного теста Фишера с поправкой Йетса на непрерывность.

Результаты и обсуждение

При оценке соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди—Вайнберга (РХВ) было выявлено отклонение от РХВ для полиморфного варианта rs1799853 гена *CYP2C9*, обозначаемого как *CYP2C9*2* (табл. 1). Отклонение было обусловлено избытком гетерозигот в исследованной группе больных, которая является смещённой выборкой относительно популяции, в целом, и может характеризоваться накоплением определённых генотипов.

При сравнении частот аллелей и генотипов изученных полиморфных вариантов между больными с протезированными клапанами сердца г.Кемерово и популяционными выборками г.Томска и г.Новосибирска не было выявлено различий по rs1799853 и rs1057910 гена *CYP2C9* (рисунок). Не было также выявлено различий между больными г.Кемерово, популяциями европеоидного происхождения и разными категориями больных, принимающих антикоагулянты, по rs9923231 гена

VKORC1 (табл. 2). Частота редкого аллеля А у больных г.Кемерово составила 41%, что находилось в пределах величин, показанных для других сравниваемых групп, где частота данного аллеля колебалась от 32,8% у жителей Финляндии до 47% у итальянцев (табл. 2). Были выявлены различия по распределению частот генотипов между сравниваемыми группами по полиморфному варианту rs1799853 гена *CYP2C9*. У больных с протезированными клапанами сердца г.Кемерово наблюдались более высокая частота гетерозиготного генотипа СТ (23,7%) по сравнению с жителями шт.Юта европеоидного происхождения (18,8%) и более низкая частота по сравнению с итальянской популяционной выборкой и больными, принимающими антикоагулянты (26,5 и 34,0% соответственно) (табл. 2). Частота редкого аллеля Т rs1799853 значимо не различалась между сравниваемыми группами (табл. 2.). Кроме того, изучаемая группа больных г.Кемерово характеризовалась большими значениями частот генотипа АС (13,7%) и аллеля С (6,8%) rs1057910 гена *CYP2C9*, обозначаемого как *CYP2C9*3*, по сравнению с больными с острым коронарным синдромом, где данные частоты составили 7,3% и 3,7% (табл. 2).

Особенности распределения частот аллелей и генотипов не только характеризуют межэтнические и межпопуляционные различия в структуре генофонда популяций человека, но и могут определять этноспецифические особенности предрасположенности к различным заболеваниям. Так, например, у представителей разных народностей с одним и тем же заболеванием могут быть связаны как одинаковые, так и разные аллели одних и тех же генов (одни и те же аллели гена *SLC11A1* ассоциированы с туберкулёзом у тувинцев и у русских; аллель 1188А гена *IL12B* ассоциирован с туберкулёзом у тувинцев, аллель 1188С — у русских) [6]. Может быть различной структура генетической подверженности одному и тому же заболеванию у представителей различных этно-

Таблица 1

Распределение частот аллелей и генотипов исследованных генов у больных с протезированными клапанами сердца г.Кемерово

Ген	Полиморфизм	Генотипы	N.O.	N.E.	χ^2 (d.f.=1) p	Частота аллеля (%)	$h_{obs} \pm s.e.$ $h_{exp} \pm s.e.$	D
<i>VKORC1</i>	rs9923231 -1639G>A	GG AG AA	75 (34,24) 108 (49,31) 36 (16,44)	75,99 106,03 36,99	0,08 0,777	G: 58,90 A: 41,10	0,49±0,03 0,48±0,01	+0,02
<i>CYP2C9*2</i>	rs1799853 430C>T	CC CT TT	167 (76,26) 52 (23,74) 0 (0)	170,03 45,83 3,09	3,97 0,046	C: 88,13 T: 11,87	0,24±0,03 0,21±0,02	+0,13
<i>CYP2C9*3</i>	rs1057910 1075A>C	AA AC CC	189 (86,30) 30 (13,70) 0 (0)	190,03 27,95 1,03	1,18 0,276	A: 93,15 C: 6,85	0,14±0,02 0,13±0,02	+0,07

Примечание. N.O. — наблюдаемая численность генотипов; N.E. — ожидаемая численность генотипов; критерий χ^2 использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди—Вайнберга; d.f. — число степеней свободы; $h_{obs} \pm s.e.$ и $h_{exp} \pm s.e.$ — соответственно наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность с ошибкой; D — относительное отклонение наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой; p — уровень значимости, полученный с помощью критерия χ^2

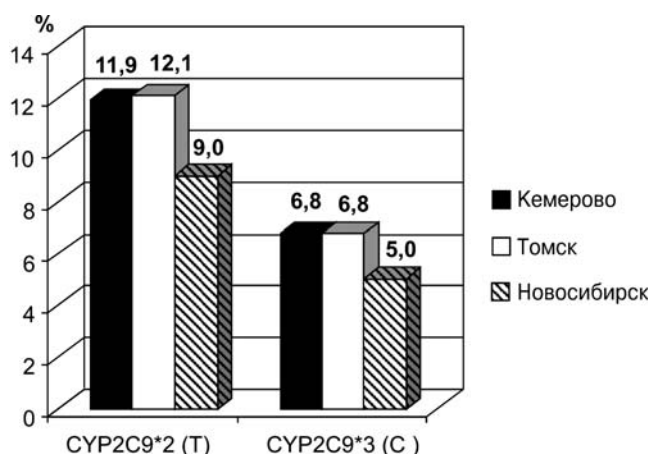
Частоты аллелей и генотипов исследованных генов между группой больных с протезированными клапанами сердца г. Кемерова в сравнении с разными выборками лиц европеоидного происхождения

SNP	Гено-тип, ал-лель	Распределение частот генотипов и аллелей (n, %)															
		г.Ке-меров-во	Европеоидные популяции*								Больные, принимающие антикоагулянты**						
			CEU	p	FIN	p	GBR	p	TSI	p	Италия ¹	p	Канада ²	p	США ³	p	
rs9923231	GG AG AA	75 (34,2) 108 (49,3) 36 (16,4)	31 (36,5) 34 (40,0) 20 (23,5)	0,235	43 (46,2) 39 (41,9) 11 (11,8)	0,125	32 (36,0) 49 (55,1) 8 (9,0)	0,232	28 (28,6) 47 (48,0) 23 (23,5)	0,287	67 (45,5) 58 (39,5) 22 (15)	0,085	236 (39,0) 277 (45,7) 92 (15,3)	0,460	—	—	
	A	180 (41,0)	74 (43,5)	0,649	61 (32,8)	0,063	65 (36,5)	0,336	93 (47,4)	0,159	102 (34,7)	0,095	461 (38,1)	0,295	—	—	
rs1799853	CC CT TT	167 (76,3) 52 (23,7) 0 (0)	65 (76,5) 16 (18,8) 4 (4,7)	0,004	76 (81,7) 17 (18,3) 0 (0)	0,360	74 (83,1) 14 (15,7) 1 (1,1)	0,093	69 (70,4) 26 (26,5) 3 (3,1)	0,026	97 (66,0) 50 (34,0) 0 (0)	0,042	462 (76,4) 138 (22,8) 5 (0,8)	0,371	589 (80,0) 147 (20,0) 0 (0)	0,266	
	T	52 (11,9)	24 (14,1)	0,538	17 (9,1)	0,392	16 (9,0)	0,371	32 (16,3)	0,161	50 (17,0)	0,063	148 (12,2)	0,911	147 (9,9)	0,296	
rs1057910	AA AC CC	189 (86,3) 30 (13,7) 0 (0)	76 (89,4) 9 (10,6) 0 (0)	0,591	82 (88,2) 11 (11,8) 0 (0)	0,791	79 (88,8) 10 (11,2) 0 (0)	0,692	85 (86,7) 13 (13,3) 0 (0)	0,941	122 (83,7) 24 (16,3) 0 (0)	0,567	526 (87,1) 76 (12,7) 1 (0,2)	0,768	708 (92,7) 56 (7,3) 0 (0)	0,005	
	C	30 (6,8)	9 (5,3)	0,604	11 (5,9)	0,798	10 (5,6)	0,702	13 (6,6)	0,944	24 (8,2)	0,583	78 (6,5)	0,870	56 (3,7)	0,006	

Примечание. p — уровень значимости, полученный при сравнении частот аллелей и генотипов в группе больных г. Кемерова и других, представленных в таблице выборок; * — представленные данные получены при выполнении проекта «1000 Genomes» (<http://www.ensembl.org>) в субпопуляциях европеоидного происхождения: CEU (Utah Residents with Northern and Western European ancestry) — жители штата Юта; FIN (Finnish in Finland) — финны; GBR (British in England and Scotland) — англичане и шотландцы; TSI (Toscani in Italy) — итальянцы; ** — группы больных европеоидного происхождения, принимающих антикоагулянты: ¹ — больные, принимающие антикоагулянты, с различными патологиями [11]; ² — пациенты с фибрилляцией предсердий [19]; ³ — пациенты с острым коронарным синдромом [21]

сов или популяций. Например, полиморфный вариант C677T гена *MTHFR* ассоциирован с преэклампсией у русских, но не у якутов [5].

Гены, принимающие участие в метаболизме ксенобиотиков, ещё в большей степени могут отражать этноспецифические особенности подверженности широко распространённым заболеваниям. Например, межрасовые различия в чувствительности к варфарину могут объясняться значительными различиями в частотах



Частоты редких аллелей rs1799853 и rs1057910 гена *CYP2C9* у больных с протезированными клапанами сердца г. Кемерова, в популяционных группах г. Томска [18] и г. Новосибирска [3]

функционально значимых SNP генов *VKORC1* и *CYP2C9*. Высокая частота аллелей, определяющих медленный метаболизм ксенобиотиков, у европеоидов объясняет более низкие дозы варфарина, необходимые для достижения целевых показателей МНО у европейцев относительно представителей негроидной расы [16]. В монголоидных популяциях распространённость аллелей медленного метаболизма также значимо ниже, чем у европейцев, однако необходимые дозы варфарина ещё более низкие. Это объясняется тем, что для популяций монголоидного происхождения в качестве генетических маркёров, эффективно предсказывающих дозу варфарина, выступают другие полиморфные варианты: -1565C>T, -1188T>C, IVS3+197G>A, IVS3-334C>T, IVS3-65G>C, IVS4-115A>G, IVS5-73A>G гена *CYP2C9* [17]. Ярким примером межэтнических различий в распределении частот некоторых генов метаболизма варфарина являются популяции коренных жителей Сибири. Например, показано, что по полиморфизму *CYP2C9**2 коренные самодийские этносы Северной Сибири (селькупы, ненцы, нганасаны) занимают промежуточное положение между европеоидными и монголоидными популяциями [2]. Коренные монголоидные популяции Сибири (тувинцы, буряты, якуты) по частотам аллелей данного SNP образуют единый кластер с другими популяциями монголоидного происхождения и значительно отличаются от русских г. Томска [18].

Существенные различия в частотах генов можно наблюдать между популяциями в пределах одной расы.

Частота редкого аллеля rs1057910 гена *CYP2C9* может колебаться от 3,7% у жителей штата Юта (США) до 8,2% у итальянцев (табл. 2). У русских Западной Сибири частота данного аллеля находится в пределах 5–6,8% в г.Новосибирске и г.Томске [3, 18]. У черкесов и караецев частота этого аллеля достигает 12,8 и 24,0% соответственно [4]. Однако, несмотря на значительные различия в частотах полиморфных вариантов гена *CYP2C9*, в целом, вариабельность по генам цитохромов меньше ожидаемой по сравнению с нейтральными ДНК маркерами (STR или Alu-повторы), что свидетельствует о том, что данные участки генома относительно консервативны и находятся под давлением естественного отбора [18].

Исследования сочетаний генотипов по двум SNP в гене *CYP2C9* заслуживают отдельного рассмотрения. Ещё в 1992 г. в экспериментальных исследованиях на культурах клеток было установлено, что микросомальный фермент *CYP2C9* отвечает за метаболизм варфарина [22]. Изучение структуры гена было начато в 1990-х годах [20]. Было выявлено, что замены нуклеотидов, приводящие к изменению аминокислотной последовательности белка, могут в значительной степени влиять на функциональную активность фермента и, в свою очередь, на метаболизм многих химических соединений, в том числе и варфарина [12]. К настоящему времени известно более 1400 полиморфных вариантов (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), наиболее значимыми из которых являются rs1799853 (Arg144Cys, 430C>T) и rs1057910 (Ple359Leu, 1075A>C). Известно, что *CYP2C9* входит в генный кластер совместно с генами *CYP2C18* и *CYP2C19* и образует крупный блок сцепления, высоко-

консервативный в различных популяциях человека [24]. Варианты rs1799853 и rs1057910, произошедшие независимо в пределах одного и того же предкового гаплотипа [14], имеют высокий коэффициент неравновесия по сцеплению ($D' > 0,9$), что приводит к меньшему количеству наблюдаемых сочетаний генотипов, чем при возможности свободной рекомбинации между данными локусами. Аббревиатура *CYP2C9*1*, *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* была введена для обозначения гаплотипов 144Arg359Ple, 144Cys359Ple и 144Arg359Leu соответственно [11]. Генотипы *CYP2C9*1/*1*, *CYP2C9*1/*2*, *CYP2C9*1/*3* соответствуют сочетанию генотипов CC/AA, CT/AA и CC/AC. Генотипы *CYP2C9*2/*2*, *CYP2C9*3/*3* являются гомозиготами по мутантным аллелям представленных SNP. Генотип *CYP2C9*2/*3* представляет собой компаунд-гетерозиготу и содержит гетерозиготный генотип по обоим заменам — CT/AC. Сочетания генотипов служат важным критерием, определяющим индивидуальную дозу варфарина, и могут значительно различаться между популяциями по частотам.

В настоящем исследовании при сравнении частот сочетаний генотипов по исследованным SNP гена *CYP2C9* у больных с протезированными клапанами сердца г.Кемерово с лицами, принимающими варфарин в связи с различными патологиями, не было выявлено различий между группами, кроме больных с фибрилляцией предсердий г.Москвы и Московской области (табл. 3). Различия выявлены за счёт более низкой частоты носителей генотипа *CYP2C9*1/*2* в данной группе по сравнению с больными г.Кемерово ($\chi^2 = 7,57$; $p = 0,005$).

Таблица 3

Частоты сочетаний генотипов полиморфных вариантов rs1799853 и rs1057910 гена *CYP2C9* у больных г.Кемерово и в группах лиц европеоидного происхождения с сердечно-сосудистой патологией

Сочетание генотипов	Кемерово	Москва [1]	χ^2 (p)	Санкт-Петербург [7]	χ^2 (p)	Велико-британия [8]	χ^2 (p)	Венгрия [10]	χ^2 (p)	Германия [9, 15]	χ^2 (p)
<i>CYP2C9*1/*1</i> (CC/AA)	145 (66,2)	131 (77,1)	10,13 0,02	202 (68,0)	6,27 0,18	84 (70,0)	6,97 0,14	209 (63,0)	5,81 0,32	882 (66,1)	7,78 0,10
<i>CYP2C9*1/*2</i> (CT/AA)	44 (20,1)	16 (9,2)		54 (18,2)		17 (14,2)		62 (18,7)		230 (17,2)	
<i>CYP2C9*1/*3</i> (CC/AC)	22 (10,0)	20 (11,7)		33 (11,1)		17 (14,2)		47 (14,1)		172 (12,3)	
<i>CYP2C9*2/*2</i> (TT/AA)	0 (0)	0 (0)		4 (1,3)		1 (0,8)		2 (0,6)		24 (1,2)	
<i>CYP2C9*2/*3</i> (CT/AC)	8 (3,7)	3 (2,0)		4 (1,3)		1 (0,8)		9 (2,7)		25 (1,3)	
<i>CYP2C9*3/*3</i> (CC/CC)	0 (0)	0 (0)		0 (0)		0 (0)		3 (0,9)		2 (0,1)	

Примечание. Значения χ^2 и уровня значимости p получены при сравнении частот генотипов больных с протезированными клапанами сердца г.Кемерово и больных с различными патологическими состояниями, принимающими варфарин: [1] — фибрилляция предсердий; [7] — пациенты с повышенным риском тромбозов; [10] — фибрилляция предсердий, протезированные клапаны сердца, ишемический инсульт; [8] — протезированные клапаны сердца, аневризма коронарных артерий, дилатационная кардиомиопатия, инсульт; [15] — инфаркт миокарда; [9] — протезированные клапаны сердца. Обозначение сочетаний генотипов *CYP2C9*2/CYP2C9*3* представлено в соответствии с номенклатурой комитета Human Cytchrome P450 Allele Nomenclature Committee [23]

**Зависимость фактической терапевтической дозы варфарина
от полиморфных вариантов генов *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910) и *VKORC1* (rs9923231)**

Ген	Генотип	Фактическая терапевтическая доза варфарина ($\bar{X} \pm \sigma$)	p
<i>CYP2C9</i> *2	CC	4,93 ± 1,73	0,0009874*
	CT	4,06 ± 1,33	
<i>CYP2C9</i> *3	AA	4,93 ± 1,65	8,195e-07*
	AC	3,38 ± 1,15	
<i>VKORC1</i>	AA	3,61 ± 1,36	9,667e-16**
	AG	4,25 ± 1,06	
	GG	5,94 ± 1,84	

Примечание. p — уровень значимости, полученный тестом Манна–Уитни (*); критерием Краскела–Уоллиса (**)

В большинстве популяций европеоидного происхождения выявлена ассоциация полиморфных вариантов rs9923231, rs1799853, rs1057910 генов *VKORC1* и *CYP2C9* с метаболизмом варфарина [4, 10, 11]. Однако, по некоторым данным, rs1799853 и rs1057910 не оказывают существенного влияния на дозу антикоагулянта, необходимого для достижения стабильных значений МНО у европейцев [9].

Проведение оценки зависимости фактической терапевтической дозы варфарина от полиморфных вариантов генов *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910) и *VKORC1* (rs9923231) у больных с протезированными клапанами сердца г. Кемерово показало, что все изученные варианты ассоциированы с терапевтической дозой варфарина, которая значимо различается у носителей разных генотипов в данной группе больных (табл. 4). Наиболее существенный вклад в межиндивидуальную изменчивость дозы препарата вносит SNP rs9923231 гена *VKORC1*, где наблюдаются наибольшие различия средних значений дозы препарата между носителями разных генотипов (табл. 4).

Таким образом, можно заключить, что изученная группа больных с протезированными клапанами сердца г. Кемерово характеризуется отклонением в распределении частот генотипов по полиморфному варианту rs1799853 гена *CYP2C9* вследствие избытка гетерозигот СТ и отсутствия гомозигот по мутантному аллелю, ассоциированному со сниженной активностью фермента. Несмотря на различия в распределении частот генотипов по SNP гена *CYP2C9* между группой г. Кемерово с некоторыми группами лиц, в целом, частоты аллелей, генотипов и сочетаний генотипов по всем изученным полиморфным вариантам находятся в пределах величин, характерных для популяций европеоидного происхождения и больных с сердечно-сосудистой патологией, принимающих антикоагулянты. Все изученные SNP статистически значимо связаны с индивидуальной терапевтической дозой варфарина. Среди изученных полиморфных вариантов наибольшее значение для определения индивидуальной чувствительности к варфарину у больных с протезированными клапанами сердца имеет SNP rs9923231 гена *VKORC1*.

Список литературы

1. Аксельрод А.С., Гиляров М.Ю., Генерозов Э.В. и др. Тромбоэмболические осложнения у пациентов с фибрилляцией предсердий: роль генетических факторов // Нарушения ритма сердца. — 2011. — №4. — С. 77–84.
2. Корчагина Р.П., Осипова Л.П., Вавилова Н.А. и др. Генетический полиморфизм цитохрома P450 2C9, участвующего в метаболизме лекарственных препаратов, в популяциях коренных жителей северной Сибири // Бюллетень СО РАМН. — 2011. — Т. 31, №6. — С. 39–46.
3. Кох Н.В., Цветовская Г.А., Новикова Я.В. и др. Вклад генетических маркеров в изменение терапевтической дозировки варфарина // Вестник НГУ. — 2011. — Т. 9, №4. — С. 148–154.
4. Ромадановский Д.Б., Хапаев Б.А., Игнатъев И.В. и др. Частоты «медленного» аллельных вариантов генов, кодирующих изоферменты цитохрома P450 CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 у карачаевцев и черкесов // Биомедицина. — 2010. — №2. — С. 33–37.
5. Павлова К.К., Трифонова Е.А., Готовцева Л.В., Максимова Н.Р., Ноговицына А.Н., Степанов В.А. Роль полиморфизмов генов eNOS, ACE и MTHFR в развитии гестоза в якутской популяции // Якутский медицинский журнал. — 2010. — Т. 3, №31. — С. 28–31.
6. Пузырев В.П., Фрейдин М.Б., Кучер А.Н. Генетическое разнообразие народонаселения и болезни человека. — Изд-во ООО «Печатная мануфактура», 2007. — 320 с.
7. Сироткина О.В., Улитина А.С., Тараскина А.Е. и др. Аллельные варианты CYP2C9*2 и CYP2C9*3 гена цитохрома CYP2C9 в популяции Санкт-Петербурга и их клиническое значение при антикоагулянтной терапии варфарином // Рос. кардиол. журн. — 2004. — Т. 6. — С. 47–50.
8. Biss T.T., Avery P.J., Brandao L.R. et al. VKORC1 and CYP2C9 genotype and patient characteristics explain a large proportion of the variability in warfarin dose requirement among children // Blood. — 2012. — Vol. 119, №3. — P. 868–873.
9. Brehm K., Schacka J., Heilmann C. et al. Mechanical heart valve recipients: anticoagulation in patients with genetic variations of phenprocoumon metabolism // European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. — 2013. — P. 1–7. doi:10.1093/ejcts/ezt002.
10. Buzoianu A.D., Trifa A.P., Mures D.F. et al. Analysis of CYP2C9*2, CYP2C9*3 and VKORC1 -1639 G>A polymorphisms in a population from South-Eastern Europe // J. Cell. Mol. Med. — 2012. — Vol. 16, №12. — P. 2919–2924.
11. D'Andrea G., D'Ambrosio R.L., Perna P.D. et al. Apolymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin // Blood. — 2005. — Vol. 105. — P. 645–649.

12. Daly A.K. Molecular basis of polymorphic drug metabolism // *J. Mol. Med.* — 1995. — Vol. 73, №11. — P. 539–553.
13. Daneshjou R., Tatonetti N.P., Karczewski K.J. et al. Pathway analysis of genome-wide data improves warfarin dose prediction // *BMC Genomics.* — 2013. — 14 (Suppl. 3). — S11.
14. Krynetskiy E., McDonnell P. Building Individualized Medicine: Prevention of Adverse Reactions to Warfarin Therapy // *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* — 2007. — Vol. 322, №2. — P. 427–434.
15. Haschke-Becher E., Kirchheiner J., Trummer O. et al. Impact of CYP2C8 and 2C9 polymorphisms on coronary artery disease and myocardial infarction in the LURIC cohort // *Pharmacogenomics.* — 2010. — Vol. 10. — P. 1359–1365.
16. Johnson J.A. Ethnic Differences in Cardiovascular Drug Response Potential Contribution of Pharmacogenetics // *Circulation.* — 2008. — Vol. 118. — P. 1383–1393.
17. Lee Su-Jun, Jang Y.J., Cha E.-Y. et al. A haplotype of CYP2C9 associated with warfarin sensitivity in mechanical heart valve replacement patients // *British Journal of Clinical Pharmacology.* — 2010. — Vol. 70, №2. — P. 213–221.
18. Makeeva O., Stepanov V., Puzyrev V. et al. Global pharmacogenetics: genetic substructure of Eurasian populations and its effect on variants of drug-metabolizing enzymes // *Pharmacogenomics.* — 2008. — Vol. 9, №7. — P. 847–868.
19. Marin-Leblanc M., Perreault S., Bahroun I. et al. Validation of warfarin pharmacogenetic algorithms in clinical practice // *Pharmacogenomics.* — 2012. — Vol. 13. — P. 21–29.
20. Morais S.M., Schweikl H., Blaisdell J., Goldstein J.A. Gene structure and upstream regulatory regions of human CYP2C9 and CYP2C18 // *Biochemical and Biophysical research communications.* — 1993. — Vol. 194, №1. — P. 194–201.
21. Morgan T.M., Xiao L., Lyons P. et al. Investigation of 89 candidate gene variants for effects on all-cause mortality following acute coronary syndrome // *BMC Medical Genetics.* — 2008. — P. 1–9. doi:10.1186/1471-2350-9-66.
22. Rettie A.E., Korzekwa K.R., Kunze K.L. et al. Hydroxylation of Warfarin by Human cDNA-Expressed Cytochrome P-450: A Role for P-450C9 in the Etiology of (S)-Warfarin-Drug Interactions // *Chem. Res. Toxicol.* — 1992. — Vol. 5. — P. 54–59.
23. Takahashi H., Echizen H. Pharmacogenetics of Warfarin Elimination and its Clinical Implications // *Clin. Pharmacokinet.* — 2001. — Vol. 40, №8. — P. 587–603.
24. Walton R., Kimber M., Rockett K. et al. Haplotype block structure of the cytochrome P450 CYP2C gene cluster on chromosome 10 // *Nature genetics.* — 2005. — Vol. 37, №9. — P. 915–916.

Polymorphism of *VKORC1* and *CYP2C9* genes in patients with cardiac valve prostheses

Goncharova I.A.^{1,2}, Gorbunova E.V.², Golubenko M.V.^{1,2}, Salakhov R.R.², Makeeva O.A.^{1,2}

¹ — Research Institute of Medical Genetics Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, 10 Nab. Ushaiki, Tomsk, 634050, Russia

² — Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, 6 Sosnovy blvd, Kemerovo, 650002, Russia

In patients with cardiac valve prostheses from Kemerovo city (N = 216; 122 women and 94 men) frequencies of alleles in *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910) and *VKORC1* (rs9923231) genes were estimated using TaqMan genotyping. It has been shown that in the patient group there is deviation from Hardy–Weinberg equilibrium due to excess of CT heterozygotes and absence of homozygotes on «mutant» allele which is associated with decreased enzyme activity. At large, allele and genotype frequencies of all studied variants are within the range of those typical for European populations and patients with cardiovascular diseases receiving anticoagulants. All SNPs studied are significantly associated with individual therapeutic warfarin dose. SNP rs9923231 in *VKORC1* is the most significant in determination of individual warfarin sensitivity in patients with cardiac valve prostheses (AA — 3,61 mg, AG — 4,25 mg, GG — 5,94 mg ($p = 9,7 \times 10^{-16}$)).

Key words: genetic polymorphism *CYP2C9*, *VKORC1*, pharmacogenetics, warfarin sensitivity, patients with cardiac valve prostheses

Содержание журнала «Медицинская генетика» в 2013 г.

Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №1 (127)

Научные обзоры

Мглинец В.А. Генетика развития вестибулярной системы	3
Тошakov С.В., Доминова И.Н., Патрушев М.В. Технологии высокопараллельного секвенирования в медико-генетических исследованиях	15
Никитина Т.В., Кашеварова А.А., Скрыбин Н.А., Чечеткина Н.Н., Мельников А.А., Лебедев И.Н. Молекулярное кариотипирование (aCGH) как современный подход к исследованию причин невынашивания беременности	26

Оригинальные исследования

Герасимова К.В., Авксентьева М.В., Сычев Д.А., Чикало А.О., Гаврисюк Е.В., Кулес В.Г. Клинико-экономический анализ применения фармакогенетического тестирования для персонализации дозирования непрямого антикоагулянта варфарина в клинической практике	36
Машкина Е.В., Коваленко К.А., Гутникова Л.В., Деревянчук Е.Г., Шкурят Т.П. Ассоциация полиморфных вариантов генов фолатного цикла и интегринов с невынашиванием беременности	40

Краткие сообщения

Ельчинова Г.И., Эльканова Л.А., Васильева Т.А., Зинченко Р.А. Медико-генетическое изучение населения Татарстана. Сообщение 4. Гаметный индекс	46
--	----

Информация

Правила оформления статей в журнале «Медицинская генетика»	50
---	----

Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №2 (128)

Научные обзоры

Мглинец В.А. Генетические нарушения вестибулярной системы	3
Туманов А.С. Влияние генетических факторов человека на высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ)	13

Оригинальные исследования

Гордеева Е.Г., Сорокина Т.М., Шилейко Л.В., Остроумова Т.В., Борзова О.С., Магомедова Х.Д., Кузина Н.Ю., Баркова О.В., Курило Л.Ф. Частота встречаемости гамет с анеуплоидией у мужчин с нарушением репродуктивной функции и патозооспермией	18
Мещерякова Т.И., Маркова С.И., Жилина С.С., Гончаков Г.В., Гончакова С.Г., Абрамов А.А., Петрин А.Н., Мутовин Г.Р. Полиморфизм <i>С677Т</i> гена <i>MTHFR</i> и риск формирования несиндромальных орофациальных расщелин	25

Бурденный А.М., Казубская Т.П., Брага Э.А., Носиков В.В., Логинов В.И. Ассоциация генов <i>TP53</i> и <i>MDM2</i> с риском развития рака молочной железы у русских женщин Московского региона	28
---	----

Кузнецова Е.Б., Пудова Е.А., Танас А.С., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. <i>SEMA6B</i> — кандидат на роль гена супрессора опухолевого роста в критическом хромосомном районе 19p13.3	32
--	----

Случай из практики

Федотов В.П., Галеева Н.М., Поляков А.В. Мезомелическая дисплазия с преаксиальной полидактилией Вернера, обусловленная мутацией в регуляторном элементе ZRS гена <i>SHH</i>	37
--	----

Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №3 (129)

Научные обзоры

Тюрин А.В., Хусаинова Р.И., Давлетшин Р.А., Хуснутдинова Э.К. Современные представления о патогенезе и генетике остеоартрита	3
Зайнуллина А.Г., Халилова З.Л., Хуснутдинова Э.К. Генетические аспекты суицидального поведения	11
Ржанинова А.А., Омельченко Д.О., Федюнина И.А. Неопластическая трансформация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в культуре <i>in vitro</i>	20

Оригинальные исследования

Лепендина И.Н., Сорокина И.Н., Рудых Н.А., Балановская Е.В., Чурносков М.И. Своеобразие генофонда русского и украинского населения Белгородской области (по данным о полиморфизме шести <i>Alu</i> -инсерций)	29
Сорокина И.Н., Крикун Е.Н., Чурносков М.И. «Территориальный» подход к отбору фамилий при популяционно-генетическом исследовании населения Юга Центральной России	38

Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №4 (130)

Научные обзоры

Азимова Ю.Э., Климов Е.А., Скоробогатых К.В., Сергеев А.В., Кокаева З.Г., Табеева Г.Р. Генетические основы гемиплегической мигрени	3
Степанов В.А., Канделария П., Кхо С., Жанг Г., Трифонова Е.А., Симонова К.В., Бочарова А.В., Лайнг И.А., Хайден К., Баккер В., Бьеррегаард П., Линч Н., Хагель И., Маск А.У., Битлз А., Голдблатт Дж., Ле Сёф П. Деканализация иммунного ответа при расселении современного человека: связь генетического разнообразия в генах иммунной системы с климато-географическими факторами	8

Оригинальные исследования

- Курбатова И.В., Топчиева Л.В., Корнева В.А., Коломейчук С.Н., Немова Н.Н.**
Экспрессия генов циркадного ритма *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в клетках буккального эпителия у больных эссенциальной артериальной гипертензией19
- Бабушкина Н.П., Кучер А.Н., Лебедев И.Н., Васильев С.А., Тимошевский В.А., Брагина Е.Ю., Суханова Н.Н., Торхова Н.Б., Яковлева Ю.С.**
Ассоциации полиморфных вариантов генов репарации ДНК и метаболизма ксенобиотиков с уровнем хромосомных нарушений в лимфоцитах человека27
- Лысогорская Е.В., Абрамычева Н.Ю., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н.**
Частота мутаций в гене *SOD1* у российских пациентов с боковым амиотрофическим склерозом32
- Краткое сообщение**
- Степанов В.А., Трифонова Е.А., Симонова К.В., Чередниченко А.А.**
Вариабельность генов интерлейкина 4 и его рецептора в популяциях коренных народов Сибири38

Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №5 (131)**Оригинальные исследования**

- Васильева Т.А., Петрова Н.В., Тимковская Е.Е., Ельчинова Г.И., Зинченко Р.А., Гинтер Е.К.**
Медико-генетическое изучение населения Республики Татарстан. Сообщение VI. Популяционно-генетическое изучение этногеографических групп татар (анализ девяти полиморфных ДНК-локусов ядерного генома)3
- Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Ветрова Н.В., Амелина М.А., Петрин А.Н., Амелина С.С.**
Эпидемиология наследственных болезней в детском населении 12 районов Ростовской области. Отягощённость наследственными болезнями и генетическая структура популяции21
- Рыжкова О.П., Дадали Е.Л., Руденская Г.Е., Поляков А.В.**
Частота кальпаинопатии и причина распространённости мутации с.550delA в гене *CAPN3* в Российской Федерации29
- Осадчук Т.В., Румянцева Н.В.**
Анализ мутаций в гене *MPZ* в группе белорусских пациентов с наследственной моторно-сенсорной невропатией35
- Баранова Е.Е., Сергеев А.С., Иванова Л.Ю., Журавлева И.В., Ижевская В.Л., Гинтер Е.К.**
Комплексная оценка эффективности медико-генетического консультирования. Сообщение I. Анализ медико-социальных характеристик консультирующихся42

Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №6 (132)**Научные обзоры**

- Рахимкулова А.А., Ахметова В.Л., Малиевский О.А., Хуснутдинова Э.К.**
Врождённая дисфункция коры надпочечников: клинико-генетические аспекты3

- Надыршина Д.Д., Хусаинова Р.И., Хуснутдинова Э.К.**
Молекулярно-генетические основы несовершенного остеогенеза15

Оригинальные исследования

- Терютин Ф.М., Барашков Н.А., Пшенникова В.Г., Соловьев А.В., Кларов Л.А., Кожевников А.А., Васильева Л.М., Федотова Э.Е., Пак М.В., Леханова С.Н., Соловьева Н.А., Рафаилов А.М., Алексеев А.Н., Посух О.Л., Джемилова Л.У., Хуснутдинова Э.К., Федорова С.А.**
Гетерозиготное носительство мутации сайта сплайсинга IVS1+1G>A в гене *GJB2* (Cx26) — фактор риска возрастных изменений слуха (пресбиакузис) в популяции якутов24
- Киселева О.А., Ижевская В.Л., Журавлева А.Н., Халилов Ш.А.**
Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов коллагена I и III типа с первичной открытоугольной глаукомой33
- Гордеева Е.Г., Окунева Е.Г., Сорокина Т.М., Шилейко Л.В., Курило Л.Ф.**
Анализ мейотической сегрегации хромосом 1 и 11 у носителя сбалансированной реципрокной транслокации t(1;11)(q44;q21)38

Информация

- Правила оформления статей в журнале «Медицинская генетика»44

Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №7 (133)**Оригинальные исследования**

- Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Амелина С.С., Амелина М.А., Ветрова Н.В., Векшина А.Б., Игумнов П.С., Евдокименков В.Н., Ревазова Ю.А., Гинтер Е.К.**
Картографический анализ параметров генетической структуры населения Ростовской области3
- Магжанов Р.В., Сайфуллина Е.В., Идрисова Р.Ф., Ахметгалеева А.Ф., Хидиятова И.М., Хуснутдинова Э.К.**
Эпидемиологическая характеристика наследственных спастических параличей в Республике Башкортостан12
- Ляхович А.В., Епанчинцев А.Ю., Степанов В.А.**
Паракринные факторы в клетках с мутациями в гене *FANCD2* анемии Фанкони способствуют миграции, инвазии и уменьшают адгезию соседствующих клеток17
- Батенева Е.И., Кадочникова В.В., Трофимов Д.Ю., Филиппова М.Г., Мещеряков А.А., Любченко Л.Н.**
Обоснование состава диагностической панели для генетического тестирования больных раком молочной железы и/или раком яичников: спектр частых мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* в российской популяции26
- Ижевская В.Л., Иванова Л.Ю., Борзов Е.А., Журавлева И.В., Гинтер Е.К.**
Результаты анкетирования родителей больных фенилкетонурией детей. 1. Социально-демографические характеристики респондентов и их отношение к диагностике и лечению заболевания у ребёнка32

ИНФОРМАЦИЯ

- Головатая Е.И., Прибушена О.В.,
Лазюк Г.И., Бойша А.С.
Исходы беременностей
в семьях носителей робертсоновских транслокаций41

Информация

- VI Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров47
- Научная конференция
«Актуальные проблемы клинической генетики редких болезней».1
-е информационное письмо48

Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №8 (134)

Научные обзоры

- Джемилева Л.У., Загидуллина А.Ш., Лобов С.Л.,
Кузнецов Д.Ю., Хасанова Р.Р., Зайнитова А.Р.,
Валеев Р.Р., Хуснутдинова Э.К.
Молекулярно-генетические аспекты
патогенеза первичной открытоугольной глаукомы3

- Васильева Т.А., Зинченко Р.А.
Нейрофиброматоз II типа.
Распространённость, клиника, ДНК-диагностика15

Оригинальные исследования

- Рыжкова О.П., Дадали Е.Л., Руденская Г.Е.,
Комарова Н.В., Поляков А.В.
Частота поясно-конечностной мышечной дистрофии типа 2I
в Российской Федерации26

- Корытина Г.Ф., Ахмадишина Л.З., Кочетова О.В.,
Бурдюк Ю.В., Загидуллин Ш.З., Викторова Т.В.
Ассоциация полиморфных локусов
генов ферментов биотрансформации и антиоксидантой защиты
с развитием и прогрессированием
хронической обструктивной болезни лёгких32

- Баранова Е.Е., Сергеев А.С., Иванова Л.Ю.,
Журавлева И.В., Ижевская В.Л., Гинтер Е.К.
Комплексная оценка
эффективности медико-генетического консультирования.
Сообщение II.
Влияет ли наличие в семье больного ребёнка
на подготовленность42

Информация

- VI Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров47
- Научная конференция
«Актуальные проблемы
клинической генетики редких болезней»48

Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №9 (135)

Материалы научной конференции

«Актуальные проблемы клинической генетики редких болезней», Москва, 5—6 декабря 2013 г.

- Новиков П.В.
Редкие (орфанные) заболевания в Российской Федерации:
актуальная проблема и возможные пути её решения3

- Симакова Т.С., Брагин А.Г., Зайцева М.А., Павлов А.Е.
Роль высокопроизводительного секвенирования
в неонатальном скрининге
наследственных нарушений обмена веществ11

- Воскобоева Е.Ю., Калашникова Е.А., Юткин Е.В.,
Митюшина Н.Г., Базанов П.А.
Преимплантационная диагностика
наследственных заболеваний15

- Назаренко Л.П., Назаренко М.С.
Особенности раннего проявления
лизосомных болезней накопления20

- Михайлова С.В., Захарова Е.Ю., Дегтярева А.В.,
Печатникова Н.Л., Какаулина В.С., Полякова Н.А.
Болезнь Ниманна—Пика типа С у детей25

- Фёдоров Е.С., Салугина С.О.,
Кузьмина Н.Н., Захарова Е.Ю.
Аутовоспалительные синдромы (АВС) —
молекулярно-генетические механизмы,
клиника, диагностика, лечение34

- Трефц К.Ф. (Германия)
Организация помощи
при фенилкетонурии и гиперфенилаланинемии,
вызванной нарушением обмена тетрабиоптерина:
современные достижения и перспективы47

Информация

- VI Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров48

Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №10 (136)

Материалы научной конференции «Актуальные проблемы клинической генетики редких болезней», Москва, 5—6 декабря 2013 г.

- Степанова А.А., Поляков А.В.
Молекулярная диагностика
и генетическая гетерогенность гиперфенилаланиемий3

- Карева М.А., Блох С.П., Иванова О.Н., Петеркова В.А.
Эпидемиология и генетика адреногенитального синдрома7

- Мешков А.Н.
Регистр больных с семейной гиперхолестеринемией12

Научные обзоры

- Доминова И.Н., Парадник Д.Ю.,
Патрушев М.В., Тошаков С.В.
Современные методы
неинвазивной пренатальной диагностики анеуплоидий16

Оригинальные исследования

- Мирошникова В.В., Пантелеева А.А., Демина Е.П.,
Курьянов П.С., Вавилов В.Н., Уразгильдеева С.А.,
Гуревич В.С., Сироткина О.С., Шварцман А.Л.
Ассоциация полиморфных вариантов гена транспортера ABCG1
с концентрацией холестерина плазмы крови
при атеросклерозе23

- Ахмадишина Л.З., Корытина Г.Ф., Кочетова О.В.,
Урманцев М.Ф., Измайлов А.А., Измайлова С.М.,
Павлов В.Н., Викторова Т.В.
Поиск маркеров риска развития рака мочевого пузыря
на основе изучения полиморфных вариантов
генов системы *Ahr-CYP*29

- Ворожищева А.Ю., Трифонова Е.А., Бутко Ю.К.,
Сереброва В.Н., Максимова Н.Р., Павлова К.К.,
Габидулина Т.В., Степанов В.А.
Роль генетической вариативности локуса *ACVR2A*
в формировании подверженности преэклампсии35

Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №11 (137)**Научные обзоры**

- Хусаинова Р.И., Мальцев А.В., Хуснутдинова Э.К.
Роль микроРНК в развитии остеопороза3
- Руденская Г.Е., Захарова Е.Ю.
Поздний нейрональный цероид-липофусциноз
(болезнь Куфса)12

Оригинальные исследования

- Капранов Н.И., Красовский С.А.,
Кондратьева Е.И., Каширская Н.Ю., Петрова Н.В.,
Черняк А.В., Никонова В.С., Шерман В.Д.,
Воронкова А.Ю., Шабалова Л.А.
Клинико-генетическая характеристика муковисцидоза
в московском регионе17
- Шерман В.Д., Капранов Н.И.,
Каширская Н.Ю., Кондратьева Е.И.
Роль неонатального скрининга в оптимизации
медицинской помощи больным муковисцидозом в РФ24
- Костюк С.В., Ершова Е.С., Вейко Н.Н.
Хроническое действие ионизирующего излучения
вызывает значительное снижение
концентрации циркулирующей ДНК плазмы крови29
- Каримов Д.О., Бакиров Б.А.,
Бакиров А.Б., Викторова Т.В.
Полиморфизм генов
регуляторов апоптоза и факторов роста
у больных хроническим лимфолейкозом35
- Брагина Е.Ю., Рудко А.А., Фрейдин М.Б.,
Салтыкова И.В., Ан А.Р., Гараева А.Ф.,
Конева Л.А., Мингареева К.В., Воробьева Н.А.,
Огородова Л.М., Пузырев В.П.
Ассоциация полиморфизма генов Th1/Th2
поляризации иммунного ответа
с иммунологически «полярными» заболеваниями
(бронхиальная астма и туберкулёз)40
- Случай из практики**
- Антоненко В.Г., Миньженкова М.Е., Козлова Ю.О.,
Коталевская Ю.Ю., Шестопалова Е.А., Кисленко О.А.,
Казанцева И.А., Шилова Н.В., Золотухина Т.В.
Три случая синдрома Смит–Магенис
у детей первого года жизни
с врождёнными пороками сердца44

Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №12 (138)**Научные обзоры**

- Капранов Н.И., Кондратьева Е.И., Ашерова И.К.,
Петрова Н.В., Каширская Н.Ю.
Молекулярные основы создания
новых лекарственных средств
при муковисцидозе3

Оригинальные исследования

- Рудко А.А., Гараева А.Ф., Брагина Е.Ю.,
Бабушкина Н.П., Колоколова О.В.,
Липаенкова О.Н., Фрейдин М.Б.
Скрининг мутаций
генов атипичных семейных микобактериозов14
- Костюк С.В., Ершова Е.С.,
Конорова И.Л., Вейко Н.Н.
Хроническое действие ионизирующего излучения
вызывает увеличение
содержания рибосомного повтора
в составе циркулирующей ДНК плазмы крови20
- Васильева Т.А., Бессонова Л.А.,
Шиманский В.Н., Зинченко Р.А.,
Козлова В.М., Любченко Л.Н.,
Хлебникова О.В., Скоблов М.Ю.,
Петрова Н.В., Гинтер Е.К.
Клинико-молекулярно-генетическое исследование
нейрофиброматоза 2 типа28
- Гончарова И.А., Горбунова Е.В., Голубенко М.В.,
Салахов Р.Р., Макеева О.А.
Полиморфизм генов *VKORC1* и *CYP2C9*
у больных с протезированными клапанами сердца
Кузбасса42

Информация

- Содержание
журнала «Медицинская генетика» в 2013 г.48
- Алфавитный указатель
авторов журнала «Медицинская генетика» в 2013 г.52
- VI Съезд
Вавиловского общества
генетиков и селекционеров55
- Правила оформления статей
в журнале «Медицинская генетика»56

Алфавитный указатель авторов журнала «Медицинская генетика в 2013 г.

Абрамов А.А.	№2. — С. 25	Вавилов В.Н.	№10. — С. 23	Дадали Е.Л.	№5. — С. 29
Абрамычева Н.Ю.	№4. — С. 32	Валеев Р.Р.	№8. — С. 3		№8. — С. 26
Авксентьева М.В.	№1. — С. 36	Васильев С.А.	№4. — С. 27	Дегтярева А.В.	№9. — С. 25
Азимова Ю.Э.	№4. — С. 3	Васильева Л.М.	№6. — С. 24	Демина Е.П.	№10. — С. 23
Алексеев А.Н.	№6. — С. 24	Васильева Т.А.	№1. — С. 46	Деревянчук Е.Г.	№1. — С. 40
Амелина М.А.	№5. — С. 21		№5. — С. 3	Джемилева Л.У.	№6. — С. 24
.	№7. — С. 3		№8. — С. 15		№8. — С. 3
Амелина С.С.	№5. — С. 21		№12. — С. 28	Доминова И.Н.	№1. — С. 15
.	№7. — С. 3	Вейко Н.Н.	№11. — С. 29		№10. — С. 16
Ан А.Р.	№11. — С. 40		№12. — С. 20	Евдокименков В.Н.	№7. — С. 3
Антоненко В.Г.	№11. — С. 44	Векшина А.Б.	№7. — С. 3	Ельчинова Г.И.	№1. — С. 46
Ахмадишина Л.З.	№8. — С. 32	Ветрова Н.В.	№5. — С. 21		№5. — С. 3
.	№10. — С. 35		№7. — С. 3		№5. — С. 21
Ахметгалеева А.Ф.	№7. — С. 12	Викторова Т.В.	№8. — С. 32		№7. — С. 3
Ахметова В.Л.	№6. — С. 3		№10. — С. 29	Епанчинцев А.Ю.	№7. — С. 17
Ашерова И.К.	№12. — С. 3		№11. — С. 35	Ершова Е.С.	№11. — С. 29
Бабушкина Н.П.	№4. — С. 27	Воробьева Н.А.	№11. — С. 40		№12. — С. 20
.	№12. — С. 14	Ворожищева А.Ю.	№10. — С. 35	Жанг Г.	№4. — С. 8
Базанов П.А.	№9. — С. 15	Воронкова А.Ю.	№11. — С. 17	Жилина С.С.	№2. — С. 25
Бакиров А.Б.	№11. — С. 35	Воскобоева Е.Ю.	№9. — С. 15	Журавлева А.Н.	№6. — С. 33
Бакиров Б.А.	№11. — С. 35	Габидулина Т.В.	№10. — С. 35	Журавлева И.В.	№5. — С. 42
Баккер В.	№4. — С. 8	Гаврисюк Е.В.	№1. — С. 36		№7. — С. 32
Балановская Е.В.	№3. — С. 29	Галеева Н.М.	№2. — С. 37		№8. — С. 42
Баранова Е.Е.	№5. — С. 42	Гараева А.Ф.	№11. — С. 40	Загидуллин Ш.З.	№8. — С. 32
.	№8. — С. 42		№12. — С. 14	Загидуллина А.Ш.	№8. — С. 3
Барашков Н.А.	№6. — С. 24	Герасимова К.В.	№1. — С. 36	Зайнитова А.Р.	№8. — С. 3
Баркова О.В.	№2. — С. 18	Гинтер Е.К.	№5. — С. 3	Зайнуллина А.Г.	№3. — С. 11
Батенева Е.И.	№7. — С. 26		№5. — С. 42	Зайцева М.А.	№9. — С. 11
Бессонова Л.А.	№12. — С. 28		№7. — С. 3	Залетаев Д.В.	№2. — С. 32
Битлз А.	№4. — С. 8		№7. — С. 32	Захарова Е.Ю.	№9. — С. 25
Блох С.П.	№10. — С. 7		№8. — С. 42		№9. — С. 34
Бойша А.С.	№7. — С. 41		№12. — С. 28		№11. — С. 12
Борзов Е.А.	№7. — С. 32	Голдблатт Дж.	№4. — С. 8	Захарова М.Н.	№4. — С. 32
Борзова О.С.	№2. — С. 18	Головатая Е.И.	№7. — С. 41	Зинченко Р.А.	№1. — С. 46
Бочарова А.В.	№4. — С. 8	Голубенко М.В.	№12. — С. 42		№5. — С. 3
Брага Э.А.	№2. — С. 28	Гончаков Г.В.	№2. — С. 25		№5. — С. 21
Брагин А.Г.	№9. — С. 11	Гончакова С.Г.	№2. — С. 25		№7. — С. 3
Брагина Е.Ю.	№4. — С. 27	Гончарова И.А.	№12. — С. 42		№8. — С. 15
.	№11. — С. 40	Горбунова Е.В.	№12. — С. 42		№12. — С. 28
.	№12. — С. 14	Гордеева Е.Г.	№2. — С. 18	Золотухина Т.В.	№11. — С. 44
Бурденный А.М.	№2. — С. 28		№6. — С. 38	Иванова Л.Ю.	№5. — С. 42
Бурдюк Ю.В.	№8. — С. 32	Гуревич В.С.	№10. — С. 23		№7. — С. 32
Бутко Ю.К.	№10. — С. 35	Гутникова Л.В.	№1. — С. 40		№8. — С. 42
Бьеррегаард П.	№4. — С. 8	Давлетшин Р.А.	№3. — С. 3	Иванова О.Н.	№10. — С. 7

Игумнов П.С.	№7. — С. 3	Кузина Н.Ю.	№2. — С. 18	Никонова В.С.	№11. — С. 17
Идрисова Р.Ф.	№7. — С. 12	Кузнецов Д.Ю.	№8. — С. 3	Новиков П.В.	№9. — С. 3
Ижевская В.Л.	№5. — С. 42	Кузнецова Е.Б.	№2. — С. 32	Носиков В.В.	№2. — С. 28
.	№6. — С. 33	Кузьмина Н.Н.	№9. — С. 34	Огородова Л.М.	№11. — С. 40
.	№7. — С. 32	Кукес В.Г.	№1. — С. 36	Окунева Е.Г.	№6. — С. 38
.	№8. — С. 42	Курбатова И.В.	№4. — С. 19	Омельченко Д.О.	№3. — С. 20
Измайлов А.А.	№10. — С. 35	Курило Л.Ф.	№2. — С. 18	Осадчук Т.В.	№5. — С. 35
Измайлова С.М.	№10. — С. 35		№6. — С. 38	Остроумова Т.В.	№2. — С. 18
Иллариошкин С.Н.	№4. — С. 32	Курьянов П.С.	№10. — С. 23	Павлов А.Е.	№9. — С. 11
Кадочникова В.В.	№7. — С. 26	Кучер А.Н.	№4. — С. 27	Павлов В.Н.	№10. — С. 35
Казанцева И.А.	№11. — С. 44	Кхо С.	№4. — С. 8	Павлова К.К.	№10. — С. 35
Казубская Т.П.	№2. — С. 28	Лазюк Г.И.	№7. — С. 41	Пак М.В.	№6. — С. 24
Какаулина В.С.	№9. — С. 25	Лайнг И.А.	№4. — С. 8	Пантелеева А.А.	№10. — С. 23
Калашникова Е.А.	№9. — С. 15	Ле Сёф П.	№4. — С. 8	Парадник Д.Ю.	№10. — С. 16
Канделария П.	№4. — С. 8	Лебедев И.Н.	№1. — С. 26	Патрушев М.В.	№1. — С. 15
Капранов Н.И.	№11. — С. 17		№4. — С. 27		№10. — С. 16
.	№11. — С. 24	Лепендина И.Н.	№3. — С. 29	Петеркова В.А.	№10. — С. 7
.	№12. — С. 3	Леханова С.Н.	№6. — С. 24	Петрин А.Н.	№2. — С. 25
Карева М.А.	№10. — С. 7	Линч Н.	№4. — С. 8		№5. — С. 21
Каримов Д.О.	№11. — С. 35	Липаенкова О.Н.	№12. — С. 14	Петрова Н.В.	№5. — С. 3
Кашеварова А.А.	№1. — С. 26	Лобов С.Л.	№8. — С. 3		№11. — С. 17
Каширская Н.Ю.	№11. — С. 17	Логинов В.И.	№2. — С. 28		№12. — С. 3
.	№11. — С. 24	Лысогорская Е.В.	№4. — С. 32		№12. — С. 28
.	№12. — С. 3	Любченко Л.Н.	№7. — С. 26	Печатникова Н.Л.	№9. — С. 25
Киселева О.А.	№6. — С. 33		№12. — С. 28	Поляков А.В.	№2. — С. 37
Кисленко О.А.	№11. — С. 44	Ляхович А.В.	№7. — С. 17		№5. — С. 29
Кларов Л.А.	№6. — С. 24	Магжанов Р.В.	№7. — С. 12		№8. — С. 26
Климов Е.А.	№4. — С. 3	Магомедова Х.Д.	№2. — С. 18		№10. — С. 3
Коваленко К.А.	№1. — С. 40	Макеева О.А.	№12. — С. 42	Полякова Н.А.	№9. — С. 25
Кожевников А.А.	№6. — С. 24	Максимова Н.Р.	№10. — С. 35	Посух О.Л.	№6. — С. 24
Козлова В.М.	№12. — С. 28	Малиевский О.А.	№6. — С. 3	Прибушена О.В.	№7. — С. 41
Козлова Ю.О.	№11. — С. 44	Мальцев А.В.	№11. — С. 3	Пудова Е.А.	№2. — С. 32
Кокаева З.Г.	№4. — С. 3	Маркова С.И.	№2. — С. 25	Пузырев В.П.	№11. — С. 40
Колоколова О.В.	№12. — С. 14	Маск А.У.	№4. — С. 8	Пшенникова В.Г.	№6. — С. 24
Коломейчук С.Н.	№4. — С. 19	Машкина Е.В.	№1. — С. 40	Рафаилов А.М.	№6. — С. 24
Комарова Н.В.	№8. — С. 26	Мглинец В.А.	№2. — С. 3	Рахимкулова А.А.	№6. — С. 3
Кондратьева Е.И.	№11. — С. 17	Мельников А.А.	№1. — С. 26	Ревазова Ю.А.	№7. — С. 3
.	№11. — С. 24	Мешков А.Н.	№10. — С. 12	Ржанинова А.А.	№3. — С. 20
.	№12. — С. 3	Мещеряков А.А.	№7. — С. 26	Руденская Г.Е.	№5. — С. 29
Конева Л.А.	№11. — С. 40	Мещерякова Т.И.	№2. — С. 25		№8. — С. 26
Конорова И.Л.	№12. — С. 20	Мингареева К.В.	№11. — С. 40		№11. — С. 12
Корнева В.А.	№4. — С. 19	Миньженкова М.Е.	№11. — С. 44	Рудко А.А.	№11. — С. 40
Корытина Г.Ф.	№8. — С. 32	Мирошникова В.В.	№10. — С. 23		№12. — С. 14
.	№10. — С. 35	Митюшина Н.Г.	№9. — С. 15	Рудых Н.А.	№3. — С. 29
Костюк С.В.	№11. — С. 29	Михайлова С.В.	№9. — С. 25	Румянцева Н.В.	№5. — С. 35
.	№12. — С. 20	Мутовин Г.Р.	№2. — С. 25	Рыжкова О.П.	№5. — С. 29
Коталевская Ю.Ю.	№11. — С. 44	Надыршина Д.Д.	№6. — С. 15		№8. — С. 26
Кочетова О.В.	№8. — С. 32	Назаренко Л.П.	№9. — С. 20	Сайфуллина Е.В.	№7. — С. 12
.	№10. — С. 35	Назаренко М.С.	№9. — С. 20	Салахов Р.Р.	№12. — С. 42
Красовский С.А.	№11. — С. 17	Немова Н.Н.	№4. — С. 19	Салтыкова И.В.	№11. — С. 40
Крикун Е.Н.	№3. — С. 38	Никитина Т.В.	№1. — С. 26	Салугина С.О.	№9. — С. 34

ИНФОРМАЦИЯ

Сергеев А.В.	№4. — С. 3	Топчиева Л.В.	№4. — С. 19		№11. — С. 3
Сергеев А.С.	№5. — С. 42	Торхова Н.Б.	№4. — С. 27	Хуснутдинова Э.К.	№3. — С. 3
.	№8. — С. 42	Тоцаков С.В.	№1. — С. 15		№3. — С. 11
Сереброва В.Н.	№10. — С. 35		№10. — С. 16		№6. — С. 3
Симакова Т.С.	№9. — С. 11	Трефц К.Ф.	№9. — С. 47		№6. — С. 15
Симонова К.В.	№4. — С. 8	Трифопова Е.А.	№4. — С. 8		№6. — С. 24
.	№4. — С. 38		№4. — С. 38		№7. — С. 12
Сироткина О.С.	№10. — С. 23		№10. — С. 35		№8. — С. 3
Скоблов М.Ю.	№12. — С. 28	Трофимов Д.Ю.	№7. — С. 26		№11. — С. 3
Скоробогатых К.В.	№4. — С. 3	Туманов А.С.	№2. — С. 13	Чередниченко А.А.	№4. — С. 38
Скрябин Н.А.	№1. — С. 26	Тюрин А.В.	№3. — С. 3	Черняк А.В.	№11. — С. 17
Соловьев А.В.	№6. — С. 24	Уразгильдеева С.А.	№10. — С. 23	Чечеткина Н.Н.	№1. — С. 26
Соловьева Н.А.	№6. — С. 24	Урманцев М.Ф.	№10. — С. 35	Чикало А.О.	№1. — С. 36
Сорокина И.Н.	№3. — С. 29	Фёдоров Е.С.	№9. — С. 34	Чурносоев М.И.	№3. — С. 29
.	№3. — С. 38	Федорова С.А.	№6. — С. 24		№3. — С. 38
Сорокина Т.М.	№2. — С. 18	Федотов В.П.	№2. — С. 37	Шабалова Л.А.	№11. — С. 17
.	№6. — С. 38	Федотова Э.Е.	№6. — С. 24	Шварцман А.Л.	№10. — С. 23
Степанов В.А.	№4. — С. 8	Федюнина И.А.	№3. — С. 20	Шерман В.Д.	№11. — С. 17
.	№4. — С. 38	Филиппова М.Г.	№7. — С. 26		№11. — С. 24
.	№7. — С. 17	Фрейдин М.Б.	№11. — С. 40	Шестопалова Е.А.	№11. — С. 44
.	№10. — С. 35		№12. — С. 14	Шилейко Л.В.	№2. — С. 18
Степанова А.А.	№10. — С. 3	Хагель И.	№4. — С. 8		№6. — С. 38
Стрельников В.В.	№2. — С. 32	Хайден К.	№4. — С. 8	Шилова Н.В.	№11. — С. 44
Суханова Н.Н.	№4. — С. 27	Халилов Ш.А.	№6. — С. 33	Шиманский В.Н.	№12. — С. 28
Сычев Д.А.	№1. — С. 36	Халилова З.Л.	№3. — С. 11	Шкурят Т.П.	№1. — С. 40
Табеева Г.Р.	№4. — С. 3	Хасанова Р.Р.	№8. — С. 3	Эльканова Л.А.	№1. — С. 46
Танас А.С.	№2. — С. 32	Хидиятова И.М.	№7. — С. 12	Юткин Е.В.	№9. — С. 15
Терютин Ф.М.	№6. — С. 24	Хлебникова О.В.	№12. — С. 28	Яковлева Ю.С.	№4. — С. 27
Тимковская Е.Е.	№5. — С. 3	Хусаинова Р.И.	№3. — С. 3		
Тимошевский В.А.	№4. — С. 27		№6. — С. 15		

VI Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров

15—20 июня 2014 г. в г. Ростове-на-Дону пройдет VI Съезд ВОГиС

Основными организаторами Съезда являются Вавиловское общество генетиков и селекционеров, Научный совет по генетике и селекции РАН, Институт цитологии и генетики СО РАН, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, кафедра генетики и биотехнологии СПбГУ, кафедра генетики МГУ, кафедра цитологии и генетики НГУ, Институт аридных зон Южного научного центра РАН и Южно-Российский институт — филиал РАНХиГС.

В состав организационного комитета Съезда (председатель — Шумный В.К., заместители — Колчанов Н.А., Янковский Н.К., Матишов Д.Г., Тихонович И.А.) входят программный комитет (председатель — Инге-Вечтомов С.Г., заместители — Шестаков С.В., Колчанов Н.А., Гинтер Е.К., Тихонович И.А.) и технический комитет (председатель — Колчанов Н.А., заместители — Матишов Д.Г., Хлесткина Е.К., Кудрявцев А.М., Рудой В.В.).

Основной задачей запланированного Съезда является интеграция исследователей, работающих в научных учреждениях разных ведомств, и совместное обсуждение приоритетных направлений развития генетики и селекции.

В рамках Съезда состоятся следующие научные симпозиумы:

1. Эволюционная и популяционная генетика;
2. Молекулярные и клеточные механизмы генетических процессов;
3. Геномика, протеомика, биоинформатика и системная биология;
4. Генетика развития и стволовые клетки;
5. Генетика человека, медицинская генетика и генетические модели для биомедицинских исследований;
6. Нейрогенетика и генетика поведения;
7. Генетические основы селекции и биотехнологии;
8. Экологическая генетика.

Кроме того, будут организованы круглые столы:

1. Генетическое образование;
2. Социальные и этические аспекты генетики.

Планируется, что в работе Съезда примут участие не менее 500 участников, ожидается активное участие молодых учёных, аспирантов и студентов. Крайний срок регистрации и подачи тезисов — 1 ноября 2013 г.

Рабочим языком Съезда является русский язык.

Ознакомиться с правилами оформления тезисов и зарегистрироваться можно на сайте:

<http://conf.nsc.ru/vogis2014/ru/>

Приглашаю принять участие в работе Съезда!

*Президент ВОГиС,
академик РАН
В.К. Шумный*

Правила оформления статей в журнале «Медицинская генетика»

Журнал «Медицинская генетика» публикует сообщения по современным проблемам генетики человека и медицинской генетики. К публикации принимаются теоретические и обзорные статьи, результаты завершённых оригинальных исследований, краткие сообщения, информация о съездах и конференциях, рецензии на книги и письма к редактору. Присланные материалы рецензируются и принимаются к публикации после решения редакционной коллегии.

Статьи должны быть написаны на русском языке и представлены в двух печатных экземплярах в формате любой версии текстового редактора Microsoft Word for Windows и на дискете. Они должны сопровождаться направлением научного учреждения, где была проведена данная работа. В конце статьи должны быть подписи всех авторов и полностью указаны фамилия, имя, отчество, полный почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты автора, осуществляющего связь с редакцией. Материалы, не отвечающие этим требованиям, не принимаются.

Печатать следует на одной стороне листа формата А4 через 2 интервала шрифтом Times Roman, 12 пунктов без переносов и выравнивания по правому краю. Все поля страницы должны быть не менее 3 см. Нумерация страниц приводится внизу по центру. Общий объем рукописи, включая аннотацию, список литературы, таблицы, рисунки и подписи под рисунками, не должен превышать для оригинальных статей 16 страниц, для обзорных и теоретических — 32 страниц, кратких сообщений — 8 страниц. Число таблиц и число рисунков не должно быть более пяти. Размеры рисунков и таблиц не должны превышать одну страницу формата А4. Статьи большего объема могут быть опубликованы в исключительных случаях по решению редакционной коллегии.

Структура статьи

1. Название статьи, напечатанное строчными буквами без разрядки и выделения;
2. Фамилия (фамилии) автора (авторов) и инициалы;
3. Место работы каждого автора с указанием должности и контактной информации;
4. Аннотация (не более 0,5 стр.);
5. Ключевые слова;
6. Экспериментальные оригинальные статьи должны иметь разделы: Введение, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение. Два последних раздела могут быть объединены;
7. Теоретические и обзорные статьи могут иметь иные подразделы;
8. Краткие сообщения печатаются без подразделения статьи на части;
9. В конце текста статьи может быть выражена признательность отдельным лицам и (или) научным или иным фондам и организациям;
10. После текста статьи приводится список литературы;
11. На отдельной странице приводятся подписи к рисункам с указанием названия статьи и авторов;
12. Каждая таблица печатается на отдельном листе;
13. По-английски на отдельной странице указываются название статьи, фамилия (фамилии) и инициалы автора (авторов), название учреждения, его адрес (в том числе включая факс и адрес электронной почты), английский перевод аннотации статьи, озаглавленный Summary (не более 0,5 стр.);

Названия разделов печатаются на отдельной строке. Подзаголовки внутри разделов также печатаются на отдельной строке. На левом поле по тексту статьи указывается место расположения рисунков и таблиц. Сложные математические формулы печатаются на отдельной строке (следует использовать редак-

тор формул, встроенный в текстовый редактор Word). Формулы нумеруются справа в круглых скобках в случае ссылок на них по ходу текста статьи.

Данные рисунков не должны повторять материалы таблиц. Рисунки должны быть четкими с минимальным количеством обозначений. Детали на рисунках обозначаются арабскими цифрами либо русскими буквами, которые расшифровываются в подрисунковых подписях. Иллюстрации (схемы, чертежи, графики и т.д.) присылаются в двух экземплярах, фотографии — в трех. Первый экземпляр фотографий не должен содержать никаких пометок на лицевой стороне, а на двух других наносятся все обозначения тушью. На обороте фотографий простым карандашом указываются название статьи и фамилия первого автора, порядковый номер рисунка, его верх и низ. Фотографии должны быть вложены в отдельный конверт. На остальных иллюстрациях на лицевой стороне (на полях) указывается номер рисунка, название статьи и фамилия первого автора. В подписях к микрофотографиям необходимо указать увеличение.

Цитируемая литература (не более 25 ссылок для оригинальных работ и не более 50 для обзорных статей) приводится в алфавитном порядке (вначале на русском языке). **Не допускаются ссылки на неопубликованные работы, включая материалы конференций, диссертаций (можно указывать в качестве источников авторефераты диссертаций).** В тексте номер ссылки заключен в квадратные скобки и соответствует нумерации в списке литературы.

Ссылка на публикацию в периодическом издании должна содержать фамилии и инициалы авторов, название статьи, название журнала, год, том, номер и номера страниц. Примеры оформления ссылок:

Сури́н В.Л. Лабораторная диагностика острой перемещающейся порфирии // *Генетика*. — 2001. — Т. 2, №5. — С. 690—697.
Gu X.K. The porphyrias: recent advances // *Clin. Chem.* — 1986. — Vol. 32, №3. — P. 1255—1265.

В случае цитирования книг, монографий ссылка содержит: фамилию и инициалы автора, название, место издания, название издательства, год издания, число страниц. Пример оформления ссылки:

Прытков А.Н. Мониторинг врожденных пороков развития: Учебное пособие для врачей — М.: Наука, 2001. — 250 с.

Ссылка на материалы авторефератов диссертаций:

Котлукова Н.П. Кардиоваскулярная патология у новорожденных: Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — М., 2001. — 50 с.

Редакция оставляет за собой право редактировать текст при обнаружении технических или смысловых дефектов либо возвращать статью автору для исправления.

Датой поступления статьи считается день получения редакцией окончательного текста.

Отклоненные статьи не возвращаются.

Плата за публикацию статей не взимается.

Плата за публикацию статей аспирантов и докторантов не взимается.

Авторский гонорар не выплачивается.

Не допускается направление статей, которые уже напечатаны в других изданиях или направлены для публикации в другие издательства.

Статьи следует направлять по адресу:
115478, Москва, ул. Москворечье, 1,
Медико-генетический научный центр РАМН,
редакция журнала «Медицинская генетика».