

Главный редактор
ГИНТЕР Е.К.
академик РАМН, д.б.н., профессор
Заместители главного редактора
ПУЗЫРЕВ В.П.
академик РАМН, д.м.н., профессор
БАРАНОВ В.С.
чл.-корр. РАМН, д.м.н., профессор

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

Редакционная коллегия
АРЧАКОВ А.И.
академик РАМН, д.б.н., профессор
ВОЕВОДА М.И.
чл.-корр. РАМН, д.м.н., профессор
ДУРНЕВ А.Д.
чл.-корр. РАМН, д.м.н., профессор
ИВАНОВ В.П.
д.б.н., профессор
ИЛЛАРИОШКИН С.Н.
д.м.н., профессор
КОЗЛОВА С.И.
д.м.н., профессор
КОПНИН Б.П.
д.б.н., профессор
КУЦЕВ С.И.
д.м.н.

КУЧИНСКАС В. (Kucinskas V.)
академик Литовской АН, д.б.н., профессор

ЛИМБОРСКАЯ С.А.
д.б.н., профессор

МАЦЕК М. (Macek M. Jr.)
доктор медицины и педиатрии (MD),
доктор философии по медицине и молекуляр-
ной генетике (PhD), профессор

МИХАЙЛОВА Л.К.
д.м.н., профессор

НАЗАРЕНКО Л.П.
д.м.н., профессор

НОВИКОВ П.В.
д.м.н., профессор

НОСИКОВ В.В.
д.б.н., профессор

РОГАЕВ Е.И.
д.б.н., профессор

РУБЦОВ Н.Б.
д.б.н., профессор

СВЕРДЛОВ Е.Д.
академик РАН, д.б.н., профессор

СЕРЕДЕНИН С.Б.
академик РАН и РАМН, д.м.н., профессор

СМИРНОВ В.Н.
академик РАН и РАМН, д.м.н., профессор

СТЕПАНОВ В.А.
д.б.н., профессор

ЧЕХОНИН В.П.
академик РАМН, д.б.н., профессор

ЧУЧАЛИН А.Г.
академик РАМН, д.м.н., профессор

Издатель:
ООО «Издательство «Гениус Медиа»
E-mail: genius-media@mail.ru

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

Внимание авторов и читателей:
Рукописи и иллюстрации не возвращаются. При
перепечатке материалов согласование с редак-
цией журнала «Медицинская генетика» обяза-
тельно. За содержание рекламных публикаций ответст-
венность 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

2014 г. Том 13. №2 (140)

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Вербицкая Н.А., Беляева Т.И., Тронова С.Г., Ворошнин В.В.**
Скрининг на синдром Дауна в первом триместре:
определение свободного β -ХГЧ и РАРР-А
в сыворотке и в сухих пятнах крови3
- Хусаинова Р.И., Мальцев А.В., Хуснутдинова Э.К.**
Исследование полиморфизма сайтов связывания микроРНК
у больных постменопаузальным остеопорозом8
- Ахмедова П.Г., Зинченко Р.А., Угаров И.В.,
Умаханова З.Р., Магомедова Р.М.**
Эпидемиология наследственных нервно-мышечных заболеваний
в Республике Дагестан 19
- Миньженкова М.Е., Шилова Н.В., Маркова Ж.Г.,
Козлова Ю.О., Золотухина Т.В.**
Эффективность различных методов диагностики
хромосомных аномалий при репродуктивных потерях25
- 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 III.
Эффективность обучения консультирующихся31

ПИСЬМО К РЕДАКТОРУ

- Мазунин И.О.**
Мутация 14498 мтДНК: рокировка букв37

ИНФОРМАЦИЯ

- Правила оформления статей
в журнале «Медицинская генетика»39

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

Executive editor
IZHEVSKAYA V.L.

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

Publisher:
Genius Media Publishing Ltd
E-mail: genius-media@mail.ru

Medical GENETICS

Monthly reviewed scientific and practical journal

2014. Volume 13. №2 (140)

Content

ARTICLES

- Verbitskaya N.A., Belyaeva T.I., Tronova S.G., Voroshnin V.V.**
Comparison of free-beta-hCG and PAPP-A
in serum and dried blood spots in the first trimester of pregnancy.....3
- Khusainova R.I., Maltsev A.V., Khusnutdinova E.K.**
The study of polymorphisms in microRNA target sites
in patients with postmenopausal osteoporosis.....9
- Akhmedova P.G., Zinchenko R.A., Ugarov I.V.,
Umakhanova Z.R., Magomedova R.M.**
Genetic epidemiology study of hereditary neuromuscular diseases
in Dagestan Republic.....19
- Minzhenkova M.E., Shilova N.V., Markova Zh.G.,
Kozlova Y.O., Zolotukhina T.V.**
Efficiency of different methods of diagnosis
chromosomal abnormalities in reproductive losses.....25
- Baranova E.E., Sergeev A.S., Ivanova L.Yu.,
Zhuravleva I.V., Izhevskaya V.L., Ginter E.K.**
Integrated estimation of genetic counseling efficiency.
Report III.
Efficiency of patient education31

LETTER TO EDITOR

- Mazunin I.O.**
14498 mtDNA mutation: letters permutation37

INFORMATION

- Guidelines for Authors39

Скрининг на синдром Дауна в первом триместре: определение свободного β -ХГЧ и РАРР-А в сыворотке и в сухих пятнах крови

Вербицкая Н.А., Беляева Т.И., Тронова С.Г., Ворошнин В.В.

Лаборатория пренатального скрининга, ГБУЗ СО «КДЦ»ОЗМР»,
620067, г.Екатеринбург, ул.Флотская, 52, факс (343) 374-31-10. E-mail: VerbitskayaN@yandex.ru

Проведено сравнение значений концентраций свободного β -хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) и ассоциированного с беременностью белка А (РАРР-А) в высушенных пятнах и в сыворотке крови 2231 беременной женщины. Определение концентраций β -ХГЧ и РАРР-А как в сыворотке, так и в сухих пятнах крови было одинаково эффективно для пренатального скрининга трисомии хромосомы 21 у плода. Использование сухих образцов крови имеет ряд преимуществ и может быть предпочтительнее для массового скрининга беременных женщин на синдром Дауна у плода.

Ключевые слова: пренатальный скрининг, трисомия хромосомы 21, β -ХГЧ, РАРР-А, сухие образцы крови

Введение

В 70-х годах XX века стала развиваться пренатальная диагностика врождённых и наследственных заболеваний, которые приводят к ранней гибели или к глубокой инвалидизации ребёнка [1, 5].

Важность проведения пренатального скрининга в первом триместре беременности освещена в отечественных и зарубежных исследованиях [2—4, 6, 8—10, 13]. Этому вопросу уделяется большое внимание, поскольку раннее обследование позволяет в оптимальные сроки определить риск рождения ребёнка с хромосомной патологией. Цель неинвазивного скрининга — сформировать группу «высокого» риска для проведения инвазивных процедур и цитогенетического исследования плода.

В первом триместре проводится биохимический скрининг беременных женщин путём измерения уровней β -ХГЧ и РАРР-А в сыворотке крови и расчёта риска рождения ребёнка с синдромом Дауна. При расчёте риска в комбинации с биохимическими используются и ультразвуковые маркёры, в частности толщина воротникового пространства (ТВП) плода. При такой комбинации маркёров выявляется 92% плодов с трисомией по хромосоме 21 в сроках с 11 по 13 недели гестации при уровне ложноположительных результатов 5,2% [12].

Проведение массового скрининга беременных в Свердловской области затруднено из-за большой территории (194 307 км²) и плохой транспортной инфраструктуры, вследствие чего осложняется доставка образцов сыворотки крови для исследования в лабораторию, расположенную в областном центре. Из-за этого не все беременные женщины региона могут пройти обследование. Для перехода на массовый пренатальный скрининг необходима альтернатива анализу сыворотки крови и в этом качестве может выступать исследование сухих пятен крови. Имеются сообщения о стабильности уровней β -ХГЧ и РАРР-А в высушенном пятне крови [7, 11],

а также об эффективности использования сухих пятен крови в скрининге на синдром Дауна в первом триместре беременности [8, 9].

Мы сравнили концентрации β -ХГЧ и РАРР-А в сыворотке и в сухих пятнах крови, стандартные отклонения $\log_{10}$ МоМ β -ХГЧ и РАРР-А и значения риска рождения ребёнка с синдромом Дауна при оценке концентрации маркёров в сыворотке крови и пятнах высушенной крови. Были рассчитаны региональные нормы медиан для β -ХГЧ и РАРР-А в сухом пятне крови при нормальной беременности.

Материалы и методы

Образцы крови были собраны с ноября 2010 г. по октябрь 2011 г. Забор крови из вены производился в вакуумные пробирки, после чего кровь центрифугировалась и отделялась сыворотка. Образцы сухих пятен крови получали следующим образом: после прокола кожи фаланги 4-го пальца кровь наносили на специальную фильтровальную бумагу и оставляли для высыхания.

В исследовании приняли участие 2243 беременные женщины. Средний возраст пациенток составил $29 \pm 6,1$ года. Все беременные имели одноплодную беременность, наступившую естественным путём. У 2231 пациентки были получены не только сухие пятна, но и образцы сыворотки крови.

Определение срока беременности производилось при ультразвуковом исследовании (УЗИ) на основании копчико-теменного размера (КТР) плода. Сроки гестации составили от 9 недель 1 дня до 13 недель 6 дней. Измерение ТВП производилось, если КТР плода превышал 45 мм. При меньших значениях КТР производился расчет риска рождения ребёнка с синдромом Дауна только по биохимическим маркёрам, но после повторного УЗИ, риск пересчитывался с использованием зна-

чения ТВП. Биохимические и ультразвуковые маркёры для расчета риска рождения ребёнка с синдромом Дауна использованы у 2211 пациенток. В 31 случае ТВП не измерялась, и расчет риска рождения ребёнка с синдромом Дауна основывался только на биохимических маркёрах.

В исследуемой группе женщин было 19 случаев синдрома Дауна у плода: 17 из них выявлено пренатально, а 2 — постнатально у скрининг-негативных женщин. Рассчитанная эффективность выявления плодов с синдромом Дауна при уровне ложноположительных результатов равном 2% составила 79% при определении маркёров в сыворотке крови и 89,5% — в сухом пятне крови. При увеличении доли ложноположительных результатов до 5% эффективность составила 84,2% (определение в сыворотке), и 89,5% (в сухом пятне крови). Кроме того, пренатально было выявлено 5 плодов с синдромом Эдвардса, 2 — с синдромом Тернера, 1 — с синдромом Патау.

В лаборатории пренатального скрининга был проведён сравнительный анализ двух биологических материалов, используемых для определения уровней PAPP-A и β -ХГЧ — биохимических маркёров хромосомной патологии в 1 триместре. Данные биохимические маркёры определялись в сыворотке и в сухом пятне крови твердофазным двухсайтовым иммунофлуоресцентным методом с применением непрямой сэндвич-методики. Концентрации PAPP-A и β -ХГЧ в сыворотке определялись с использованием тест-систем DELFIA free-beta-HCG и DELFIA PAPP-A, в сухих пятнах крови — AutoDelfia PAPP-A/ free-beta-HCG Dual DBS. Измерение уровней маркёров проводилось по стандартному протоколу фирмы производителя Wallac/Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Финляндия.

Для расчёта региональных медиан концентраций β -ХГЧ и PAPP-A использовалась программа «Eclipse» (Wallac/Perkin Elmer Life & Analytical Science, Turku, Finland).

Расчёт концентраций β -ХГЧ, PAPP-A проводился по стандартной калибровочной кривой с использованием автоматической расчетной программы «MultiCalc». Уровни маркёров выражали в единицах multiple of median (MoM), которые представляют собой отношение полученного значения маркёра к медиане для данного срока беременности.

Для расчёта риска рождения ребёнка с хромосомной патологией использовалась программа «Life Cycle» (Wallac/Perkin Elmer Life & Analytical Science, Turku, Finland). Данная программа учитывает возраст матери, данные анамнеза (наличие предыдущих детей с синдромом Дауна, наличие инсулинзависимого диабета, статус курения, этнический фактор, вес, использование вспомогательных репродуктивных технологий и др.), данные УЗИ и концентрации обоих сывороточных маркёров в 1 триместре.

Результаты исследования были обработаны в программе SPSS 13. Взаимосвязи различных признаков определяли при помощи коэффициента Пирсона.

Результаты и обсуждение

В ходе проведённой работы нами были получены данные о концентрации свободного β -ХГЧ и PAPP-A в сыворотке и в сухих пятнах крови беременных женщин. Мы определили минимальное и максимальное значения концентрации маркёров, медианы, средние значения, стандартные отклонения. Результаты представлены в табл. 1. Как видно из приведённых данных, в сухом пятне крови все исследуемые характеристики PAPP-A ниже, чем в сыворотке крови. В сухом пятне крови стандартное отклонение у свободного β -ХГЧ и PAPP-A также ниже, чем в сыворотке.

Для маркёров сыворотки крови мы использовали значения медиан, которые были получены в ходе собственной многолетней работы. Они представлены в табл. 2. Для маркёров в сухих образцах крови мы использовали медианы, предложенные производителями наборов реагентов Wallac/Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Финляндия. Необходимо отметить, что в расчет медиан биохимических маркёров включались значения показателей, полученных у беременных женщин с известным нормальным исходом беременности. Наибольшее количество женщин в нашей выборке обследовано в сроке беременности 12 недель, а наименьшее — 9 недель, так как 12 недель — оптимальный срок для измерения ТВП и проведения инвазивных процедур при высоком риске рождения ребёнка с хромосомной патологией.

Известно, что эффективность пренатального выявления плодов с синдромом Дауна в сроке 9 недель составляет 92%, в сроке 13 недель — 90% (при уровне ложноположительных результатов 5%) [3, 4, 9, 10]. Как видно из полученных нами данных, и в сыворотке, и в сухом пятне крови значения свободного β -ХГЧ уменьшаются, а значение PAPP-A увеличиваются с увеличением срока беременности (табл. 2). Аналогичные данные получены и другими авторами [3, 9].

Полученные уровни свободного β -ХГЧ и PAPP-A нами были использованы для определения региональных значений медиан этих маркёров в сухом пятне крови. Результаты представлены в табл. 3.

Важным компонентом для успешного использования биохимических маркёров для скрининга на синдром Дауна является стандартное отклонение. В табл. 4 представлены стандартные отклонения Log10 MoM свободного β -ХГЧ и PAPP-A в сыворотке и в сухих пятнах крови. Полученные величины стандартного отклонения Log10 MoM для изучаемых биохимических маркёров в сыворотке крови практически не различаются. В то же время при анализе маркёров в сухих пятнах крови разница есть: стандартное отклонение Log10

МоМ свободного β -ХГЧ ниже, чем РАРР-А. Стандартное отклонение Log_{10} МоМ свободного β -ХГЧ в высушенной крови меньше, чем в сыворотке, в то время как для РАРР-А разницы практически нет. Однако полученные различия значений не являются достоверными, и, следовательно, можно использовать анализ биохимических маркёров как в сыворотке, так и в сухом пятне крови.

В нашем исследовании использовался алгоритм работы, при котором формировались 3 группы женщин в зависимости от величины риска рождения ребёнка

с синдромом Дауна: группа высокого риска (риск 1:100 и выше), группа среднего риска (риск от 1:101 до 1:1000) и группа низкого риска (риск ниже 1:1001) (рисунок).

С использованием данного алгоритма нами были сформированы группы беременных женщин с разными величинами риска рождения больного ребёнка, рассчитанными с использованием значений концентраций маркёров в сыворотке и в сухих пятнах крови. Данные представлены в табл. 5 и 6. Доля женщин, имеющих высокий риск рождения больного ребёнка (1:100 и выше) и сразу направляющихся на инвазивную процедуру, была

Таблица 1

Концентрации свободного β -ХГЧ и РАРР-А в сыворотке и в сухих пятнах крови беременных женщин в 1 триместре беременности

Характеристика	Сыворотка		Сухое пятно крови		χ^2 ($p < 0,05$)	
	Свободный β -ХГЧ (нг/мл)	РАРР-А (У/мл)	Свободный β -ХГЧ (нг/мл)	РАРР-А (У/мл)	Свободный β -ХГЧ (нг/мл)	РАРР-А (У/мл)
Минимум	6,11	0,04	6,47	0,02	0,01	0,02
Максимум	441,8	18,14	307,3	8,3	58,5	11,7
Медиана	45,84	2,59	47,15	1,09	0,04	2,1
Среднее значение	56,69	3,23	54,28	1,4	0,1	2,4
Стандартное отклонение	39,35	2,29	30,84	1,08	2,34	1,46

Таблица 2

Региональные медианы концентраций свободного β -ХГЧ и РАРР-А в сыворотке крови беременных женщин в 1 триместре беременности

Срок гестации	Median days	β -ХГЧ (нг/мл)	РАРР-А (У/мл)
9	67	51,62	0,66
10	73	54,6	1,04
11	81	53,04	1,87
12	85	49,99	2,42
13	93	40,64	3,82

Таблица 3

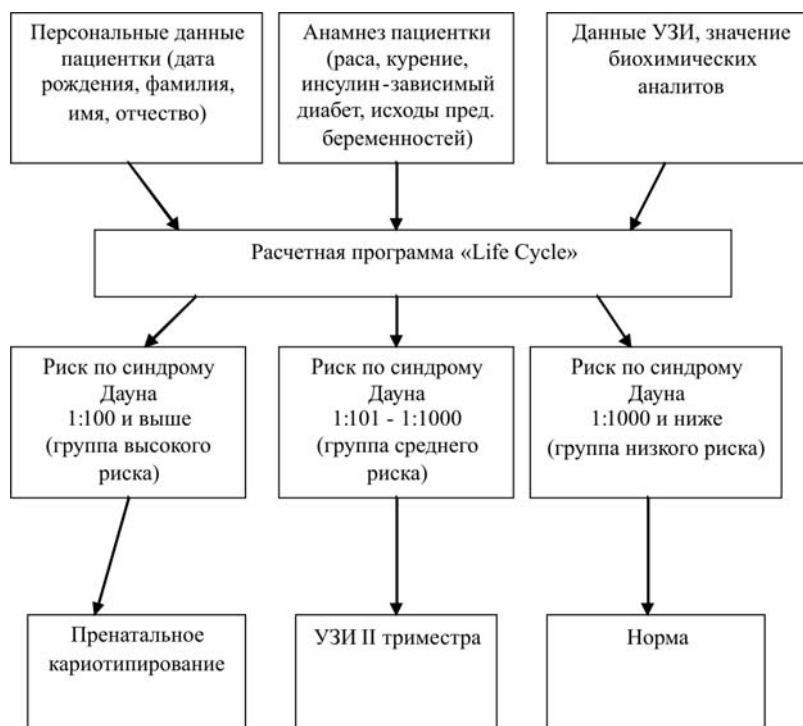
Региональные медианы концентраций свободного β -ХГЧ и РАРР-А, полученные для сухого пятна крови

Срок гестации	Median days	β -ХГЧ (нг/мл)	РАРР-А (У/мл)
9	67	85,38	0,21
10	73	70,09	0,42
11	81	56,47	0,76
12	85	47,77	1,14
13	93	41,61	1,79

Таблица 4

Стандартное отклонение Log_{10} МоМ концентраций свободного β -ХГЧ и РАРР-А в сыворотке и в сухом пятне крови

Биоматериал	N	Стандартное отклонение Log_{10} МоМ		χ^2 ($p < 0,05$)	
		Свободный β -ХГЧ	РАРР-А	Свободный β -ХГЧ	РАРР-А
Сыворотка	2231	0,27	0,27	0,01	3,6
Сухое пятно крови	2243	0,22	0,28		



Алгоритм обследования беременных женщин в клиничко-диагностическом центре «Охрана здоровья матери и ребёнка»

почти одинакова: 1,99% при анализе маркёров в сыворотке и 2,08% при анализе в сухих пятнах крови. Доля женщин со средним риском была выше при использовании маркёров сыворотки крови. Это может быть связано с различиями в значениях медиан биохимических маркёров.

Нами был проведён корреляционный анализ групп риска рождения ребёнка с синдромом Дауна, выделенных на основании анализа маркёров сыворотки и сухих пятен крови. При использовании для расчёта риска комбинации УЗИ и биохимических маркёров для групп с высоким риском R-value равен 0,55, что соответствует

Таблица 5

Распределение беременных женщин по группам в зависимости от величины риска рождения ребёнка с синдромом Дауна, рассчитанного по результатам анализа биохимических маркёров в сыворотке крови

Риск, рассчитанный по уровню биохимических маркёров + ТВП				Риск, рассчитанный только по уровню биохимических маркёров		
Группа высокого риска (1:100 и выше). Кол-во (%)	Группа среднего риска (1:101-1:1000). Кол-во (%)	Группа низкого риска (1:1000 и ниже). Кол-во (%)	Всего	Группа высокого риска (1:250 и выше). Кол-во (%)	Группа низкого риска (1:250 и ниже). Кол-во (%)	Всего
44; (1,99%)	240; (10,86%)	1926; (87,15%)	2210	258; (11,56%)	1973; (88,44%)	2231

Таблица 6

Распределение беременных женщин по группам в зависимости от величины риска рождения ребёнка с синдромом Дауна, рассчитанного по результатам анализа биохимических маркёров в сухих пятнах крови

Риск, рассчитанный по уровню биохимических маркёров + ТВП				Риск, рассчитанный только по уровню биохимических маркёров		
Группа высокого риска (1:100 и выше). Кол-во (%)	Группа среднего риска (1:101-1:1000). Кол-во (%)	Группа низкого риска (1:1000 и ниже). Кол-во (%)	Всего	Группа высокого риска (1:250 и выше). Кол-во (%)	Группа низкого риска (1:250 и ниже). Кол-во (%)	Всего
46; (2,08%)	172; (7,78%)	1993; (90,14%)	2211	183; (8,16%)	2060; (91,84%)	2243

средней корреляции; для групп со средним риском — 0,34, т.е. слабая корреляция; для групп с низким риском показана сильная степень корреляции — 0,79. При использовании только биохимических маркёров показана средняя степень корреляции 0,52. Полученные результаты свидетельствуют о равной возможности использование двух типов анализов для расчета риска рождения ребёнка с синдромом Дауна.

Необходимо сказать несколько слов о стабильности изучаемых биохимических маркёров в сыворотке и в сухом пятне крови. В своей статье Cowans N.J. с соавт. приводят данные о стабильности PAPP-A и свободного β -ХГЧ в сыворотке и в сухом пятне крови [7]. Эти авторы показали, что свободный β -ХГЧ гораздо стабильнее при хранении фильтра с высушенным пятном крови, чем при хранении сыворотки. Аналогичные данные были получены в 1993 группой Spence с соавторами [11]. При этом стабильность PAPP-A была хуже в сухом пятне крови, чем в сыворотке. Но несмотря на это, степень неустойчивости PAPP-A на фильтре ниже, чем для свободного β -ХГЧ в сыворотке. Вследствие большой площади Свердловской области (194.307 км²) доставка образцов в лабораторию затруднена, что может сказаться на получаемых значениях свободного β -ХГЧ и PAPP-A. Поэтому для нас переход на использование сухих пятен крови является наиболее приемлемым.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют об эффективности использования сывороточных и маркёров сухой крови для скрининга беременных женщин на синдром Дауна у плода. По сравнению с сывороткой сухая кровь имеет ряд преимуществ: высокая стабильность β -ХГЧ, упрощение метода забора образцов, безопасная транспортировка (отсутствие бьющихся пробирок), уменьшение биологической опасности, сокращение этапа обработки образцов (отсутствие этапа центрифугирования с целью отделения сыворотки). Полученные результаты корреляционного анализа свидетельствуют о равной возможности использования двух типов образцов крови для анализа биохимических маркёров. Рассчитанные региональные медианы для свободного β -ХГЧ и PAPP-A в сухой крови позволяют внедрить эту методику для пренатального скрининга в Свердловской области. Дальнейшие исследования уточнят значения медиан для маркёров сухой крови в сроках 9—10 недель.

Список литературы

1. Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней / Под ред. Айламазяна Э.К., Баранова В.С. — М.: МЕДпресс-информ, 2006. — 415.
2. Баранов В.С., Айламазян Э.К. Прикладное и фундаментальное направления пренатальной диагностики // Журнал акушерства и женских болезней. — 2012. — Т. LXI. — Вып. 3. — С. 54—60.
3. Жученко Л.А., Андреева Е.Н., Воскобоева Е.Ю., Давыдова О.Н., Калашникова Е.А., Кокаровцева С.Н., Лагуева Ф.К., Одегова Н.О., Серкова Н.А., Степнова С.В., Судакова Е.В., Цветкова Т.Г. Реализация мероприятий Национального проекта «Пренатальная (дородовая) диагностика нарушений развития ребёнка» в Московской области // Российский вестник акушера-гинеколога. — 2013. — Вып. 4. — С. 6—12.
4. Кашеева Т.К., Николаева Ю.А., Карпов К.П., Вохмянина Н.В., Романенко О.П., Баранова В.С. Ранний пренатальный скрининг — состояние, трудности, новые возможности // Журнал акушерства и женских болезней. — 2012. — Т. LXI. — Вып. 3. — С. 69—74.
5. Медведев М.В., Юдина Е.В. Основы пренатальной диагностики. — М.: РАВПГ, Реальное Время, 2002. — 184.
6. Некрасова Е.С., Николаева Ю.А., Кашеева Т.К., Кузнецова Т.В., Баранов В.С. Внедрение алгоритма комбинированного скрининга хромосомной патологии плода в I триместре беременности. Опыт работы за 4 года // Журнал акушерства и женских болезней. — 2007. — Т. LVI. — Вып. 1. — С. 28—34.
7. Cowans N.J., Stamatopoulou A., Liitti P., Suonpaa M., Spencer K. The stability of free- β human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A in first trimester dried blood spots // Prenat. Diagn. — 2011. — Vol. 31. — P. 293—298.
8. Krantz D.A., Hallahan T.W., Orlandi F., Buchanan P., Larsen J.W., Macri J.N. First-Trimester Down Syndrome Screening Using Dried Blood Biochemistry and Nuchal Translucency // Obstet. Gynecol. — 2000. — Vol. 96. — P. 207—213.
9. Krantz D., Hallahan T., Ravens R., He K., Cuckle H., Sherwin J., Carmichael J. First trimester Down syndrome screening with dried blood spots using a dual analyte free beta hCG and PAPP-A immunofluorometric assay // Prenat. Diagn. — 2011. — Vol. 31. — P. 869—874.
10. Nicolaides K.S. A model for a new pyramid of prenatal care based on the 11 to 13 weeks' assessment // Prenat. Diagn. — 2011. — Vol. 31. — P. 3—6.
11. Spencer K., Macri J.N., Carpenter P., Anderson R., Krantz D.A. Stability of Intact Chorionic Gonadotropin (hCG) in Serum, Liquid Whole Blood, and Dried Whole-Blood Filter-Paper Spots: Impact on Screening for Down Syndrome by Measurement of free β -hCG Subunit // Clin. Chem. — 1993. — Vol. 39. — P. 1064—1068.
12. Spencer K., Spencer C.E., Power M., Dawson C., Nicolaides K.H. Screening for chromosomal abnormalities in the first trimester using ultrasound and maternal serum biochemistry in a one-stop clinic: a review of three years prospective experience // BJOG. — 2003. — Vol. 110. — P. 281—286.
13. Wheeler D.M., Siniosich M.J. Prenatal screening in the first trimester of pregnancy // Prenat. Diagn. — 1998. — Vol. 18. — P. 537.

Comparison of free-beta-hCG and PAPP-A in serum and dried blood spots in the first trimester of pregnancy

Verbitskaya N.A., Belyaeva T.I., Tronova S.G., Voroshnin V.V.

Prenatal screening laboratory, GBUZ SO «KDC «OZMR»,
Yekaterinburg street. Flotskaya 52, fax (343) 374-31-10, E-mail: VerbitskayaN@yandex.ru

A comparison of concentrations of free β -human chorionic gonadotropin (β -hCG) and pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) in dried blood spots and in blood serum of 2231 pregnant women was held. Determining concentrations β -hCG and PAPP-A in serum and in dried blood spots were equally effective for prenatal screening. Using dry blood samples has several advantages and may be preferable for mass screening of pregnant women for Down syndrome in the fetus.

Key words: prenatal screening, trisomy of chromosome 21, β -hCG, PAPP-A, dried blood samples

Исследование полиморфизма сайтов связывания микроРНК у больных постменопаузальным остеопорозом

Хусаинова Р.И.¹, Мальцев А.В.², Хуснутдинова Э.К.^{1,2}

¹ — ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г.Уфа

² — ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет»; г.Уфа
E-mail: ritakh@mail.ru

Проведено изучение ассоциаций полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК *rs10793442* гена *ZNF239*, *rs6854081* гена *FGF2*, *rs2745426* гена *VNN1*, *rs10098470* гена *TPD52*, *rs10518716* гена *FLJ11506*, *rs17054320* гена *PLEKHG1*, *rs1712* гена *FBXO5* с риском развития переломов и уровнем минеральной плотности костной ткани (МПКТ) у 826 женщин постменопаузального возраста русской и татарской этнической принадлежности из Волго-Уральского региона России. Аллель *А и генотип *А*С локуса *rs10793442* оказались маркерами повышенного риска развития остеопороза, генотип *С*С — маркером пониженного риска в общей выборке и у женщин русской этнической принадлежности, у татар наблюдается такая же тенденция, не достигая статистической значимости из-за меньшей выборки женщин татарской этнической принадлежности. С развитием переломов ассоциированы генотипы *А*С локуса *rs10793442*, *G*G локуса *rs6854081*, *G*G локуса *rs10518716* и аллель *С локуса *rs1712* у женщин татарской этнической принадлежности, а генотип *С*Т локуса *rs10098470* является маркером повышенного риска переломов у русских женщин. Обнаружена статистически значимая зависимость уровня МПКТ шейки бедра от генотипов полиморфного локуса *rs6854081* гена *FGF2*.

Ключевые слова: остеопороз, минеральная плотность костной ткани, переломы, сайты связывания микроРНК, эпигенетика

Введение

Остеопороз (ОП) — это системное заболевание скелета, характеризующееся снижением костной массы, микроархитектурными нарушениями костной ткани, приводящими к повышению ломкости костей и увеличению риска переломов [13]. Патология костной системы стоит в ряду наиболее значимых медицинских проблем с выраженным влиянием на экономику общества, здоровье и качество жизни отдельных индивидуумов и их семей. Социальная значимость ОП определяется его последствиями и осложнениями — переломами позвоночника и трубчатых костей, обуславливающими подъём заболеваемости, инвалидности и смертности [3]. Частота ОП повышается с возрастом, поэтому наблюдаемое в последние десятилетия старение населения ведёт к постоянно растущей частоте заболевания и увеличению числа переломов. Так, показано, что у 35% женщин после наступления менопаузы развивается ОП, а у лиц старше 75 лет заболевание определяется более чем в 70% случаев [12, 15]. Оценка мировых тенденций показала, что только за счёт старения населения земного шара частота переломов шейки бедра увеличится к 2050 г. в 2 раза [6]. Многочисленные исследования свидетельствуют о существенном вкладе генетических факторов в патогенез ОП [5, 9, 10, 18, 20, 21, 22, 23], но в последнее время большое внимание уделяется наследственным изменениям в экспрессии генов без первичного изменения ДНК, названным эпигенетическими факторами [11]. Особый интерес вызывает изучение роли микроРНК, эндогенных некодирующих РНК, состоящих из 18—24 нуклеотидов и регулирующих посттранскрипцион-

ную экспрессию генов путем связывания с целевыми матричными РНК [2, 14, 24, 25]. Многие гены несут потенциальные сайты распознавания для микроРНК, расположенные в 3'-нетранслируемой области (3'-НТО) мРНК мишеней. Полиморфизм сайтов связывания может менять сродство микроРНК к целевым генам, что может влиять на способность микроРНК регулировать экспрессию белка, изменяя их способность подавлять экспрессию мРНК и/или способствовать её деградации. Полиморфизмы сайтов связывания микроРНК широко и активно изучали в связи с их вкладом в генетическую предрасположенность к болезни Паркинсона и онкологическим заболеваниям [4, 26, 28]. Была обнаружена ассоциация немелкоклеточного рака лёгкого с полиморфизмом сайта связывания микроРНК-let-7 в 3'-НТО гена *KRAS* [8].

Исследования полиморфизма сайтов связывания микроРНК при заболеваниях скелета находятся в зачаточном состоянии. Существуют единичные исследования полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК у больных остеопорозом. Наиболее значимым является крупномасштабное исследование 997 европеоидов с использованием технологии чипов (платформа Affymetrix) и набора однонуклеотидных полиморфных вариантов HumanMapping500K [14]. Были отобраны 568 полиморфных вариантов из существующих баз данных и каталогов, которые, предположительно, могут влиять на предрасположенность к ОП. В результате проведённых исследований идентифицированы 7 локусов с потенциальными сайтами связывания для 12 различных микроРНК, ассоциированных с МПКТ шейки бедра с уровнем значимо-

сти $p < 0,01$ [14]. Изучение роли микроРНК в регулировании плотности кости, представляет собой новый рубеж в биологии кости, конкретные механизмы, с помощью которых полиморфизм сайтов связывания микроРНК оказывает влияние на ремоделирование костной ткани, еще предстоит выяснить.

Целью данного исследования является репликация результатов полногеномного исследования полиморфизма сайтов связывания микроРНК на основе изучения локусов rs6854081 гена *ZNF239*, rs6854081 гена *FGF2*, rs2745426 гена *VNN1*, rs10098470 гена *TPD52*, rs10518716 гена *FLJ11506*, rs17054320 гена *PLEKHG1*, rs1712 гена *FBXO5* у женщин постменопаузального возраста из Волго-Уральского региона России и поиск ассоциаций с переломами и уровнем МПКТ.

Материал и методы исследования

В работе использованы образцы ДНК 826 женщин постменопаузального возраста, проживающих на территории Республики Башкортостан и Свердловской области, с информированного согласия на участие в исследовании. Формирование выборки осуществлялось на базе клинических больниц №5 и №21 г.Уфы и областной клинической больницы №1 г.Екатеринбурга. Индивиды с хроническими заболеваниями, которые могут влиять на костную массу, были исключены из исследования, чтобы минимизировать факторы, влияющие на вариацию МПКТ. Общая выборка была разделена на группы в зависимости от этнической принадлежности и наличия переломов. В группу с переломами отобраны женщины с низкотравматичными переломами (350 чел.), произошедшими в постменопаузе, все переломы подтверждены рентгенологически. Оценка МПКТ шейки бедра и поясничного отдела позвоночника проведена у 551 женщины методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA) на аппарате QDR 4500A («Hologic», США). Согласно рекомендациям рабочей группы ВОЗ, для оценки результатов денситометрии используется Т-критерий. Значения от +2,5 до -0,9SD (стандартных отклонений) соответствует нормальной минеральной плотности кости, от -1 до -2,5SD — остеопении, -2,5 SD — остеопорозу. Исследование одобрено этическими комитетами ИБГ УНЦ РАН и БашГУ.

ДНК выделяли из периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли с применением метода детекции флуоресценции «по конечной точке» (TaqMan) на амплификаторе Bio-RadCFX96 с помощью сконструированных нами праймеров и зондов. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета программ статистического анализа Statistica 6.0. Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя соотношения шансов Odds Ratio (OR). Для оценки различий между двумя группами по уровню МПКТ применяли U-критерий Манна—Уитни и H-критерий Крускала—Уоллиса для оценки различий одновременно между несколькими выборками.

Результаты и обсуждение

Исследованные нами локусы располагаются в 3'-нетранслируемой области генов *ZNF239*, *FGF2*, *VNN1*, *TPD52*, *FLJ11506*, *PLEKHG1*, *FBXO5* в предполагаемых сайтах связывания микроРНК, согласно базе данных PolymiRTS (<http://compbio.utmem.edu/miRSNP>).

Распределение частот аллелей и генотипов изученных локусов представлено в табл. 1. По всем изученным локусам поддерживалось равновесие Харди—Вайнберга, наименьшая гетерозиготность наблюдалась по локусу rs10098470 (0,036), наибольшая — rs2745426 (0,444), значения ожидаемой гетерозиготности незначительно отличались от наблюдаемых показателей. Частота редкого аллеля (MAF) варьировала от 0,018 (rs10098470) до 0,349 (rs2745426) (табл. 2).

Полиморфный вариант rs6854081 (с. *3156T>G) расположен в сайте связывания микроРНК 146a и 146b в 3'-нетранслируемой области гена *FGF2*, локализованного в области 4q28.1 и кодирующего фактор роста фибробластов 2. Частота редкого аллеля *G варьировала от 10,9% в группе женщин без переломов до 11,7% у женщин с переломами, различия статистически незначимы ($\chi^2 = 0,251$; $p = 0,615$). Наибольшая частота гомозиготного генотипа *G*G исследуемого локуса выявлена у женщин с переломами (1,4%), тогда как в контрольной группе его частота не превышала 0,21%, различия достигают статистической значимости ($\chi^2 = 4,152$; $p = 0,042$). При этом не обнаружено значимых различий в распределении частот генотипов *T*G и *T*T полиморфизма rs6854081 между сравниваемыми группами ($p > 0,05$). Генотип *G*G оказался ассоциирован с повышенным риском переломов (OR = 6,88 (95%ДИ 0,800—59,180)). В группе женщин татарского происхождения выявленные закономерности сохранялись и генотип *G*G также оказался ассоциирован с повышенным риском переломов ($\chi^2 = 4,757$; $p = 0,029$; OR = 9,56 (95%ДИ 0,453—201,291), тогда как в выборке женщин русской этнической принадлежности частота аллеля *G была одинаковой в группах с переломами и без переломов (12,6 и 12,7% соответственно), различия в частоте генотипа *G*G не достигли статистической значимости ($\chi^2 = 1,415$; $p = 0,234$).

Мы разделили исследуемую выборку в зависимости от величины Т-критерия на 3 группы, согласно рекомендациям ВОЗ. Наибольшая частота аллеля *G полиморфизма rs6854081 выявлена у женщин с остеопорозом (14%), наименьшая — в группе с нормальным уровнем МПКТ (10,6%), в выборке с остеопенией составила 11,1%, различия не достигают статистической значимости. Сравнительный анализ распределения частот генотипов исследуемого локуса не показал статистически значимых различий между группами женщин с разным уровнем МПКТ. При разделении выборки в зависимости от этнического происхождения также не выявлено ассоциации полиморфизма rs6854081 гена *FGF2* со снижением уровня МПКТ.

Таблица 1

Распределение частот аллелей и генотипов изученных локусов у женщин постменопаузального возраста в зависимости от уровня МПКТ, наличия переломов и их этнической принадлежности

Выборки	n	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
1	2	3	4	5	6	7
rs6854081						
Общая выборка	826	*T	*G	*T*T	*T*G	*G*G
С переломами	350	(618) 0,883	(82) 0,117	(273) 0,78	(72) 0,206	(5) 0,014
Без переломов	476	(848) 0,891	(104) 0,109	(373) 0,784	(102) 0,214	(1) 0,0021
Остеопороз	224	(385) 0,86	(63) 0,140	(165) 0,737	(55) 0,245	(4) 0,018
Остеопения	144	(256) 0,889	(32) 0,111	(112) 0,778	(32) 0,222	0
Норма	183	(327) 0,893	(39) 0,107	(145) 0,793	(37) 0,202	(1) 0,005
Татары	247	*T	*G	*T*T	*T*G	*G*G
С переломами	86	(156) 0,907	(16) 0,093	(72) 0,837	(12) 0,140	(2) 0,023
Без переломов	161	(295) 0,916	(27) 0,084	(134) 0,832	(27) 0,168	0
Остеопороз	42	(78) 0,929	(6) 0,071	(37) 0,881	(4) 0,095	(1) 0,024
Остеопения	22	(39) 0,886	(5) 0,114	(17) 0,773	(5) 0,227	0
Норма	65	(122) 0,938	(8) 0,062	(57) 0,877	(8) 0,123	0
Русские	543	*T	*G	*T*T	*T*G	*G*G
С переломами	247	(432) 0,874	(62) 0,126	(188) 0,761	(56) 0,227	(3) 0,012
Без переломов	296	(517) 0,873	(75) 0,127	(222) 0,75	(73) 0,247	(1) 0,003
Остеопороз	176	(296) 0,841	(56) 0,159	(123) 0,699	(50) 0,284	(3) 0,017
Остеопения	118	(209) 0,886	(27) 0,114	(91) 0,771	(27) 0,229	0
Норма	110	(191) 0,868	(29) 0,132	(82) 0,746	(27) 0,245	(1) 0,009
rs10793442						
Общая выборка	826	*A	*C	*A*A	*A*C	*C*C
С переломами	350	(105) 0,15	(595) 0,85	(4) 0,011	(97) 0,277	(249) 0,712
Без переломов	476	(117) 0,123	(835) 0,877	(5) 0,010	(107) 0,225	(364) 0,765
Остеопороз	224	(71) 0,158	(377) 0,842	(3) 0,013	(65) 0,290	(156) 0,697
Остеопения	144	(36) 0,125	(252) 0,875	(1) 0,007	(34) 0,236	(109) 0,757
Норма	183	(40) 0,109	(326) 0,891	(2) 0,011	(36) 0,197	(145) 0,792
Татары	247	*A	*C	*A*A	*A*C	*C*C
С переломами	86	(37) 0,215	(135) 0,785	0	(37) 0,430	(49) 0,570
Без переломов	161	(48) 0,149	(274) 0,851	(2) 0,012	(44) 0,273	(115) 0,715
Остеопороз	42	(20) 0,238	(64) 0,762	0	(20) 0,476	(22) 0,524
Остеопения	22	(8) 0,182	(36) 0,818	0	(8) 0,364	(14) 0,636
Норма	65	(22) 0,169	(108) 0,831	(1) 0,015	(20) 0,308	(44) 0,677
Русские	543	*A	*C	*A*A	*A*C	*C*C
С переломами	247	(61) 0,123	(433) 0,877	(2) 0,008	(57) 0,231	(188) 0,761
Без переломов	296	(66) 0,111	(526) 0,889	(3) 0,010	(60) 0,203	(233) 0,787
Остеопороз	176	(51) 0,145	(301) 0,855	(3) 0,017	(45) 0,256	(128) 0,727
Остеопения	118	(28) 0,119	(208) 0,881	(1) 0,009	(26) 0,220	(91) 0,771
Норма	110	(17) 0,077	(203) 0,923	(1) 0,009	(15) 0,136	(94) 0,855
rs1712						
Общая выборка	824	*C	*T	*C*C	*C*T	*T*T
С переломами	349	(610) 0,874	(88) 0,126	(268) 0,768	(74) 0,212	(7) 0,020
Без переломов	475	(837) 0,881	(113) 0,119	(373) 0,785	(91) 0,192	(11) 0,023
Остеопороз	224	(399) 0,891	(49) 0,109	(179) 0,799	(41) 0,183	(4) 0,018
Остеопения	144	(242) 0,840	(46) 0,160	(100) 0,694	(42) 0,292	(2) 0,014
Норма	183	(320) 0,874	(46) 0,126	(142) 0,776	(36) 0,197	(5) 0,027

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таблица 1 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7
Татары	245	*C	*T	*C*C	*C*T	*T*T
С переломами	85	(154) 0,906	(16) 0,094	(69) 0,812	(16) 0,188	0
Без переломов	160	(281) 0,878	(39) 0,122	(126) 0,788	(29) 0,181	(5) 0,031
Остеопороз	42	(73) 0,869	(11) 0,131	(31) 0,738	(11) 0,262	0
Остеопения	22	(36) 0,818	(8) 0,182	(15) 0,682	(6) 0,273	(1) 0,045
Норма	65	(117) 0,900	(13) 0,100	(53) 0,815	(11) 0,170	(1) 0,015
Русские	543	*C	*T	*C*C	*C*T	*T*T
С переломами	247	(423) 0,856	(71) 0,144	(183) 0,741	(57) 0,231	(7) 0,028
Без переломов	296	(521) 0,88	(71) 0,12	(231) 0,780	(59) 0,20	(6) 0,02
Остеопороз	176	(314) 0,892	(38) 0,108	(142) 0,807	(30) 0,170	(4) 0,023
Остеопения	118	(198) 0,839	(38) 0,161	(81) 0,687	(36) 0,305	(1) 0,008
Норма	110	(189) 0,859	(31) 0,141	(83) 0,755	(23) 0,209	(4) 0,036
rs10518716						
Общая выборка	826	*C	*G	*C*C	*C*G	*G*G
С переломами	350	(150) 0,214	(550) 0,786	(21) 0,06	(108) 0,309	(221) 0,631
Без переломов	476	(214) 0,225	(738) 0,775	(19) 0,04	(176) 0,37	(281) 0,590
Остеопороз	224	(97) 0,217	(351) 0,783	(13) 0,058	(71) 0,317	(140) 0,625
Остеопения	144	(63) 0,219	(225) 0,781	(8) 0,056	(47) 0,326	(89) 0,618
Норма	183	(75) 0,205	(291) 0,795	(9) 0,049	(57) 0,312	(117) 0,639
Татары	247	*C	*G	*C*C	*C*G	*G*G
С переломами	86	(40) 0,233	(132) 0,767	(7) 0,081	(26) 0,302	(53) 0,617
Без переломов	161	(89) 0,276	(233) 0,724	(9) 0,056	(71) 0,441	(81) 0,503
Остеопороз	42	(23) 0,274	(61) 0,726	(5) 0,119	(13) 0,309	(24) 0,572
Остеопения	22	(13) 0,295	(31) 0,705	(3) 0,136	(7) 0,318	(12) 0,546
Норма	65	(29) 0,223	(101) 0,777	(4) 0,061	(21) 0,323	(40) 0,616
Русские	543	*C	*G	*C*C	*C*G	*G*G
С переломами	247	(98) 0,198	(396) 0,802	(11) 0,044	(76) 0,308	(160) 0,648
Без переломов	296	(116) 0,196	(476) 0,804	(9) 0,030	(98) 0,331	(189) 0,639
Остеопороз	176	(70) 0,199	(282) 0,801	(7) 0,040	(56) 0,318	(113) 0,642
Остеопения	118	(48) 0,203	(188) 0,797	(5) 0,042	(38) 0,322	(75) 0,636
Норма	110	(38) 0,173	(182) 0,827	(3) 0,027	(32) 0,291	(75) 0,682
rs10098470						
Общая выборка	826	*C	*T	*C*C	*C*T	*T*T
С переломами	350	(685) 0,979	(15) 0,021	(335) 0,957	(15) 0,043	0
Без переломов	476	(937) 0,984	(15) 0,016	(461) 0,968	(15) 0,032	0
Остеопороз	224	(441) 0,984	(7) 0,016	(217) 0,969	(7) 0,031	0
Остеопения	144	(282) 0,979	(6) 0,021	(138) 0,958	(6) 0,042	0
Норма	183	(362) 0,989	(4) 0,011	(179) 0,978	(4) 0,022	0
Татары	247	*C	*T	*C*C	*C*T	*T*T
С переломами	86	(169) 0,983	(3) 0,017	(83) 0,965	(3) 0,035	0
Без переломов	161	(310) 0,963	(12) 0,037	(149) 0,925	(12) 0,075	0
Остеопороз	42	(82) 0,976	(2) 0,024	(40) 0,952	(2) 0,048	0
Остеопения	22	(41) 0,932	(3) 0,068	(19) 0,864	(3) 0,136	0
Норма	65	(128) 0,985	(2) 0,015	(63) 0,969	(2) 0,301	0
Русские	543	*C	*T	*C*C	*C*T	*T*T
С переломами	247	(485) 0,982	(9) 0,018	(238) 0,964	(9) 0,036	0
Без переломов	296	(589) 0,995	(3) 0,005	(293) 0,990	(3) 0,010	0
Остеопороз	176	(347) 0,986	(5) 0,014	(171) 0,972	(5) 0,028	0
Остеопения	118	(230) 0,988	(3) 0,012	(115) 0,975	(3) 0,025	0
Норма	110	(218) 0,991	(2) 0,009	(108) 0,982	(2) 0,018	0

Таблица 1 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7
rs17054320						
Общая выборка	826	*A	*T	*A*A	*A*T	*T*T
С переломами	350	(679) 0,970	(21) 0,030	(329) 0,940	(21) 0,060	0
Без переломов	476	(930) 0,977	(22) 0,023	(456) 0,959	(18) 0,037	(2) 0,004
Остеопороз	224	(437) 0,975	(11) 0,025	(213) 0,951	(11) 0,049	0
Остеопения	144	(281) 0,976	(7) 0,024	(137) 0,951	(7) 0,049	0
Норма	183	(358) 0,978	(8) 0,022	(175) 0,956	(8) 0,044	0
Татары	247	*A	*T	*A*A	*A*T	*T*T
С переломами	86	(166) 0,982	(3) 0,018	(83) 0,965	(3) 0,035	0
Без переломов	161	(312) 0,969	(10) 0,031	(153) 0,951	(6) 0,037	(2) 0,012
Остеопороз	42	(40) 0,952	(2) 0,024	(40) 0,952	(2) 0,048	0
Остеопения	22	(44)	0	(22)	0	0
Норма	65	(128) 0,985	(2) 0,015	(63) 0,969	(2) 0,031	0
Русские	543	*A	*T	*A*A	*A*T	*T*T
С переломами	247	(476) 0,964	(18) 0,036	(229) 0,927	(18) 0,073	0
Без переломов	296	(580) 0,98	(12) 0,02	(284) 0,959	(12) 0,041	0
Остеопороз	176	(343) 0,974	(9) 0,026	(167) 0,949	(9) 0,051	0
Остеопения	118	(229) 0,970	(7) 0,030	(111) 0,941	(7) 0,059	0
Норма	110	(214) 0,973	(6) 0,027	(104) 0,945	(6) 0,055	0
rs2745426						
Общая выборка	826	*C	*T	*C*C	*C*T	*T*T
С переломами	350	(456) 0,651	(244) 0,349	(151) 0,431	(154) 0,44	(45) 0,129
Без переломов	476	(623) 0,654	(329) 0,346	(205) 0,430	(213) 0,447	(58) 0,122
Остеопороз	224	(287) 0,641	(161) 0,359	(90) 0,402	(107) 0,478	(27) 0,120
Остеопения	144	(188) 0,653	(100) 0,347	(61) 0,424	(66) 0,458	(17) 0,118
Норма	183	(246) 0,672	(120) 0,328	(86) 0,470	(74) 0,404	(23) 0,126
Татары	247	*C	*T	*C*C	*C*T	*T*T
С переломами	86	(116) 0,674	(56) 0,326	(41) 0,477	(34) 0,395	(11) 0,128
Без переломов	161	(217) 0,674	(105) 0,326	(74) 0,460	(69) 0,428	(18) 0,112
Остеопороз	42	(51) 0,607	(33) 0,393	(17) 0,405	(17) 0,405	(8) 0,190
Остеопения	22	(29) 0,659	(15) 0,341	(9) 0,409	(11) 0,500	(2) 0,091
Норма	65	(88) 0,677	(42) 0,323	(31) 0,477	(26) 0,4	(8) 0,123
Русские	543	*C	*T	*C*C	*C*T	*T*T
С переломами	247	(322) 0,652	(172) 0,348	(107) 0,433	(108) 0,437	(32) 0,130
Без переломов	296	(377) 0,637	(215) 0,363	(120) 0,405	(137) 0,463	(39) 0,132
Остеопороз	176	(228) 0,648	(124) 0,352	(71) 0,403	(86) 0,489	(19) 0,108
Остеопения	118	(153) 0,648	(83) 0,352	(50) 0,424	(53) 0,449	(15) 0,127
Норма	110	(147) 0,668	(73) 0,332	(52) 0,473	(43) 0,391	(15) 0,136

Фактор роста фибробластов играет важную функциональную роль в биологии кости. Он участвует в развитии костного матрикса и регулировании ремоделирования костной ткани и имеет прямое и косвенное влияние на формирование остеокластов и резорбцию костной ткани. В частности, полагают, что фактор роста фибробластов стимулирует увеличение количества остеокластов и ускорение костной резорбции. В проведенном ранее исследовании и его последующей репликации в независимой выборке из 1728 европейцев выявлено, что

3 полиморфизма (*rs6854081*, *rs1048201* и *rs7683093*) в 3'-НТО гена фактора роста фибробластов 2 (*FGF2*), были ассоциированы с уровнем МПКТ шейки бедра и оказались потенциальными сайтами связывания для 9 микроРНК. Авторы предположили потенциальный механизм, посредством которого полиморфизмы сайтов связывания микроРНК регулируют уровень МПКТ: транскрипты, содержащие аллель **T* полиморфизма *rs6854081*, оптимально будут связывать мРНК с микроРНК 146a и микроРНК 146b, подавляя белковую

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

экспрессию. С другой стороны, связь этих микроРНК с транскриптами мРНК с аллелем *G не будет столь сильной и, следовательно, будет способствовать более высоким уровням экспрессии белка. Высокий уровень белка FGF стимулирует остеокластогенез и повышает резорбцию костной ткани, что приводит к снижению МПКТ [14].

Учитывая результаты исследования Shu-Feng Lei с соавторами, мы провели анализ зависимости количественных показателей МПКТ (г/см²) шейки бедра и позвоночника от генотипов исследуемого локуса. Оказалось, что у женщин с генотипом *T*G уровень МПКТ шейки бедра статистически значимо выше по сравнению с носителями гомозиготного генотипа *T*T (p = 0,034) (рисунок). Из-за низкой частоты аллеля *G, не удалось оценить связь уровня МПКТ с гомозиготным генотипом *G*G. Статистически значимых различий уровня МПКТ позвонков у носителей разных генотипов полиморфизма rs6854081 гена FGF2 у женщин татарской этнической принадлежности и МПКТ как шейки бедра, так и позвонков у русских не обнаружено. Полученные нами данные противоречат результатам исследований

Shu-Feng Lei с соавторами [14], у которых аллель *G ассоциирован с низкими значениями МПКТ шейки бедра, возможно, это связано с особенностями генетической структуры популяции татар.

Тот факт, что генотип *G*G полиморфизма rs6854081 статистически значимо ассоциирован с переломами у женщин татарской этнической принадлежности, а также с высокими значениями МПКТ шейки бедра говорит о том, что возможно, переломы и уровень МПКТ являются двумя независимыми фенотипическими проявлениями остеопороза.

Однонуклеотидный полиморфизм rs10793442 (с.*332G>T) расположен в 3'-НТО гена ZNF239 или MOK2, локализованного в области 10q11.21, кодирующего белок 239 «цинковых пальцев», и имеет сродство с микроРНК361 [1]. Этот белок относится к группе ДНК-связывающих белков, является регулятором транскрипции, содержит характерный домен, который включает 2 цистеиновых и 1 гистидиновый остаток, а расположенная между ними полипептидная цепочка выпячивается в виде «пальца». Помимо связывания с ДНК цинковые пальцы могут обеспечивать также бе-

Таблица 2

Характеристика исследуемых локусов

Общая выборка				
Локус	H _{obs}	H _{pred}	HW _{pval}	MAF
rs10793442	0,247	0,234	0,141	0,135
rs10518716	0,343	0,342	1,0	0,219
rs10098470	0,036	0,035	1,0	0,018
rs6854081	0,214	0,202	0,119	0,114
rs2745426	0,444	0,454	0,547	0,349
rs17054320	0,046	0,050	0,195	0,026
rs1712	0,200	0,213	0,103	0,121
Русские				
rs10793442	0,215	0,208	0,636	0,118
rs10518716	0,320	0,315	0,827	0,196
rs10098470	0,023	0,023	1,0	0,012
rs6854081	0,24	0,222	0,072	0,127
rs2745426	0,451	0,461	0,666	0,360
rs17054320	0,054	0,052	1,0	0,027
rs1712	0,213	0,226	0,240	0,130
Татары				
rs10793442	0,321	0,289	0,094	0,175
rs10518716	0,387	0,391	0,954	0,266
rs10098470	0,062	0,060	1,0	0,031
rs6854081	0,161	0,160	1,0	0,088
rs2745426	0,427	0,440	0,702	0,327
rs17054320	0,033	0,046	0,014*	0,024
rs1712	0,180	0,193	0,383	0,108
Примечание. H _{obs} — наблюдаемая гетерозиготность; H _{pred} — ожидаемая гетерозиготность; HW _{pval} — показатель p для оценки соответствия равновесию Харди–Вайнберга; MAF — частота минорного аллеля; * 1,0 в контрольной группе				

лок-белковые и РНК-белковые взаимодействия. В большинстве своем белки, содержащие цинковые пальцы, являются регуляторами экспрессии генов и играют важную роль в таких процессах, как эмбриональное развитие, дифференцировка клеток, подавление злокачественной трансформации клеток (онкосупрессия).

В результате исследования полиморфного варианта *rs10793442* в гене *ZNF239* не обнаружено ассоциаций аллелей и генотипов исследуемого локуса с переломами в общей выборке больных и у женщин русской этнической принадлежности. Наблюдается повышение частоты минорного аллеля **A* у женщин татарского происхождения как у больных с переломами (21,5%), так и в контрольной группе (14,9%) по сравнению с женщинами русской этнической принадлежности (12,3 и 11,1% соответственно). Различия в частоте аллеля **A* между группами с переломами и их отсутствием у татар не достигают статистической значимости ($\chi^2 = 3,433$; $p = 0,063$). Обнаружены статистически значимые различия по частотам генотипов **A*C* и **C*C* между группами женщин с переломами и без переломов татарской этнической принадлежности ($\chi^2 = 6,264$; $p = 0,012$ и $\chi^2 = 5,247$; $p = 0,021$ соответственно). Генотип **A*C* ассоциирован с риском переломов (OR = 2,01; 95%ДИ 1,158–3,479), **C*C* — протективные (OR = 0,529; 95%ДИ 0,306–0,915) в отношении переломов у татар постменопаузального возраста.

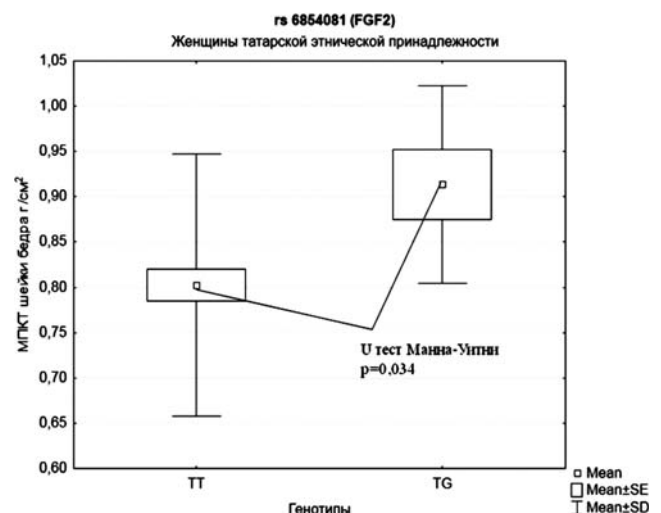
Разделение выборки согласно Т-критерию выявило статистически значимое повышение частоты аллеля **A* у женщин с остеопорозом (15,8%) по сравнению с группой с нормальным уровнем МПКТ (10,9%) ($\chi^2 = 4,139$; $p = 0,041$). Показатель отношения шансов равен 1,53 (95%ДИ 1,013–2,324), что свидетельствует о повышенном риске остеопороза для носителей аллеля **A* полиморфизма *rs10793442*. У женщин с остеопенией наблюдается промежуточное значение частоты аллеля **A* (12,5%). Генотип **A*C* оказался маркером повышенного риска ($\chi^2 = 4,714$; $p = 0,029$; OR = 1,67 (95%ДИ 1,049–2,657), генотип **C*C* — пониженного риска развития остеопороза ($\chi^2 = 4,81$; $p = 0,028$; OR = 0,60 (95%ДИ 0,301–0,949). При рассмотрении выборок в зависимости от этнической принадлежности, полученные закономерности сохраняются для русских, у женщин татарского происхождения остаются на уровне тенденции и не достигают статистически значимых ассоциаций из-за меньшей выборки (табл. 1). У женщин русской этнической принадлежности аллель **A* и генотип **A*C* являются маркерами повышенного риска развития остеопороза ($\chi^2 = 5,908$; $p = 0,015$; OR = 2,02 (95%ДИ 1,136–3,602) и $\chi^2 = 5,813$; $p = 0,015$; OR = 2,18 (95%ДИ 1,45–4,13)).

Полиморфизм *rs1712* (с. **433C>T*) расположен в 3'-нетранслируемой области гена *FBXO5* и имеет сродство с микроРНК 549. Ген *FBXO5* кодирует белок ингибитора митоза на ранней стадии Emi1, который регулирует митоз на стадии анафазы путем активации циклосомы

[19]. Проведённый анализ полиморфизма *rs1712* показал, что частота редкого аллеля **T* варьировала от 11,9% в контрольной группе до 12,6% у женщин с переломами. У женщин русской этнической принадлежности с переломами частота данного аллеля была выше и составила 14,4% по сравнению с соответствующей группой татар (9,4%), у которых аллель **T* чаще встречался в контрольной группе (12,2%), различия статистически незначимы. Сравнительный анализ распределения частот генотипов исследуемого локуса также не выявил статистически значимых различий между группами сравнения.

У женщин с остеопенией выявлена наибольшая частота аллеля **T* (16%) по сравнению с больными остеопорозом (10,9%) и контрольной группой с нормальным уровнем МПКТ (12,6%). Не обнаружено ассоциаций аллелей и генотипов полиморфизма *rs1712* (с. **433C>T*) с уровнем МПКТ у женщин постменопаузального возраста русской и татарской этнической принадлежности.

Полиморфный локус *rs10518716* (с. **336C>G*) расположен в 3'-нетранслируемой области гена белка, связывающегося с альфа- и гамма-субъединицами адаптина (AAGAB; alpha- and gamma-adaptin binding protein; 15q22.33-q23), относящегося к группе внутриклеточных белков, участвующих в везикулярном транспорте, и имеет сродство с микроРНК-380-5p и 563 [16]. У женщин русской этнической принадлежности с переломами выявлены схожие частоты аллелей и генотипов исследуемого локуса с соответствующей контрольной группой (табл. 1). У татар с переломами наблюдается повышение частоты аллеля **G* (76,7%) и гомозиготного генотипа **G*G* (61,7%) по сравнению с контрольной группой (72,4 и 50,3% соответственно), различия не достигают статистической значимости. Гетерозиготный генотип **C*G* статистически значимо чаще встречался у женщин без переломов (44,1%) по сравнению с группой с переломами (30,2%; $\chi^2 = 4,519$; $p = 0,033$; OR = 0,549 (95%ДИ 0,315–0,957)). Сравнительный анализ распре-



деления частот аллелей и генотипов исследуемого локуса между группами женщин с разным уровнем МПКТ не выявил зависимости МПКТ от генотипов полиморфизма rs10518716 как в общей выборке, так и в зависимости от их этнической принадлежности.

Полиморфный вариант rs10098470 (с. *1073C>T) расположен в 3'- нетранслируемой области гена *TPD52* (8q21.13), кодирующего опухолевый белок D52, связанный с клеточной пролиферацией и апоптозом [7].

Обнаружена ассоциация редкого аллеля *T и гетерозиготного генотипа *C*T с переломами у женщин русской этнической принадлежности ($\chi^2 = 4,262$; $p = 0,039$; OR = 3,64 (95%ДИ 0,981—13,531) и $\chi^2 = 4,310$; $p = 0,037$; OR = 3,69 (95%ДИ 0,988—13,793)). Гомозиготный генотип *T*T не выявлен в исследуемых группах русских и татар. Генотип *C*C оказался фактором пониженного риска развития переломов у женщин русского происхождения ($\chi^2 = 4,279$; $p = 0,039$; OR = 0,27 (95%ДИ 0,073—1,015)). У женщин татарской этнической принадлежности не выявлено ассоциаций аллелей и генотипов полиморфизма rs10098470 гена *TPD52* с риском развития переломов.

При рассмотрении выборки в зависимости от уровня МПКТ максимальная частота аллеля *T была у женщин с остеопенией татарского происхождения (6,8%), тогда как в соответствующей контрольной группе с нормальным уровнем МПКТ она не превышала 1,5%, различия не достигают статистической значимости из-за низкой частоты аллеля ($\chi^2 = 3,283$; $p = 0,069$). У русских также частота аллеля *T была выше у женщин с низкими значениями МПКТ, составляя 1,2% в группе с остеопенией и 1,4% — с остеопорозом по сравнению с 0,9% в контрольной группе, различия статистически незначимы. Сравнительный анализ распределения частот генотипов полиморфизма rs10098470 между группами с разным уровнем МПКТ также не выявил статистически значимых различий.

Полиморфизм rs17054320 (с. *821T>A) расположен в 3' области гена *PLEKHG1* (6q25.1), кодирующего белок содержащий домен гомолог плекстрина, семейство G (с RhoGef домен) член 1 (http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=20884). Частота минорного аллеля *T варьировала от 2,3% у женщин без переломов до 3,0% в общей группе с переломами, схожее распределение частоты данного аллеля наблюдалось у русских, тогда как у татар выявлена обратная тенденция повышения частоты аллеля *T у женщин без переломов (3,1%) по сравнению с группой с переломами (1,8%), различия не достигают статистической значимости. Сравнительный анализ распределения частот генотипов также не выявил статистически значимых различий между группами сравнения.

При рассмотрении исследуемой выборки в зависимости от уровня МПКТ выявлены схожие частоты аллелей и генотипов полиморфизма rs17054320 у женщин с остеопенией, остеопорозом и нормальными показате-

лями МПКТ русской и татарской этнической принадлежности. Частота аллеля *T варьировала от 2,2% у здоровых до 2,5% у женщин с остеопорозом.

Нами также проведен анализ полиморфного варианта rs2745426 (с. *935C>T), расположенного в 3'- нетранслируемой области гена *VNN1* (6q23.2), кодирующего белок семейства ванинов, секретируемых мембранных белков, участвующих в транспорте гемопоэтических клеток, а также обладающих пантетеиназной активностью и играющих важную роль в окислительно-стрессовых реакциях [17].

Частота минорного аллеля *T полиморфизма rs2745426 была практически одинаковой в группах с переломами и без переломов, составляя 34,9 и 34,6% соответственно. У женщин русской этнической принадлежности наблюдается повышение частоты аллеля *T в группе без переломов (36,3%) по сравнению с выборкой с переломами (34,8%), различия не достигают статистической значимости. Анализ распределения частот генотипов также не выявил статистических различий между сравниваемыми группами.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов в группах женщин с остеопорозом, остеопенией и нормальным уровнем МПКТ не выявил статистически значимых различий. Наибольшая частота аллеля *T исследуемого локуса наблюдалась у женщин с остеопорозом татарской этнической принадлежности (39,3%), незначительно превышая таковую у женщин с остеопенией (34%) и нормальным уровнем МПКТ (32,3%). У женщин русской этнической принадлежности выявлены схожие частоты аллеля *T — 35,2% при остеопорозе и остеопении и 33,2% в контрольной группе. Частоты генотипов также были сопоставимы между сравниваемыми группами.

Таким образом, проведенное нами исследование позволило установить, что генотип *C*T локуса rs10098470 гена *TPD52* является маркером повышенного риска переломов у русских женщин, а генотип *C*C оказался протективным маркером. У женщин татарской этнической принадлежности выявлена ассоциация генотипов *A*C локуса rs10793442 гена *ZNF239*, *G*G локуса rs10518716 гена *FLJ11506*, *G*G полиморфного локуса rs6854081 гена *FGF2u* аллеля *C полиморфного локуса rs1712 гена *FBXO5* с развитием переломов, генотип *C*C rs10793442 гена *ZNF239* является маркером пониженного риска развития переломов. Маркерами повышенного риска развития остеопороза являются генотип *C*T полиморфизма rs1712 в гене *FBXO5*, аллель *A и генотип *A*C локуса rs10793442 гена *ZNF239*. Генотип *T*G полиморфного локуса rs6854081 гена *FGF2* ассоциирован с низким уровнем МПКТ шейки бедра.

Представленные результаты являются первыми шагами к пониманию роли полиморфизма сайтов связывания микроРНК в формировании низкого уровня МПКТ и развития остеопоротических переломов у женщин постменопаузального возраста русской и татарской этни-

ческой принадлежности из Волго-Уральского региона России. Эти данные могут представлять значительный интерес для ученых, изучающих проблему остеопороза. Необходимы дальнейшие исследования для получения дополнительной информации о значимости полиморфизма 3'-НТО мРНК в регуляции экспрессии генов, имеющих отношение к биологии кости, а также определения функциональной значимости генов, выявленных в результате полногеномных исследований ассоциаций (GWAS) в формировании предрасположенности к остеопорозу.

Список литературы

1. Arranz V., Harper F., Florentin Y. et al. Human and mouse MOK2 proteins are associated with nuclear ribonucleoprotein components and bind specifically to RNA and DNA through their zinc finger domains // *Mol. Cell. Biol.* — 1997. — Vol. 17(4). — P. 2116–226.
2. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell.* — 2004. — Vol. 116. — P. 281–297.
3. Bliuc D., Nguyen N.D., Milch V.E. et al. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women // *JAMA.* — 2009. — Vol. 301. — P. 513–521.
4. Brendle A., Lei H., Brandt A. et al. Polymorphisms in predicted microRNA-binding sites in integrin genes and breast cancer: ITGB4 as prognostic marker // *Carcinogenesis.* — 2008. — Vol. 29. — P. 1394–1399.
5. Brown L.B., Streeten E.A., Shapiro J.R. et al. Genetic and environmental influences on bone mineral density in pre- and post-menopausal women // *Osteoporos Int.* — 2005. — Vol. 16. — P. 1849–1856.
6. Burge R., Dawson-Hughes B., Solomon D.H. et al. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005–2025 // *J. Bone Miner. Res.* — 2007. — Vol. 22. — P. 465–475.
7. Byrne J. A., Mattei M.-G., Basset P. Definition of the tumor protein D52 (TPD52) gene family through cloning of D52 homologues in human (hD53) and mouse (mD52) // *Genomics.* — 1996. — Vol. 35. — P. 523–532.
8. Chin L., Ratner E., Leng S. et al. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases nonsmall cell lung cancer risk // *Cancer Res.* — 2008. — Vol. 68. — P. 8535–8540.
9. Duncan E.L., Danoy P., Kemp J.P. et al. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk // *PLoS Genet* 7. — 2011. — e1001372.
10. Estrada K., Styrkarsdottir U., Evangelou E. et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture // *Nat. Genet.* — 2012. — Vol. 44. — P. 491–501.
11. Holroyd C., Harvey N., Dennison E., Cooper C. Epigenetic influences in the developmental origins of osteoporosis // *Osteoporos Int.* — 2012. — Vol. 23(2). — P. 401–410.
12. Gass M., Dawson-Hughes B. Preventing osteoporosis-related fractures: an overview // *Am. J. Med.* — 2006. — Vol. 119. — P. 3–11.
13. Kanis J.A., Melton L.J. 3rd, Christiansen C., Johnston C.C., Khaltayev N. The diagnosis of osteoporosis // *J. Bone Miner. Res.* — 1994. — Vol. 9. — P. 1137–1141.
14. Lei S., Papasian C., Deng H. Polymorphisms in predicted miRNA binding sites and osteoporosis // *J. Bone Miner. Res.* — 2011. — Vol. 26. — P. 72–78.
15. Melton L.J. 3rd. Adverse outcomes of osteoporotic fractures in the general population // *J. Bone Miner. Res.* — 2003. — Vol. 18(6). — P. 1139–1141.
16. Page L.J., Sowerby P.J., Lui W.W.Y., Robinson M.S. Gamma-synergin: an EH domain-containing protein that interacts with gamma-adaptin // *J. Cell. Biol.* — 1999. — Vol. 146. — P. 993–1004.
17. Pitari G., Malergue F., Martin F. et al. Pantetheinase activity of membrane-bound vanin-1: lack of free cysteamine in tissues of vanin-1 deficient mice // *FEBS Lett.* — 2000. — Vol. 483. — P. 149–154.
18. Ralston S.H., Uitterlinden A.G. Genetics of osteoporosis // *Endocrine Reviews.* — 2010. — Vol. 31. — P. 629–662.
19. Reimann J.D., Freed E., Hsu J.Y. et al. Emil is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex // *Cell.* — 2001. — Vol. 105 (5). — P. 645–655.
20. Richards J.B., Rivadeneira F., Inouye M. et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study // *Lancet.* — 2008. — Vol. 371. — P. 1505–1512.
21. Rivadeneira F., Styrkarsdottir U., Estrada K. et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies // *Nat. Genet.* — 2009. — Vol. 41. — P. 1199–1206.
22. Styrkarsdottir U., Halldorsson B.V., Gretarsdottir S. et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures // *N. Engl. J. Med.* — 2008. — Vol. 358. — P. 2355–2365.
23. Styrkarsdottir U., Halldorsson B.V., Gretarsdottir S. et al. New sequence variants associated with bone mineral density // *Nat. Genet.* — 2009. — Vol. 41. — P. 15–17.
24. Taipaleenmaki H., Hokland L., Chen L. et al. Mechanisms in endocrinology: micro-RNAs: targets for enhancing osteoblast differentiation and bone formation // *Eur. J. Endocrinol.* — 2012. — Vol. 166. — P. 359–371.
25. van Wijnen A., Jeroen van de Peppel, Johannes P., et al. MicroRNA Functions in Osteogenesis and Dysfunctions in Osteoporosis // *Current Osteoporosis Reports.* — 2013. — Vol. 11 (2). — P. 72–82.
26. Wang G., van der Walt J., Mayhew G. et al. Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein // *Am. J. Hum. Genet.* — 2008. — Vol. 82. — P. 283–289.
27. Xia Z., Chen C., Chen P. et al. MicroRNAs and their roles in osteoclast differentiation // *Front Med.* — 2011. — Vol. 5. — P. 414–419.
28. Xu T., Zhu Y., Wei Q. et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma // *Carcinogenesis.* — 2008. — Vol. 29. — P. 2126–2131.

The study of polymorphisms in microRNA target sites in patients with postmenopausal osteoporosis

Khusainova R.I.¹, Maltsev A.V.², Khusnutdinova E.K.^{1,2}

¹ — Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Centre of RAS, Ufa

² — Bashkir State University; Ufa

E-mail: ritakh@mail.ru

We studied the polymorphisms in microRNA target sites: *rs10793442* of *ZNF239* gene, *rs6854081* of *FGF2* gene, *rs2745426* of *VNN1* gene, *rs10098470* of *TPD52* gene, *rs10518716* of *FLJ11506* gene, *rs17054320* of *PLEKHG1* gene, *rs1712* of *FBXO5* gene and performed association analyses to investigate the potential role of these polymorphisms with the risk of fractures and the level of bone mineral density (BMD) in 826 postmenopausal women of Russian and Tatar ethnicity from the Volga-Ural region of Russia. Allele *A and genotype *A*C of *rs10793442* were markers of osteoporosis, genotype *C*C — a marker of reduced risk of osteoporosis. Women of Tatar ethnicity revealed association of genotypes *A*C of *rs10793442* locus, *G*G of *rs6854081*, *G*G of *rs10518716* and allele *C of *rs1712* with development of fractures. Genotype *C*T of *rs10098470* locus is a marker of increased risk of fractures among Russian women. We found statistically significant dependence of femoral neck BMD level from genotypes of polymorphic locus *rs6854081* of *FGF2* gene.

Key words: osteoporosis, bone mineral density, fractures, miRNA target sites, epigenetics

Эпидемиология наследственных нервно-мышечных заболеваний в Республике Дагестан

Ахмедова П.Г.¹, Зинченко Р.А.², Угаров И.В.³, Умаханова З.Р.¹, Магомедова Р.М.¹

¹ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Дагестанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Республика Дагестан, 367000, г. Махачкала, ул. Ленина дом 1; факс (8722) 68-12-80; e-mail: apgg@mail.ru, zoia-umakhanova@yandex.ru, raisatdgm@mail.ru

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1; факс (499) 324-07-02; e-mail: renazinchenco@mail.ru

³ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2; факс (499) 248-05-53; e-mail: iugarov@yandex.ru

Созданный в Дагестане в 2005 г. регистр наследственных нервно-мышечных заболеваний (ННМЗ) позволяет хранить и анализировать информацию по пациентам с ННМЗ и даёт возможность использовать его в эпидемиологических исследованиях, прогнозировать тяжесть и картину течения отдельных нозологических форм в зависимости от генетического дефекта. Проведено клинико-эпидемиологическое исследование ННМЗ у населения 41 района и 10 городов Республики Дагестан (РД). Исследование проводилось в соответствии с протоколом, разработанным в лаборатории генетической эпидемиологии ФГБУ «МГНЦ» РАМН, а также на основании данных регистра. Рассчитаны значения отягощённости населения ННМЗ с ауто-сомно-доминантным, ауто-сомно-рецессивным и Х-сцепленным типами наследования. Изучено разнообразие ННМЗ в обследованных районах РД, выявлены 10 форм ННМЗ: прогрессирующие мышечные дистрофии (ПМД) Дюшенна/Беккера, ПМД Ландузи—Дежерина, ПМД Эмери—Дрейфуса, поясно-конечностные ПМД, офтальмоплегическая форма ПМД, спинальные мышечные атрофии, наследственные моторно-сенсорные нейропатии, миотоническая дистрофия, врождённая миотония Томсона, синдром ригидного позвоночника.

Ключевые слова: нервно-мышечные болезни, отягощённость, эпидемиология, регистр

Введение

Число форм моногенных ННМЗ, представляющих собой самую большую группу генетически гетерогенных наследственных болезней нервной системы приближается к 200 [3]. Каждый из вновь идентифицированных генетических вариантов имеет особенности клинических проявлений, однако проведение дифференциальной диагностики конкретных нозологических форм не всегда легко выполнимо для большинства врачей практического здравоохранения. Современная диагностика ННМЗ обязательно должна сочетать в себе глубокий генеалогический анализ и молекулярно-генетическую диагностику. Одной из форм внедрения научных достижений в практическое здравоохранение являются регистры наследственных болезней. Данные международного регистра помогают собрать информацию об особенностях течения заболевания в различных странах, обеспечить поддержку по улучшению качества медицинской помощи и стандартов диагностики и лечения больных с наследственной патологией. Многие страны с развитой системой здравоохранения ведут собственные национальные регистры врождённой и наследственной, в том числе нервно-мышечной патологии. На территории Российской Федерации такие регистры чаще охватывают отдельные области, города и имеют более узкое направление [1, 5—8, 11, 15].

Одной из популяций, обладающих чрезвычайно высокой потенциальной информативностью для медицинской генетики, является популяция Республики Дагестан (РД), в которой проживает 2 млн 946 тыс. чел. (102 народности, говорящих на 42 языках). РД характеризуется рядом уникальных демографических и генетических параметров: высокой рождаемостью и разветвлённой структурой семей с большим количеством детей, тенденцией к однонациональным бракам, преобладанием сельского населения, живущего как на равнинной территории, так и в более изолированных территориях в предгорной и горной местности (55,7% территории республики составляют горы), и высоким уровнем инбридинга.

Материалы и методы

Нами обработаны и проанализированы архивные материалы за 2005—2013 гг. в республиканском, городских и районных МСЭК, неврологических стационарах, поликлиниках, медсанчастях, республиканской медико-генетической консультации, журналах консультативного приема кафедры факультета подготовки кадров и переподготовки специалистов Дагестанской государственной медицинской академии (ФПК и ППС ДГМА). Полученные из разных источников сведения уточня-

лись и дополнялись личным обследованием пробандов и их семей. На пациентов заполнялась специально разработанная карта фенотипа. Регистр ННМЗ «Нейроре-гистр Дагестана» был создан на основе платформы для разработки диагностических программ xGen IDS с использованием языка программирования Visual Basic в среде разработки MS Visual Studio 98. Молекулярно-генетическое исследование пациентов проводилось в ДНК-лаборатории ФГБУ «МГНЦ» РАМН.

Отягощённость населения ННМЗ рассчитана как отношение реального числа больных с определённым типом наследования — аутосомно-доминантным (АД) и аутосомно-рецессивным (АР) к численности обследованного населения (на 10 000 обследованных). Отягощённость для Х-сцепленной (Х-сц.) патологии рассчитана на 10 000 мужчин. К отягощённости рассчитана стандартная ошибка. Учитывая территориальное расположение районов, вся рассматриваемая выборка обследованных районов РД для анализа отягощённости подразделена на равнинные районы, предгорные и горные районы. Для сравнения отягощённости между популяциями использована статистика χ^2 .

Результаты и обсуждение

Регистр ННМЗ был создан в 2005 г. Он постоянно пополняется информацией от врачей-неврологов Республики, а также собственными данными авторов. В 2013 г. данные систематизированы и регистр официально зарегистрирован. Данные регистра и собственного медико-генетического обследования населения Республики проанализированы.

В результате обследования населения 41 района и 10 городов Республики Дагестан в период с 2005 по 2013 гг. выявлено 454 пациентов с ННМЗ из 214 семей с АД, АР и Х-сц. типом наследования. В табл. 1 представлены численность и отягощённость (на 10 000 чел.) населения РД моногенными ННМЗ.

Как следует из данных табл. 1, наблюдается значительная вариабельность в значениях груза всех типов ННМЗ между популяциями.

Сравнительный анализ показал наличие различий в отягощённости АД, АР и Х-сц. патологией между городским и сельским населением ($\chi^2 = 7,96$; $\chi^2 = 22,28$; $\chi^2 = 10,84$, соответственно, d.f. = 1, $p < 0,05$).

Таблица 1
Численность и отягощённость (на 10 000 чел.) населения Республики Дагестан моногенными ННМЗ

№№	Популяция	Численность	Отягощённость на 10 000*			Суммарная распространённость
			АД	АР	Х-сц	
1	2	3	4	5	6	7
Равнинные районы						
1	Бабаюртовский	46 524	0	0,64 ± 0,37	0,43 ± 0,43	1:11631
2	Дербентский	100 897	1,09 ± 0,33	0,59 ± 0,24	0,40 ± 0,28	1:5310
3	Карабудахкентск	76 051	2,63 ± 0,59	0	2,89 ± 0,87	1:2453
4	Каякентский	53 925	0,19 ± 0,19	0,37 ± 0,26	0	1:17975
5	Кизлярский	68 892	0	0,29 ± 0,21	0,29 ± 0,29	1:22964
6	Кизилюртовский	65 079	0,61 ± 0,31	1,84 ± 0,53	2,15 ± 0,81	1:2830
7	Кумторкалинский	25 508	2,35 ± 0,96	0,78 ± 0,55	0	1:3189
8	Магарамкентский	62 242	0,16 ± 0,16	0,16 ± 0,16	0	1:31121
9	Ногайский	21 021	0	0,48 ± 0,48	0	1:21021
10	Тарумовский	32 004	0,62 ± 0,44	0,00	0,62 ± 0,62	1:10668
11	Хасавюртовский	145 098	0	0,07 ± 0,07	0,96 ± 0,36	1:18137
Средневзвешенное значение по равнинным районам		697 241	0,65 ± 0,10	0,43 ± 0,08	0,86 ± 0,16	1:6640
Предгорные районы						
12	Буйнакский	76 248	0	0,13 ± 0,13	0,26 ± 0,26	1:38124
13	Казбековский	44 327	0	0,68 ± 0,39	0,45 ± 0,45	1:11082
14	Кайтагский	32 003	0,62 ± 0,44	0	0,62 ± 0,62	1:10668
15	Новолакский	30 681	0	0,33 ± 0,33	0	1:30681
16	Сергокалинский	27 609	4,71 ± 1,31	0	2,17 ± 1,25	1:1726
17	С.Стальский	58 219	0,17 ± 0,17	0	0	1:58219
18	Табасаранский	51 632	5,62 ± 1,04	0,39 ± 0,27	0,39 ± 0,39	1:1614
19	Хивский	21 744	0	0	0	0
Средневзвешенное значение по предгорным районам		342 463	1,31 ± 0,20	0,20 ± 0,08	0,41 ± 0,15	1:5804

Таблица 1 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7
Горные районы						
20	Агульский	10 689	0	$1,87 \pm 1,32$	0	1:5345
21	Акушинский	53 135	$0,94 \pm 0,42$	$0,19 \pm 0,19$	0	1:8856
22	Ахвахский	22 603	0	0	$2,65 \pm 1,53$	1:7534
23	Ахтынский	32 322	$4,02 \pm 1,12$	0	$0,62 \pm 0,62$	1:2309
24	Ботлихский	55 308	$0,18 \pm 0,18$	$3,98 \pm 0,85$	$1,08 \pm 0,63$	1:2127
25	Гергебильский	20 195	0	$8,91 \pm 2,10$	$4,95 \pm 2,21$	1:878
26	Гумбетовский	22 143	0	0	$0,90 \pm 0,90$	1:22143
27	Гунибский	25 750	0	0	$0,78 \pm 0,78$	1:25750
28	Дахадаевский	36 412	$0,55 \pm 0,39$	$1,10 \pm 0,55$	$1,10 \pm 0,78$	1:1:4552
29	Докузпаринский	15 460	$4,53 \pm 1,71$	0	0	1:2209
30	Кулинский	11 287	0	0	$1,77 \pm 1,77$	1:11287
31	Курахский	15 299	0	$0,65 \pm 0,65$	$1,31 \pm 1,31$	1:7650
32	Лакский	11 965	0	0	$3,34 \pm 2,36$	1:5983
33	Левашинский	72 706	$1,10 \pm 0,39$	$0,69 \pm 0,31$	$0,28 \pm 0,28$	1:5193
34	Рутульский	22 193	$0,45 \pm 0,45$	$0,90 \pm 0,64$	$1,80 \pm 1,27$	1:4439
35	Шамильский	28 348	$2,47 \pm 0,93$	$0,35 \pm 0,35$	$1,41 \pm 1,00$	1:2835
36	Тляратинский	22 365	$0,89 \pm 0,63$	0	0	1:11183
37	Унцукульский	29 918	$0,67 \pm 0,47$	$1,34 \pm 0,67$	0	1:4986
38	Хунзахский	31 798	0	0	$3,14 \pm 1,41$	1:6360
39	Цумадинский	23 995	0	$5,00 \pm 1,44$	0	1:2000
40	Цунтинский	18 622	0	$1,07 \pm 0,76$	0	1:9311
41	Чародинский	11 754	$2,55 \pm 1,47$	$2,55 \pm 1,47$	$1,70 \pm 1,70$	1:1679
Средневзвешенное значение по горным районам		594 267	$0,86 \pm 0,12$	$1,30 \pm 0,15$	$1,04 \pm 0,19$	1:3738
Средневзвешенное значение по всем сельским районам		1 633 971	$0,86 \pm 0,07$	$0,70 \pm 0,07$	$0,83 \pm 0,10$	1:5069
Города						
42	Махачкала	703 038	$0,75 \pm 0,10$	$0,44 \pm 0,08$	$0,48 \pm 0,12$	1:6961
43	Каспийск	103 181	$1,36 \pm 0,36$	$0,39 \pm 0,19$	$0,19 \pm 0,19$	1:5431
44	Дербент	119 813	0	0	$0,17 \pm 0,17$	1:119813
45	Кизилюрт	44 255	0	0	$0,45 \pm 0,45$	1:44255
46	Хасавюрт	133 858	$0,15 \pm 0,11$	0	$0,15 \pm 0,15$	1:44619
47	Кизляр	50 759	$0,39 \pm 0,28$	0	0	1:25380
48	Буйнакск	62 959	0	$0,16 \pm 0,16$	$0,32 \pm 0,32$	1:31480
49	Избербаш	8 878	0	0	$4,51 \pm 3,19$	1:4439
50	Южно-Сухокумск	10 113	0	0	0	0
51	Дагестанские огни	28 100		0	0	1:28100
Средневзвешенное по городам		1 236 854	$0,57 \pm 0,07$	$0,29 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,08$	1:6323

Различия в отягощённости населения АД и АР патологией найдены ($\chi^2 = 11,90$; $\chi^2 = 45,55$; соответственно, d.f. = 2, $p < 0,05$) и при сравнении сельского населения по территориям (равнинные, предгорные и горные районы). По X-сц. патологии в данной группе различия не выявлены ($\chi^2 = 5,31$; d.f. = 2, $p > 0,05$). В горных районах суммарная распространённость ННМЗ составила 1:3738 чел. и была выше, чем в предгорных (1:5804) и равнинных (1:5804) районах Республики.

Суммарная распространённость ННМЗ в РД составила для АД форм — 0,79:10000; АР форм — 0,51:10000; X-сц. рецессивных форм — 0,32:10000; X-сц. доминантных форм — 0,014:10000 (рис. 1).

Структура груза основных групп болезней нервной системы характеризуется более высокими значениями отягощённости АД заболеваниями по сравнению с АР и X-сц.

В результате эпидемиологического и клинико-генетического исследования выявлены следующие нозоло-

гические формы ННМЗ в РД: ПМД Дюшенна/Бекера (ПМДД/Б), Эмери—Дрейфуса (ПМДЭД), Ландузи—Держерина (ПМДЛД), поясно-конечностные (ПКПМД), офтальмоплегическая ПМД, синдром ригидного позвоночника, спинальная мышечная атрофия I—III типа (СМА), наследственная моторно-сенсорная невропатия I и II типа (НМСН), врожденная (ВМ) и дистрофическая миотония (ДМ) (рис. 2).

ПМДДБ выявлены у 71 мужчины в 55 семьях, с возрастом дебюта от 2 до 16 лет. Распространенность составила 5,1 на 100 тыс. мужского населения. Проведены молекулярно-генетические исследования у 35 пациентов, выявлены делеции в гене дистрофина (*DMD*) 3—4, 32—34, 45 экзонов. В отягощенных семьях также выявлены носители мутантного гена данной заболевания.

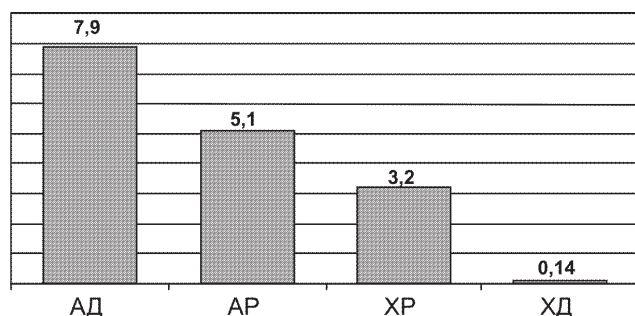


Рис. 1. Суммарная распространенность ННМЗ

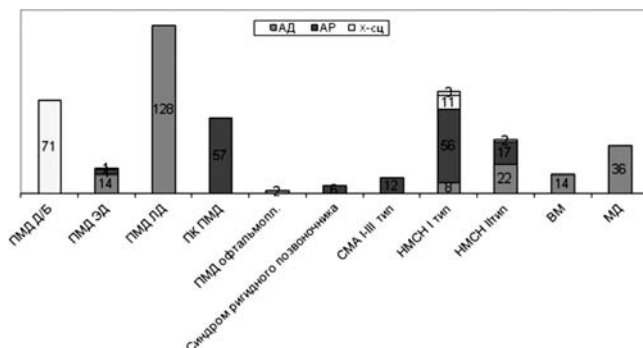


Рис. 2. Нозологические формы ННМЗ

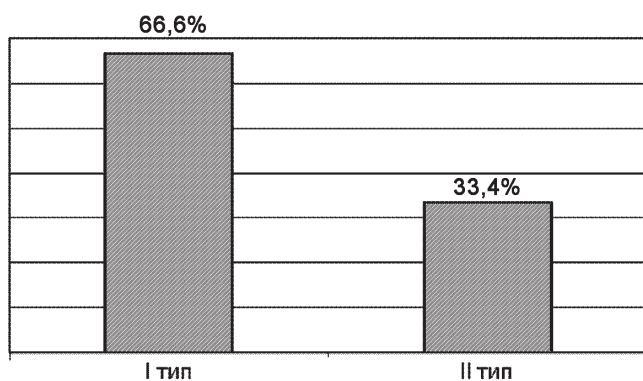


Рис. 3. Наследственные моторно-сенсорные невропатии в РД

ПМДЭД впервые была диагностирована в РД у 19 пациентов в трёх семьях с АД, АР, Х-сц. рецессивным типом наследования. Ведущими клиническими симптомами при данной форме явились ретракции ахилловых сухожилий и задне-шейных мышц. По данным литературы, наиболее часто встречается Х-сц. рецессивный тип наследования ПМДЭД. В нашем исследовании выявлен один пациент с Х-сц. рецессивной формой с возрастом дебюта 4—5 лет, с типичной клинической картиной. У 14 больных в одной семье с АД типом наследования соотношение мужчин и женщин 10:4, возраст дебюта 6—11 лет. Клиническая особенность является более мягкое течение у женщин, которые сохраняли самостоятельную двигательную активность до 60 лет. У мужчин отмечается быстро прогрессирующее течение с ранней инвалидизацией в возрасте 25—30 лет, и смертью от сердечно-сосудистой патологии в возрасте 55—60 лет. В семье с АР типом наследования выявлено 4 пациента (3 муж., 1 жен.) с возрастом дебюта от 1 до 3 лет. В клинической картине преобладали грубые контрактуры в крупных суставах резкое ограничение движений в шейном отделе позвоночника переразгибание межфаланговых суставов кистей, самостоятельное передвижение на корточках, отсутствие признаков поражения сердца у трёх пациентов [16].

ПМДЛД является наиболее частой формой ННМЗ в РД и составляет 31% всех ННМЗ. Распространенность 4,3 на 100 тыс. чел.; 9% случаев — спорадические. Клиническая картина соответствовала данным литературы. У 10,9% пациентов отмечалось раннее вовлечение в атрофический процесс мышц ног и боли в пояснице. У 10% пациентов отмечалось повышения КФК до 2000 ед./л.

ПКПМД были диагностированы у 57 пациентов в 32 семьях. ПКПМД 2А типа была выявлена у 32 больных в 20 семьях (17 мужчин, 15 женщин), с возрастом дебюта 5—24 лет. Близкородственный брак в отягощенных семьях встретился в 63% случаев. При молекулярно-генетическом анализе у 15% пациентов мутаций в экзонах 4, 5, 10, 11, 12, 20, 21, 22 гена *CAPN3*/q15.1-21 не выявлено.

ПКПМД 2В типа в РД составляет не менее 32% от всех АР форм этой группы заболевания. В 100% случаев родители пациентов состояли в близкородственном браке.

ПКПМД 2В типа выявлен у 25 пациентов в 12 семьях (17 мужчин, 8 женщин) с возрастом дебюта от 11 лет до 21 года. Характерными признаками заболевания явились дебют со слабости в проксимальных отделах ног и рук, у 28% пациентов отмечалось преимущественное поражение передних групп мышц, псевдогипертрофия икроножных мышц — у 5% пациентов, умеренное повышение КФК. В двух высокогорных популяциях РД, общей численностью 79 303 чел. выявлено 32 пациента в 14 семьях (распространенность составила 1:2479 чел.) в клинической картине, которых преобладали атрофия задней группы мышц дистальных отделов ног и мышц предплечья, ретракция ахилловых сухожилий. Данная симптоматика, по данным литературы [2, 16] соответствовала ПКПМД дистального типа Миоши. Проведено молекулярно-генетиче-

ское исследование пациентов этой группы. Во всех случаях выявлена мутация p.Val67Asp. в гене *DYSF*, картированном в локусе хромосомы 2p13.

Офтальмоплегическая форма ПМД выявлена у двух пациентов мужского пола, с предположительными мутациями *de novo*. Заболевание дебютировало в 12–13 лет с пареза глазодвигательных мышц с постепенным вовлечением мышц глотки и голосовых связок, КФК умеренно повышена. При электронейромиографии (ЭНМГ) выявлен первично-мышечный характер поражения [9].

Синдром ригидного позвоночника в РД был диагностирован впервые и относится к группе врождённых миопатий. Выявлено 6 пациентов в четырёх семьях с АР типом наследования, возраст дебюта 2–6 лет. Первые признаки заболевания характеризуются диффузной мышечной гипотонией с преимущественным поражением проксимальных групп мышц, контрактурами суставов и сколиозом. Характерной особенностью явилось ограничение разгибания в шейном и поясничном отделах позвоночника. При ЭНМГ-обследовании выявлен первично-мышечный характер поражения, отмечено умеренное повышение активности КФК.

СМА I — III типа, наследующаяся АР, является самой распространённой среди наследственных спинальных амиотрофий на территории России [4, 16]. Характеризуется ранним возрастом дебюта от 0 до 3 лет с преимущественным вовлечением проксимальных отделов конечностей, отсутствием чувствительных нарушений и нормальной скоростью проведения импульсов по периферическим нервам. В нашем исследовании выявлено всего 12 больных в семи семьях (8 мужчин, 4 женщины), с возрастом дебюта с рождения до 9 лет и характерной клинической картиной заболевания. Низкая распространённость СМА в РД (0,4 на 100 тыс. населения) по сравнению с российской популяцией (1,0–2,0:100 тыс.) связана, по-видимому, с отсутствием знаний данной патологии у практических врачей — неонатологов, педиатров и детских неврологов.

Нами выявлено 119 пациентов из 61 семьи с НМСН. Выделены НМСН I типа у 78 пациентов в 37 семьях с АД, АР, Х-сц. рецессивными, Х-сц. доминантными и НМСН II типа у 41 пациента в 24 семьях с АД, АР, Х-сц. рецессивными типами наследования. Количество пациентов с НМСН I типа преобладает над НМСН II типа в соотношении 2:1 (рис. 3).

Показатели распространённости НМСН I составили 2,7:100 тыс. населения. НМСН II типа — 1,4 на 100 тыс. населения (табл. 2).

У пациентов с НМСН I типа в клинической картине отмечались гипотрофия дистальных отделов ног, нарушение походки по типу степажа, деформация стоп, постепенное поражение межкостных мышц кистей и гипотенара, расстройства поверхностной и глубокой чувствительности. В 31% случаев наблюдались сенситивно-мозжечковая атаксия и интенционный тремор кистей. В 100% случаев диагностировано пальпаторное утолщение локтевого нерва, гипо- и арефлексия рук и ног. ЭНМГ-паттерном данной формы явилось: резкое снижение скорости проведения импульса по срединному нерву меньше 38 м/с. Молекулярно-генетический анализ проводился у 25% больных с АД типом наследования заболевания. Обнаружена наиболее часто встречаемая в российской популяции Dup17p11.2-p12 в гене *PMP22*.

В семье с Х-сц. доминантным типом наследования обнаружена мутация в гене Arg 22GLN, также характерная для НМСН I типа.

В группе пациентов с НМСН II типа отмечалось выраженное поражение мышц голени и стоп, расстройство глубокой чувствительности, незначительное снижение скорости проведения импульса по срединному нерву с выраженным снижением М-ответа [13, 17].

Врождённая миотония выявлена у 14 пациентов в восьми семьях, соотношение мужчин к женщинам 10:4. Распространённость в РД составила 0,5 на 100 тыс. населения. В отягощённых семьях возраст дебюта заболевания варьировал от 2 до 20 лет. Характерными клиническими симптомами были миотонический спазм в мышцах кисти и круговых мышцах глаз, повышенная механическая возбудимость мышц и диффузная гипертрофия мышц.

Миотоническая дистрофия выявлена у 36 пациентов в 12 семьях (22 мужчины, 14 женщин). Распространённость миотонической дистрофии в РД составила 1,2 на 100 тыс. населения. В отдельных регионах РФ эти цифры колеблются от 2,26 до 30,46 на 100 тыс. населения [10, 11, 12, 14]. В клинической картине преобладали миотонические спазмы и миотонические механические реакции.

Таблица 2

Распределение пациентов с НМСН I и II типа в РД

Тип наследования	НМСН I типа				НМСН II типа		
	АД	АР	ХД	ХР	АД	АР	ХР
Количество больных	8	56	3	11	22	17	2
Количество семей	4	30	1	2	7	12	1
Мужчин	3	37	2	11	9	11	2
Женщин	5	19	1	—	13	6	—
Возраст дебюта (лет)	3 — 4	2 — 24	3 — 6	10 — 12	9 — 16	12 — 20	1 — 10

Заключение

Впервые в РД проведены эпидемиологическое и клинико-генетическое исследование ННМЗ с использованием регистра. В результате были выделены 10 нозологических форм ННМЗ с АД, АР, Х-сц. рецессивным, Х-сц. доминантным типом наследования. Груз ННМЗ определен для населения 41 района и 10 городов РД. Полученные данные позволят осуществить активную диспансеризацию отягощённых семей и планировать объем медико-генетического консультирования в РД. В ходе нашего эпидемиологического исследования в дагестанской популяции выявлены высокогорные изоляты, где накоплен генетический груз ПКПМД, тип Миоши, выявлена мутация в гене *DYSF*, с заменой p.Val67Asp. Проведённые молекулярно-генетические исследования в группе пациентов с ПКПМД позволят разработать скрининговые исследования жителей горных изолятов, выявляя наследственную патологию на ранних доклинических стадиях и носительство, проводить пренатальную диагностику.

Список литературы

1. Барышникова Н.В. Клинико-генетический анализ наследственных болезней нервной системы во Владимирской области: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — 2002. — 25 с.
2. Ветрова Н.В., Амелина С.С., Дадали Е.Л., Зинченко Р.А. Наследственные болезни нервной системы у населения Ростовской области // Медицинская генетика. — 2012. — Т. 11, №2. — С. 23–26.
3. Гинтер Е.К., Иллариошкин С.Н. Достижения генетики и геномики в неврологии // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2012. — №8. — С. 14–20.
4. Гехт Б.М., Ильина Н.А. Нервно-мышечные болезни. — М.: Медицина, 1982. — 352 с.
5. Кириллов А.Г., Аbruкова А.В., Зинченко Р.А. и др. Наследственные болезни среди чувашей Республики Чувашия // Медицинская генетика. — 2007. — Т. 6, №1(55). — С. 19–27.
6. Козулина Е.А. Клинико-эпидемиологическая характеристика наследственных нейромышечных заболеваний в Красно-

ярске (по данным госпитального регистра): Дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — 2006. — 108 с.

7. Крикунова Н.И. Эпидемиология врожденных пороков развития в г.Томске и формирование перспективного генетического регистра: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — 1998. — 19 с.

8. Максимова Н.Р. Клинико-генеалогическая и молекулярно-генетическая характеристика этноспецифических форм наследственной патологии у якутов: Дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — 2009. — 374 с.

9. Максимова Н.Р., Николаева И.А., Коротов М.Н., Икеучи Т., Онодера О., Нишизава М., Степанова С.К., Куртанов Х.А., Сухомясова А.Л., Ноговицына А.Н., Гуринова Е.Е., Степанов В.А., Пузырев В.П. Клинико-генеалогическая и молекулярно-генетическая характеристика окулофарингеальной миодистрофии в Республике Саха (Якутия) // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2008. — №6. — С. 52–60.

10. Матулевич С.А. Принципы организации и оценка эффективности медико-генетической службы в России: Дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — 2005. — 225 с.

11. Мурзабаева С. Ш. Оптимизация медико-генетической службы в Башкортостане: Дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — 2010. — 295 с.

12. Мухаметова Р.Р., Сайфулина Э.В. Распространенность миотонической дистрофии в Республике Башкортостан // Сборник статей по материалам XII Российского конгресса молодых ученых с международным участием «Науки о человеке». — 2011. — С. 104.

13. Романова Т.В. Клинико-генеалогическая и патофизиологическая характеристика наследственных моторных сенсорных нейропатий: Дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — 1997. — 186 с.

14. Сухомясова А.Л. Аутосомно-доминантная миотоническая дистрофия в Республике Саха (Якутия): Дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — 2005. — 169 с.

15. Угаров И.В. Оптимизация диагностики наследственных нервно-мышечных заболеваний на основе создания информационно-поисковой диагностической системы: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — 2003. — 25 с.

16. <http://neuromuscular.iugarov.com>

17. <http://doctorspb.ru>

18. <http://www.meddr.ru/nervno-myshechnyye-bolezni>

Genetic epidemiology study of hereditary neuromuscular diseases in Dagestan Republic

Akhmedova P.G.¹, Zinchenko R.A.², Ugarov I.V.³, Umakhanova Z.R.¹, Magomedova R.M.¹

¹ — State Educational Institution of higher professional education «Dagestan State Medical Academy» of the Ministry of Health of the Russian Federation, the Republic of Dagestan, 367000, Makhachkala, st. Lenin House 1, fax (8722) 68-12-80; e-mail: apgg@mail.ru, zoya-umakhanova@yandex.ru, raisatdgm@mail.ru

² — Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics» of the Russian Academy of Medical Sciences, 115478, Moscow, st. Moskvoreche, 1, fax (499) 324-07-02; e-mail: renazinchenko@mail.ru

³ — State educational institution of higher professional education «First Moscow State Medical University Sechenov» Ministry of Health of the Russian Federation, 119991, Moscow, st. Trubetskaya, 8, page 2, fax: (499) 248-05-53; e-mail: iugarov@yandex.ru

Held in Dagestan since 2005 Register hereditary neuromuscular disease allows you to store and analyze information on patients with neuromuscular diseases and allow use in epidemiological studies, to predict the severity and pattern of the flow of separate clinical entities depending on the genetic defect. Genetically epidemiological study of hereditary neuromuscular disease in 41 districts and 10 towns of the Republic of Dagestan (RD) was performed. The study was conducted in accordance with the protocol developed in the laboratory of genetic epidemiology Research Centre for Medical Genetics and based on the data register. The load of hereditary neuromuscular disorders (AD, AR and X-linked) for urban and rural populations was calculated, the diversity of hereditary diseases of the nervous system was reviewed. Identified 10 forms of inherited neuromuscular disease: progressive muscular dystrophy (PMD) Duchenne/Becker, PMD Landuzi — Dejerine, PMD Emery — Dreifuss, PMD lap-limb, PMD Ophthalmoplegic form, spinal muscular atrophy, hereditary motor sensory neuropathy, myotonic dystrophy, congenital myotonia Thomson, a rigid spine syndrome.

Key words: neuromuscular diseases, register, epidemiology

Эффективность различных методов диагностики хромосомных аномалий при репродуктивных потерях

Миньженкова М.Е., Шилова Н.В., Маркова Ж.Г., Козлова Ю.О., Золотухина Т.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр»
Российской академии медицинских наук,
Москва, ул. Москворечье, 1, факс: (499)612-80-40. E-mail: maramin@mail.ru

Представлены результаты исследования 60 образцов абортивного материала плодов для определения спектра хромосомных аномалий при неразвивающейся беременности. В работе было использовано несколько методов диагностики: стандартное цитогенетическое исследование клеток неразвивающегося плода, FISH на интерфазных ядрах и метафазная сравнительная геномная гибридизация. Сравнительная оценка результатов позволила разработать алгоритм молекулярно-цитогенетического исследования материала плода при спонтанных абортах.

Ключевые слова: хромосомные аномалии, спонтанный аборт, стандартное цитогенетическое исследование, метафазная CGH, FISH на интерфазных ядрах.

Введение

Понятие *репродуктивные потери* означает потерю продуктов зачатия на всех этапах развития плода в результате самопроизвольного или вынужденного (по медицинским и социальным показаниям) прерывания беременности, мертворождения, а также смерти детей первого года жизни. Основная доля в репродуктивных потерях приходится на спонтанные аборт, которые являются достаточно гетерогенной группой в отношении этиологии и морфологических аномалий. Всех пренатально погибших эмбрионов/плодов можно разделить на 3 группы: собственно спонтанные аборты, неразвивающиеся беременности и анэмбрионии [4]. Многолетними исследованиями установлено, что 10–15% регистрируемых беременностей останавливаются в развитии на раннем этапе эмбриогенеза [25]. Этиология спонтанных абортов многообразна. Они могут быть вызваны генетическими (генные, геномные и хромосомные мутации, иммунологическая несовместимость) и средовыми (заболевания матери, химические и физические воздействия) факторами [3]. Причиной ранней остановки развития и внутриутробной гибели эмбриона в первом триместре беременности в 50–60% случаев являются несбалансированные хромосомные аномалии (ХА) [1, 8]. Диагностика причин невынашивания беременности является немаловажной частью обследования семейных пар с неразвивающимися беременностями, особенно если такие случаи происходят повторно [7, 9].

Стандартное цитогенетическое исследование абортивного материала в большинстве лабораторий является единственным методом диагностики хромосомного статуса плода. Однако этот метод имеет ряд ограничений, связанных с особенностями тканей, используемых для анализа. Исследование хромосом зачастую проводят на прямых или полупрямых препаратах из

клеток ворсин хориона [11]. Иногда анализ невозможно провести из-за отсутствия митотической активности клеток хориона вследствие сниженной пролиферации тканей плода. Но даже при наличии метафазных пластинок в препаратах из клеток ворсин хориона трудно добиться хорошей морфологии хромосом, поэтому анализ часто проводится при рутинной окраске, что не позволяет точно идентифицировать хромосомную патологию. Кроме того, возможна артефактная гипо/гиперплоидия, вследствие специфики метода, используемого при приготовлении хромосомных препаратов. Поэтому стандартное кариотипирование почти в половине случаев неразвивающихся беременностей является неинформативным [5, 12].

Другим методом, которым часто пользуются при исследовании кариотипа плодов при спонтанных абортах, является флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) с ДНК-зондами на определённые районы хромосом, когда анализ гибридизационных сигналов можно проводить на интерфазных ядрах. Однако эта техника является таргетной и позволяет оценить только количество копий определённых хромосом или их районов, не давая информацию о состоянии генома, в целом [17, 20].

Метод метафазной сравнительной геномной гибридизации (comparative genomic hybridization — CGH), который также носит название «молекулярное кариотипирование», позволяет выявлять хромосомные районы, в которых присутствует численный геномный дисбаланс в виде дупликации или делеции при сравнении результатов гибридизации двух образцов ДНК: полученной от пациента (опытная ДНК) и от нормального индивидуума (референсная ДНК) [5, 18]. Основным преимуществом этого метода является возможность провести анализ всего генома в одном эксперименте.

Помимо этого, для проведения анализа не требуется наличия живых, делящихся клеток, нет необходимости в приготовлении хромосомных препаратов, поэтому исследование можно провести на любом материале, из которого можно выделить ДНК [5, 6, 9, 12]. Это особенно актуально в случаях внутриутробной гибели плода, когда низка вероятность получить хромосомные препараты из ворсин хориона.

Целью данной работы было сравнение методов диагностики хромосомного дисбаланса у плодов при невынашивании беременности и определение оптимального алгоритма проведения исследования для наиболее эффективной диагностики ХА, являющихся одним из этиологических факторов репродуктивных потерь.

Материалы и методы

Было исследовано 60 образцов хориона при неразвивающихся беременностях. От каждого образца 5–10 мг ворсин хориона использовали для приготовления хромосомных препаратов прямым или полупрямым спосо-

бом по стандартному протоколу, из оставшихся ворсин выделяли ДНК для проведения CGH.

В качестве референсной ДНК использовали образцы, полученные из периферической крови от мужчин с нормальным кариотипом. Геномная ДНК во всех образцах была получена путем химической экстракции фенол-хлороформом.

ДНК плода (опытная) и референсная ДНК (контрольная) были мечены в реакции ник-трансляции с Spectrum Greend UTP и Spectrum Redd UTP соответственно с использованием Nick Translation Reagent Kit (Abbott Molecular). В качестве платформы для совместной гибридизации опытной и референсной ДНК использовали препараты с метафазными пластинками, приготовленные в соответствии со стандартным протоколом из культуры лимфоцитов периферической крови мужчин с нормальным кариотипом. Реакцию CGH и постгибридизационную отмывку проводили по протоколу фирмы производителя (Abbott Molecular). Для контрокрашивания хромосом использовали DAPI I (Abbott Molecular) в растворе Vectashield (Vector Labs) в соотношении 1:20.

Таблица

Результаты стандартного цитогенетического исследования и молекулярно-цитогенетических исследований: интерфазной FISH и метафазной CGH

№	Кариотип	FISH	CGH
1–9	46,XX	XX	N
10–21	46,XY	XY	N
22	48,XY,+2,+ D	XY,+13	+2,+13
23	46,XX,der(D;D),+ D	XX,+13	+13
24	47,XX,+ D	XX	+15
25–26	47,XY,+16	XY	+16
27	47,XX,+18	XX,+18	+18
28	45,X	Моносомия X	Моносомия X
29	46,XX	Моносомия X,+18	Моносомия X,+18
30–35	—	XX	N
36–43	—	XY	N
44	—	XX	+2
45	—	XY	+7,+8
46–47	—	XY	+15
48	—	XX	+15
49	—	XX,+21	+15,+21
50	—	XY	+16
51	—	XY	+18
52	—	XY,+21	+21
53–54	—	XX,+21	+21
55	—	XX	+22
56	—	Моносомия X	Моносомия X
57–59	—	Триплоидия, XXY	N
60	—	Триплоидия, XXX	N

Примечание. N — геномный дисбаланс не обнаружен; — — цитогенетическое исследование не удалось провести из-за отсутствия митоза

Для каждого образца ДНК было проанализировано 15–20 метафазных пластинок. Для анализа изображений метафазных хромосом использовали программу обработки изображения «LUCIACGH», установленную в комплексе с эпифлуоресцентным микроскопом «eclipse 90i» (Nikon) и CCD камерой «ProgResMF» (JENOPTIK).

FISH с набором ДНК-зондов «Aneu Vysion» (LSI 13, LSI 21, CEP 18, CEP X, CEP Y), и ДНК-зондами CEP 2 (D2Z2), CEP15/LSID15S11, LSITUPLE 1 (HIRA)/LSIARSA, LSIELN/LSID7S486, D7S522 (Abbott Molecular), CEP 16 (D16Z2), SubTelomere 8pter (Kreatech) проводили по протоколам фирм — производителей. Денатурация и гибридизация проводились с использованием гибридизационной системы «Thermo Brite» (Stat Spin). Для контрокрашивания хромосом использовали флуоресцентный краситель DAPI. Анализ проводили на эпифлуоресцентном микроскопе «AxioImager M.1» (Carl Zeiss) с соответствующим набором светофильтров и с использованием компьютерной программы обработки цифровых изображений «Isis» (MetaSystems).

Результаты и обсуждение

Все образцы абортивного материала были исследованы тремя диагностическими методами: стандартное кариотипирование, FISH на интерфазных ядрах и метафазная CGH (таблица). Хромосомная патология была выявлена в 25 из 60 случаев (41,6%). Стандартное цитогенетическое исследование кариотипа плода не удалось провести в 31 случае (51,6%) вследствие низкой пролиферативной активности клеток и отсутствия митозов в препаратах. FISH- и CGH-исследования были результативны во всех случаях. При стандартном цитогенетическом исследовании 29 образцов материала плода нормальный кариотип был определен в 22 случаях. В 21 случае это совпало с результатами анализа методами FISH и CGH, а в одном случае выявить ХА удалось только молекулярно-цитогенетическими методами.

Комбинированное использование различных методов позволило определить, что практически все ХА были представлены геномными мутациями, в основном анеуплоидиями, которые были диагностированы в 20 из 25 случаев, что составило 80% (таблица).

Среди всех анеуплоидий трисомии были выявлены в 15 случаях (60%), двойные трисомии — в трёх случаях (12%), моносомия X — в двух случаях (8%). Моносомии по аутосомам не были обнаружены. В одном случае у плода была диагностирована крайне редкая, не описанная ранее, хромосомная аномалия, представленная одновременно моносомией по хромосоме X и трисомией по хромосоме 18 (случай 29). Причём при стандартном цитогенетическом исследовании кариотип был определён как нормальный женский, и только исполь-

зование молекулярно-цитогенетических методов позволило выявить комплексную ХА у плода.

Известно, что наиболее частой хромосомной патологией у плода является анеуплоидия [15]. Не менее 5% всех клинически распознаваемых беременностей сопровождается трисомией или моносомией [16]. Большинство анеуплоидий является причиной нарушения внутриутробного развития и часто приводит к гибели плода на ранних этапах эмбриогенеза. Трисомии выявляются при кариотипировании неразвивающихся плодов в среднем в 65% случаев [12]. Таким образом, полученные нами данные о частоте встречаемости этой ХА в материале спонтанных абортусов вполне согласуются с данными других исследователей.

Среди всех диагностированных ХА в 16% случаев была выявлена трисомия по хромосоме 15 (случаи 24, 45, 46, 47). Частота трисомий по хромосомам 16 (случаи 25, 26, 49) и 21 (случаи 51, 52, 53) составила по 12% каждая. Кроме того, были диагностированы 2 случая с трисомией по хромосоме 18 и единичные случаи трисомии по хромосомам 2 и 22.

Спектр трисомий, наблюдаемых в материале спонтанных абортусов, отличается от такового при развивающихся беременностях и живорождении. Это обусловлено тем, большинство числовых ХА приводит к летальным эффектам, и лишь немногие варианты числовых и структурных аномалий совместимы с постнатальным развитием организма и ведут к хромосомным болезням [2]. Наиболее распространённой анеуплоидией, встречающейся при спонтанных абортах является трисомия по хромосоме 16. Частота этой хромосомной аномалии составляет 30% от диагностируемых трисомий. Так, трисомия по хромосоме 15 встречается с частотой 7,5%, трисомия по хромосоме 21 — в 10,5% случаев с диагностируемыми трисомиями [10]. Трисомия по хромосомам 2, 18 встречается с одинаковой частотой (4%) и трисомия по хромосоме 22 — 11,4% [15].

В нашем исследовании материала плода при неразвивающихся беременностях была выявлена неожиданно низкая, по сравнению с ранее опубликованной, частота трисомии по хромосомам 16 и 22. Довольно высокой (17%) по сравнению с описанной ранее (7,5%) оказалась частота трисомии по хромосоме 15. Поскольку большинство исследований по определению спектра ХА при неразвивающихся беременностях проводилось достаточно давно, мы можем предположить, что наиболее вероятной причиной такого различия может быть ошибочная цитогенетическая диагностика при использовании для анализа рутинных цитогенетических методов. При таком анализе оцениваются только морфологические особенности хромосом, позволяющие классифицировать их только по группам.

Неожиданно высокой оказалась и частота двойных трисомий, которые были выявлены в 3 из 25 случаев с ХА (12%). Все они были идентифицированы только при использовании CGH. По данным литературы, час-

тота двойных трисомий, диагностированных при замерших беременностях, варьирует от 0,21 до 2,8% [14, 19, 23]. Можно предположить, что частота двойных трисомий, регистрируемых в клетках спонтанных абортусов, при использовании стандартного метода цитогенетического анализа является явно заниженной.

Частота триплоидий, которые были выявлены в четырёх из 25 случаев, составила 16% от всех диагностированных ХА. В одном случае триплоидия была материнского происхождения (XXX) — дигенической, в трёх других случаях (XXY) можно предположить диандрическую форму триплоидии. Полиплоидии являются причиной внутриутробной гибели эмбрионов и плодов в 20–25% случаев, большая доля которых приходится на триплоидии (17–18%) [21, 22], примерно 70% триплоидий имеют отцовское происхождение и являются диандрическими [24].

В одном случае причиной неразвивающейся беременности явилась несбалансированная структурная хромосомная перестройка — трисомия по хромосоме 13 вследствие робертсоновской транслокации. Причем эта хромосомная аномалия была выявлена при стандартном цитогенетическом исследовании, однако идентифицировать эту перестройку позволили только молекулярно-цитогенетические методы исследования (случай 23, таблица).

Таким образом, комбинация различных диагностических методов (стандартное кариотипирование, FISH на интерфазных ядрах и метафазная CGH) позволила

выявить все случаи ХА в материале спонтанных абортусов. Наиболее эффективным оказался метод CGH, который дал возможность определить ХА в 21 случае (84%). Однако этот метод не позволяет диагностировать полиплоидии [5, 21]. С использованием анализа FISH на интерфазных ядрах было диагностировано 15 случаев с ХА (60%). Этот метод является таргетным, ограниченным используемыми ДНК-зондами. Учитывая довольно широкий и разнообразный спектр ХА, выявляемых при неразвивающихся беременностях, самостоятельное использование этого метода в диагностике материала неразвивающихся беременностей нецелесообразно. Стандартное цитогенетическое исследование позволило определить всего лишь 7 случаев с ХА (28%). Исходя из результатов, мы предлагаем исключить классическое цитогенетическое исследование, как метод с наименьшей эффективностью в диагностике ХА при исследовании кариотипа плодов при неразвивающейся беременности.

Для повышения эффективности диагностики хромосомных аномалий в материале неразвивающихся беременностей был разработан алгоритм исследования абортусного материала с использованием обоих методов CGH и FISH (рисунок). Данный алгоритм позволяет комбинировать молекулярно-цитогенетические методы исследования с целью получения максимальной информации о хромосомном статусе плода. Так, в случае отсутствия геномного дисбаланса при CGH исследовании



Алгоритм молекулярно-цитогенетического исследования материала плода при спонтанном аборте

рекомендуется проводить интерфазный FISH-анализ с ДНК-зондами на любую аутосому и половые хромосомы, что позволяет дифференцировать анеуплоидию от полиплоидии. Мы использовали «коктейль» ДНК-зондов 18, X и Y, включенных в набор «AneuVysion».

Такой подход дает возможность выявить все ХА, являющиеся этиологическим фактором неразвивающейся беременности. Если после комплексного исследования абортного материала геномный дисбаланс не обнаружен, можно исключить хромосомную патологию как этиологическими факторами неразвивающейся беременности. В случае выявления геномного дисбаланса с вовлечением акроцентрических хромосом, а также частичной моно/трисомии, рекомендовано цитогенетическое обследование родителей для выявления носительства реципрокных или робертсоновских транслокаций.

В настоящее время в диагностике геномного дисбаланса все более широко используется метод микроматричной сравнительной геномной гибридизации (array CGH — aCGH) [6, 13]. Микроматричная сравнительная геномная гибридизация (aCGH), как и метафазная CGH, позволяет проводить полногеномную идентификацию ХА без необходимости культивирования материала и приготовления из него цитогенетических препаратов. В качестве платформы для гибридизации используется не хромосомный препарат, а микроматрица, на которой расположены меченые ДНК-фрагменты. Метод aCGH является эффективным в диагностике микрохромосомных аномалий у пациентов с аутизмом, аномалиями фенотипа, умственной отсталостью, поскольку разрешающая способность этого метода очень высокая и позволяет выявлять геномный дисбаланс размером в несколько десятков пар нуклеотидов [6, 13]. Однако роль таких микроперестроек в этиологии остановки внутриутробного развития остается неясной, поэтому применение столь чувствительного метода в этой области остается под сомнением.

Список литературы

1. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: Научно-практические аспекты. — СПб.: Изд-во Н-Л., 2007. — 640 с.
2. Гинтер Е.К. Медицинская генетика: Учебник. — М.: Медицина, 2003. — 448 с.
3. Лазюк Г.И. Тератология человека: Руководство. — М.: Медицина, 1991. — 480 с.
4. Лебедев И.Н. Молекулярно-цитогенетическая характеристика хромосомных аномалий при анэмбрионии и неразвивающейся беременности: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.б.н. — Томск., 2001. — 25 с.
5. Островерхова Н.В., Назаренко С.А., Лебедев И.Н. и др. Детекция анеуплоидии у спонтанных абортусов методом сравнительной геномной гибридизации // Генетика. — 2002. — Т. 38, №12. — С. 1435—1442.
6. Benkhalifa M., Kasakyan S., Clement P. et al. Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro // Prenat. Diagn. — 2005. — Vol. 25. — P. 894—900.
7. Braekeleer M., Deand Dao T.-N. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses // Hum. Reprod. — 1990. — Vol. 5. — P. 519—528.
8. Byrne J.L., Ward K. Genetic factors in recurrent abortion // Clin. Obstet. Gynecol. — 1994. — Vol. 37. — P. 693—704.
9. Daniely A., Aviram-Goldring A., Barkai G., Goldman B. Detection of chromosomal aberrations in fetuses arising from recurrent spontaneous abortions by comparative genomic hybridization // Hum. Reprod. — 1998. — Vol. 13, №4. — P. 805—809.
10. Davison E.V. and Burn J. Genetic causes of early pregnancy loss // Early Pregnancy Failure. — New York: Churchill Livingstone, 1990. — 578.
11. Eiben B., Bartels I., Bahr-Porsch S. et al. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage // Am. J. Hum. Genet. — 1990. — Vol. 47. — P. 656—663.
12. Fritz B., Hallermann C., Olert J. et al. Cytogenetic analysis of culture failures by comparative genomic hybridization (CGH)-re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions // Eur. J. Hum. Genet. — 2001. — Vol. 9. — P. 539—547.
13. Gao J., Liu C., Yao F. et al. Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion // Mol. Cytogen. — 2012. — Vol. 5. — P. 33—39.
14. Gardo S., Bajnoczky K. Cytogenetic analysis of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. — 1992. — Vol. 47. — P. 117—120.
15. Gersen S.L., Keagle M.B. The Principles of Clinical Cytogenetics. — New York: Springer, 2013. — 569.
16. Hassold T., Hunt P.A., and Sherman S. Trisomy in humans: incidence, origin and etiology // Curr. Opin. Genet. Dev. — 1993. — Vol. 3. — P. 398—403.
17. Jobanputra V., Sobrino A., Kinney A. et al. Multiplexin-terphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions // Hum. Reprod. — 2002. — Vol. 17. — P. 1166—1170.
18. Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Sudar D. et al. Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors // Science. — 1992. — Vol. 258. — P. 818—821.
19. Kalousek D.K., Pantzar T., Tsai M., Paradise B. Early spontaneous abortion: Morphologic and karyotypic findings in 3912 cases // Birth Defects. — 1993. — Vol. 29. — P. 53—61.
20. Lebedev I.N., Ostroverkhova N.V., Nikitina T.V. et al. Molecular cytogenetic characteristics of chromosome imbalance in cells of spontaneous human abortion fetuses with low proliferative activity in vitro // Genetika. — 2003. — Vol. 39. — P. 1111—1122.
21. Lomax B., Tang S., Separovic E. et al. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions // Am. J. Hum. Genet. — 2000. — Vol. 66, №5. — P. 1516—1521.
22. Neuber M., Rehder H., Zuther C. et al. Polyploidies in abortion material decrease with maternal age // Hum. Genet. — 1993. — Vol. 91. — P. 563—566.
23. Reddy K.S. Double trisomy in spontaneous abortions // Hum. Genet. — 1997. — Vol. 101. — P. 339—345.
24. Schaaf C.P., Zschocke J., Potocki L. Human genetics: from molecules to medicine. — Ph.: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. — 397 p.
25. Zinaman M.J., Clegg E.D., Brown C.C., O'Connor J., Selvan S.G. Estimates of human fertility and pregnancy loss // Fertil Steril. — 1996. — 65. — P. 503—509.

Efficiency of different methods of diagnosis chromosomal abnormalities in reproductive losses

Minzhenkova M.E., Shilova N.V., Markova Zh.G., Kozlova Y.O., Zolotukhina T.V.

Federal State budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics» of the Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation, Moscow, 115478, Moskvorechie str. 1. E-mail: maramin@mail.ru

Approximately 10–15% of all clinically recognized pregnancies terminate with spontaneous abortions. Half of first-trimester miscarriages are associated with chromosome abnormalities. Cytogenetic analysis of chorionic villi has limitations such as low mitotic activities and poor chromosome morphology. FISH method with target probes doesn't allow to receive full information about fetal genome. CGH is the only DNA-based screening method that can detect chromosomal imbalances in a single experiment. In this study 60 abortion specimens were analyzed by G-banding, FISH and conventional CGH. Overall, chromosome abnormalities were detected in 25 specimens (41.6%). Karyotyping was unsuccessful in 31 samples, while CGH and FISH analyses were successful in all cases. G-banding analysis showed normal karyotype in 21 cases and detected abnormalities in 7 cases (28% of all abnormalities). FISH analysis using two probe sets targeting chromosomes 13, 18, 21, X and Y detected chromosome abnormalities in 15 samples (60% of all abnormalities), but in two of these cases wasn't able to find double trisomies because of probe limitations which were revealed by CGH. CGH detected chromosome abnormalities in 21 samples (84% of all abnormalities) but missed triploidy in 4 cases. Aneuploidies detected only by CGH were all confirmed by FISH with corresponding probes subsequently. CGH showed the highest detection rate in comparison with karyotyping and FISH analysis. CGH is a suitable technique for the detection of chromosome abnormalities in spontaneous abortion with the exception of polyploidy that can be detected by FISH.

Key words: chromosomal abnormalities, spontaneous abortion, cytogenetic analysis, conventional CGH, FISH

Комплексная оценка эффективности медико-генетического консультирования. Сообщение III. Эффективность обучения консультирующихся*

Баранова Е.Е.¹, **Сергеев А.С.²**, Иванова Л.Ю.³,
Журавлева И.В.³, Ижевская В.Л.², Гинтер Е.К.^{1,2}

¹ — ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России, 123995, Москва, ул. Баррикадная, д.2/1, e-mail: baranova.gen@gmail.com

² — ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1

³ — ФГБУН «Институт социологии» РАН, 117218, Москва, ул. Кржижановского, д.24/35, к.5

Приведён анализ эффективности медико-генетического консультирования (МГК) в отношении запоминания значений и степени генетического риска консультирующимися, а также освоения ими медико-генетических знаний, необходимых для понимания природы заболевания в семье. МГК оказывает в целом положительное влияние на информированность консультирующихся, однако статистически достоверного повышения после консультации доли пациентов, правильно ответивших на вопросы о возможных причинах заболевания и его наследовании, не выявлено. Показано достоверное увеличение после МГК доли пациентов, правильно указывающих значения и степень генетического риска. Однако около 80% консультирующихся, относящих после МГК свой генетический риск к «среднему», по заключению врача-генетика, имели низкий риск. Наибольшая доля пациентов, давших правильные ответы на вопросы о генетическом риске, была в группе консультирующихся, не имеющих больных детей и обратившихся с целью определения риска рождения больного и вероятности рождения здорового ребёнка.

Ключевые слова: медико-генетическое консультирование, оценка эффективности, информированность, генетический риск, анкеты

Введение

Цель нашего исследования — разработка комплексной системы оценки эффективности МГК семей, имеющих больных с наследственной патологией.

Существует несколько подходов к оценке эффективности МГК. Один из них — оценка эффективности обучения пациентов основам медицинской генетики, которое является одним из компонентов МГК. Ещё в 1983 г. С.И. Козлова в своей работе отметила, что при недирективном подходе к МГК адекватным критерием его эффективности может являться изменение после консультации понимания пациентами медико-генетической информации [5].

Другая важная задача консультирующего генетика — объяснение пациентам степени генетического риска для их семей (первичного или повторного) [17]. Недостаточная информированность пациентов до консультации относительно риска повторного рождения больного ребёнка признаётся многими исследователями [6, 14]. Рядом исследователей подчеркивается, что эффективным МГК может быть только при правильном понимании степени риска рождения больного ребёнка. Это может обеспечить осознанное планирование репродуктивного поведения, при необходимости — прохождение ге-

нетического тестирования, а также пренатальной диагностики заболевания у плода [14].

В отечественной литературе мало представлены работы по оценке эффективности информационной компоненты МГК (предоставление медико-генетической информации, информации о генетическом риске) и влиянии на неё некоторых характеристик пациентов, обращающихся в медико-генетическую консультацию по поводу наследственного заболевания или подозрения на него [3, 4].

Признавая важность информирования пациентов для адекватности принятия ими решения в отношении дальнейшего репродуктивного поведения, мы полагали, что оценка эффективности обучения консультирующихся должна быть обязательной в комплексной оценке эффективности МГК.

Материалы и методы

В исследование были включены 226 пациентов, обратившихся в консультативно-поликлиническое ФГБУ «МГНЦ» РАМН в 2007—2011 гг. по поводу наследственного заболевания или подозрения на наследственное заболевание у консультирующегося, его детей или других

* Мы благодарим всех сотрудников клинической группы поликлинического отделения научно-консультативного отдела ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН за оказание содействия при выполнении данной исследовательской работы.

родственников (в том числе партнера или родственников партнера). Исследование проводилось методом анкетирования. Анкета №1 заполнялась консультирующимися до проведения первой консультации, анкета №2 — после получения ими заключения врача-генетика. Описание критериев включения пациентов в исследование и характеристик выборки консультирующихся приведены в нашем первом сообщении, посвященном анализу анкеты №1 [1].

Данная статья посвящена анализу анкет №1 и №2. Вопросы в анкете №2 были сформулированы таким образом чтобы, чтобы можно было проанализировать изменение ряда показателей, поэтому часть вопросов в анкетах №1 и №2 повторялась.

Так, в анкете №2 были вопросы, позволяющие оценить реализацию целей обращения в медико-генетическую консультацию, изменение информированности консультирующихся в области генетики, наследственных болезней, риска повторения заболевания в семье.

Полученные в результате опросов данные сравнивались с оценками генетического риска (значения и категория риска), сделанными врачом в процессе МГК и извлеченными из медицинских карт консультирующихся.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием русифицированного пакета программ STATISTICA 6.0. Результаты опросов консультирующихся №1 и №2 при сравнении рассматривались как зависимые выборки и анализировались с применением критерия Вилкоксона. Для выявления различий между группами пациентов только в пределах анкеты №1 или анкеты №2 применяли критерий критерия Манна—Уитни. В ряде случаев при анализе различий между двумя выборками пользовались непараметрическим критерием χ^2 (Chi-square test).

Результаты и обсуждение

Изменение информированности пациентов о некоторых вопросах медицинской генетики после МГК

Для эффективного МГК необходимо, чтобы пациенты понимали информацию о генетических причинах возникновения заболевания и возможности его передачи в чреде поколений. Только обладая необходимым набором знаний, пациент и его семья могут принять правильное решение. То, насколько полно поймет информацию консультирующийся, зависит как от него самого, так и от коммуникативных способностей врача-генетика [10]. Оценка понимания пациентами информации, получаемой на консультации, различается по данным разных исследователей, что связано с её недостаточной стандартизацией, зависимостью от личных свойств генетика-консультанта, его педагогических способностей, а также психологических качеств врача и консультирующегося [8].

Попытки оценивать эффективность МГК по пониманию медико-генетической информации предпринимались рядом авторов [7, 15]. В этих исследованиях проводилась оценка исходных знаний консультирующихся, а затем изучалось изменение доли пациентов, давших правильные ответы на проверочные вопросы после МГК.

В нашем исследовании для оценки влияния МГК на уровень информированности консультирующихся, в анкете №1 им был предложен ряд проверочных вопросов, по ответам на них была оценена доля верно или неверно ответивших пациентов [2]. Такие же вопросы были предложены пациентам после проведения сессии консультирования и получения заключения врача-генетика (анкета №2). Результаты анализа ответов на вопросы двух анкет в группах пациентов, имевших и не имевших больных детей, представлены в табл. 1 и 2.

Как следует из табл. 1 и 2, МГК в целом оказывает положительное влияние на информированность консультирующихся: в обеих группах увеличилась доля пациентов, правильно ответивших на вопросы. Однако статистически достоверное увеличение доли респондентов, давших правильный ответ, выявлено только в группе пациентов, имеющих больных детей (табл. 1) при ответе на вопросы о том, знают ли они что такое наследственность и гены (критерий Вилкоксона; $p < 0,05$). Это свидетельствует о необходимости в процесс МГК уделять больше внимания обсуждению с пациентами генетических причин заболевания (Может ли изменение генов вызвать заболевание) и его наследования (Может ли ребёнок с наследственным заболеванием родиться у здоровых супругов, Всегда ли наследственное заболевание встречается у нескольких членов семьи).

Оценка влияния МГК на информированность пациентов о значениях и степени генетического риска

Обучение консультирующихся — сложный процесс, условно состоящий из нескольких этапов. Консультирующийся не сможет понять значения генетического риска, если не поймет причины возникновения наследственных заболеваний и закономерности их наследования. При этом следует разделять понимание медико-генетической информации и простое запоминание. Например, пациент может запомнить значения генетического риска, но неверно интерпретировать их.

Ранее проводились исследования влияния на понимание пациентами генетической информации формы её представления (дробные числа или проценты), а также использования специальных терминов [8]. Показано, что предоставление информации только в математических или только в медицинских терминах значительно снижало долю её понимавших [16].

Для оценки информированности пациентов о генетическом риске мы предложили им оценить значение риска наследственного заболевания в их семье в процентах и в качественном выражении (по градации: низ-

кий, средний, высокий). Пациенты отвечали на эти вопросы как до, так и после МГК.

Распределение ответов респондентов на вопрос «как Вы примерно оцениваете вероятность рождения больного ребёнка в Вашей семье в процентах» до МГК и после получения заключения врача-генетика (собственная оценка респондентов) в сравнении с оценкой риска в этих семьях врачами-генетиками (без учёта общепопуляционного риска) отражено в табл. 3.

По оценке врачей-генетиков, большинство заболеваний, по поводу которых пациенты, участвовавшие в опросе, обратились в медико-генетическую консультацию, имело низкий риск повторения: риск повторе-

ния от 1 до 5% был у 92 семей (41%), а 50 семей (22%) имели риск повторного рождения больного ребёнка менее 1%.

После МГК повысилось количество пациентов, правильно назвавших значения риска наследственного заболевания в их семье. До проведения МГК правильно называли значения своего генетического риска 92 чел. (45%), а после получения заключения врача-генетика — 150 чел. (67%). Различия статистически достоверны ($\chi^2 = 33,92$; $p < 0,05$).

Далее мы оценили изменение оценки степени генетического риска консультирующимися после МГК. На вопрос анкеты №1 о степени риска повторного рожде-

Таблица 1

Результаты ответов на вопросы о генетике и наследственной патологии пациентами МГК с больными детьми

Вопрос	Количество ответов на вопрос, N (%)					
	Пациенты, обратившиеся по поводу наследственного заболевания (или подозрения на него) у ребёнка (до МГК)			Пациенты, обратившиеся по поводу наследственного заболевания (или подозрения на него) у ребёнка (после получения заключения)		
	Да	Нет	Затрудняюсь ответить	Да	Нет	Затрудняюсь ответить
Знаете ли вы, что такое наследственность?	76 (61)	7 (6)	41 (33)	100 (81)	3 (2)	21 (17)
Знаете ли вы, что такое гены?	68 (55)	8 (6)	48 (39)	91 (73)	5 (4)	28 (23)
Может ли изменение генов вызвать заболевание?	82 (66)	3 (2)	39 (32)	90 (73)	4 (3)	30 (24)
Может ли ребёнок с наследственным заболеванием родиться у здоровых супругов?	70 (56)	5 (4)	49 (40)	79 (64)	9 (7)	36 (29)
Всегда ли наследственное заболевание встречается у нескольких членов семьи?	7 (6)	58 (47)	59 (47)	8 (6)	72 (58)	44 (35)

Таблица 2

Результаты ответов на вопросы о генетике и наследственной патологии пациентами МГК, не имевшими больных детей

Вопрос	Количество ответов на вопрос, N (%)					
	Пациенты, обратившиеся по поводу наследственного заболевания (или подозрения на него) у ребёнка (до МГК)			Пациенты, обратившиеся по поводу наследственного заболевания (или подозрения на него) у ребёнка (после получения заключения)		
	Да	Нет	Затрудняюсь ответить	Да	Нет	Затрудняюсь ответить
Знаете ли вы, что такое наследственность?	64 (63)	11 (11)	27 (26)	80 (78)	1 (1)	21 (21)
Знаете ли вы, что такое гены?	54 (53)	17 (17)	31 (30)	79 (77)	1 (1)	22 (22)
Может ли изменение генов вызвать заболевание?	65 (64)	4 (4)	33 (32)	77 (75)	2 (2)	23 (23)
Может ли ребёнок с наследственным заболеванием родиться у здоровых супругов?	67 (66)	9 (9)	66 (65)	75 (74)	4 (4)	23 (23)
Всегда ли наследственное заболевание встречается у нескольких членов семьи?	9 (9)	46 (45)	47 (46)	7 (7)	58 (57)	37 (36)

ния больного ребёнка ответили 188 консультирующихся (83%). На тот же вопрос анкеты №2 ответили 196 чел. (87%). Для дальнейшей обработки были отобраны анкеты и медицинские карты консультирующихся, ответивших на этот вопрос в обеих анкетах. Распределение ответов на вопрос о степени риска рождения больного ребёнка (собственная оценка респондентов) до и после МГК, а также оценка степени риска врачами-генетиками приведено в табл. 4.

Генетический риск менее 5% считался врачами-генетиками низким, от 10% до 20% — повышенным в средней степени и свыше 20% — высоким. В большинстве проконсультированных семей, по оценке врачей-генетиков, генетический риск был низким (65%), у 5% семей — средним и у 19% семей — высоким.

Доля пациентов, правильно назвавших степень генетического риска после МГК достоверно увеличилась ($\chi^2 = 20,76$; $p < 0,05$).

Наибольшие сложности в интерпретации степени риска возникли у пациентов, воспринимающих после МГК свой риск как средний. Из 46 чел., попавших в эту группу после МГК, только 9 пациентов имели такой риск, по оценке врачей, остальные пациенты имели риск, который генетики считали низким. Этот результат показывает необходимость уделять больше внимания интерпретации степени риска в процессе МГК.

*Оценка влияния
некоторых медицинских и социальных
характеристик респондентов
на изменение информированности после МГК*

Ранее было показано, что понимание консультирующимися генетической информации может зависеть от образования консультирующихся, их места жительства, социально-экономического статуса, цели обращения к врачу-генетику [11—13].

Нами была сформулирована гипотеза, что на изменение информированности пациентов после МГК могут влиять наличие в семье детей, больных наследственным заболеванием или с подозрением на него, цель обращения, уровень образования, доход и место жительства семьи.

Из 58 консультирующихся, которые стали правильно называть значения генетического риска в своей семье после МГК, 13 имели больных детей. Среди 55 пациентов, назвавших значения риска неправильно, детей имели 39 пациентов. Различие между группами статистически достоверно ($\chi^2 = 25,35$; $p < 0,05$). Доля пациентов, правильно назвавших значения генетического риска, в семьях, не имеющих больных детей, выше.

Из 58 консультирующихся, которые стали правильно называть значения генетического риска в своей семье после МГК, 23 пациента обратились в медико-генетиче-

Оценка вероятности рождения больного ребёнка до и после МГК

Таблица 3

Вариант ответа	Собственная оценка респондентами степени риска в процентах, N (%)		Оценка риска наследственной патологии в семье врачами-генетиками, N (%)
	До МГК (Анкета №1)	После МГК (Анкета №2)	
Менее 1%	31 (15)	27 (13)	50 (22)
От 1 до 5%	8 (4)	50 (24)	92 (41)
От 6 до 10%	14 (7)	26 (13)	23 (10)
От 11 до 25%	17 (8)	13 (6)	11 (5)
От 26 до 50%	19 (9)	18 (9)	30 (13)
От 51 до 75%	8 (4)	3 (1)	—
От 76 до 99%	—	1 (0)	—
100%	—	—	—
Затрудняюсь ответить / Риск не определён	109 (53)	67 (33)	20 (9)

Оценка степени риска больного ребёнка до и после МГК

Таблица 4

Вариант ответа	Риск рождения больного ребёнка, N (%)		Оценка степени риска наследственной патологии в семье врачами-генетиками, N (%)
	До МГК (Анкета №1)	После МГК (Анкета №2)	
Низкий	35 (19)	70 (37)	123 (65)
Средний	35 (19)	46 (24)	9 (5)
Высокий	26 (13)	35 (19)	36 (19)
Трудно сказать / Риск не определён	92 (49)	37 (20)	20 (11)

скую консультацию с целью «определение риска рождения больного и вероятности рождения здорового ребёнка». Среди 55 пациентов, продолжающих давать неправильный ответ на этот вопрос, такую цель имели 9 пациентов. Между группами имелись достоверные отличия ($\chi^2 = 11,92$; $p < 0,05$). Доля пациентов, правильно назвавших значения генетического риска, среди обратившихся для определения риска рождения больного и вероятности рождения здорового ребёнка, была достоверно выше.

Достоверных различий между группами консультирующихся правильно и не правильно назвавших значения и степень риска с разным образованием, местом жительства и доходом выявлено не было.

Заключение

В настоящей работе мы оценили эффективность МГК в отношении запоминания значений и степени генетического риска консультирующимися, а также освоения ими медико-генетических знаний, необходимых для понимания природы заболевания в семье.

МГК в целом оказывала положительное влияние на информированность консультирующихся по некоторым вопросам, однако, не получено достоверных различий долей пациентов, правильно ответивших на вопросы о возможных причинах заболевания и его наследовании до и после консультации. Так как затруднения при ответе на эти вопросы встречались почти одинаково часто как до, так и после МГК, почти определённо следует, что врачам-генетикам необходимо больше рассказывать пациентам о причинах наследственного заболевания и его передаче потомкам.

После МГК достоверно увеличилась доля информированных пациентов относительно значений и степени генетического риска наследственного заболевания. Однако не все пациенты, правильно назвавшие значения своего генетического риска, интерпретировали его так же, как врачи-генетики. Большинство пациентов, оценивающих свой риск как «средний», реально относилось к группе с низким значением генетического риска. Это показывает необходимость больше внимания во время МГК уделять объяснению не только значений, но и интерпретации генетического риска.

Мы выявили, что чаще правильно называли значения и степень генетического риска пациенты, не имеющих больных детей и обратившиеся с целью «определение риска рождения больного и вероятности рождения здорового ребёнка», что, вероятно, связано с более сильной мотивацией на дальнейшее деторождение [1].

Оценка эффективности МГК по ряду других параметров будет проведена в нашей следующей работе.

Список литературы

1. 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 консультирующихся // Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №5 (131). — С. 42–48.
2. 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 подготовленность к МГК // Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №8 (134). — С. 42–46.
3. Гинтер Е.К. Некоторые проблемы медико-генетического консультирования // Медицинская генетика. — 2007. — Т. 6, №5 (59). — С. 3–7.
4. Гузев Г.Е., Семаго М.М. Медико-генетическая консультация: эмоциональное состояние и понимание информации родителями // Дефектология. — 1992. — №1. — С. 18–22.
5. Козлова С.И. Современные проблемы медико-генетического консультирования: Науч. обзор / Под ред. А.Ф. Захарова. — М.: ВНИИМИ, 1983. — 92 с.
6. Ciske D.J. et al. Genetic counseling and neonatal screening for cystic fibrosis: an assessment of the communication process // Pediatrics. — 2001. — Vol. 107(4). — P. 699–705.
7. Edwards A., Elwyn G. How should effectiveness of risk communication to aid patients' decisions be judged? A review of the literature // Med. Decis. Making. — 1999. — Vol. 19(4). — P. 428–434.
8. Edwards A., Elwyn G., Stott N. Communicating risk reductions. Researchers should present results with both relative and absolute risks // BMJ. — 1999. — Vol. 318(7183). — P. 603; author reply 603–604.
9. Edwards A., Elwyn G., Gwyn R. General practice registrar responses to the use of different risk communication tools in simulated consultations: a focus group study // BMJ. — 1999. — Vol. 319(7212). — P. 749–752.
10. Ellington L. et al. Exploring genetic counseling communication patterns: the role of teaching and counseling approaches // J. Genet. Couns. — 2006. — Vol. 15(3). — P. 179–189.
11. Hanning K.A. et al. Why do women not return family history forms when referred to breast cancer genetics services? A mixed-method study. Health Expect.
12. Hughes C. et al. Sociocultural influences on participation in genetic risk assessment and testing among African American women // Patient Educ. Couns. — 2003. — Vol. 51(2). — P. 107–114.
13. Joseph G. et al. Efficient identification and referral of low-income women at high risk for hereditary breast cancer: a practice-based approach // Public Health Genomics. — 15(3–4). — P. 172–180.
14. Langfelder-Schwind E. et al. Cystic fibrosis prenatal screening in genetic counseling practice: recommendations of the National Society of Genetic Counselors // J. Genet. Couns. — 2005. — Vol. 14(1). — P. 1–15.
15. Meiser B. et al. Assessment of the content and process of genetic counseling: a critical review of empirical studies // J. Genet. Couns. — 2008. — Vol. 17(5). — P. 434–451.
16. Melas P.A. et al. Information related to prenatal genetic counseling: interpretation by adolescents, effects on risk perception and ethical implications // J. Genet. Couns. — 21(4). — P. 536–546.
17. Overby C.L., Chung W.K., Hripsak G., Kukafka R. Cancer Genetic Counselor Information Needs for Risk Communication: A Qualitative Evaluation of Interview Transcripts // J. Pers. Med. — 2013. — 3(3).

Integrated estimation of genetic counseling efficiency. Report III. Efficiency of patient education

Baranova E.E.¹, Sergeev A.S.², Ivanova L.Yu.³,
Zhuravleva I.V.³, Izhevskaya V.L.², Ginter E.K.^{1,2}

¹ — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health, Moscow; e-mail: baranova.gen@gmail.com

² — Research Centre of Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

³ — Institute of Sociology, Russian Academy of Sciences, Moscow

The paper gives an analysis of genetic counseling efficiency in respect of memorizing value and degree of genetic risk by the patients, as well as the development of medical and genetic knowledge necessary them to understand the nature of a disease in the family. Genetic counseling has a generally positive effect on the awareness of the patients, however, a statistically significant increase in the proportion of patients which correctly answered questions about the possible causes of a disease and its inheritance is not revealed after counseling. It is shown a significant increase in the proportion of the patients which correctly note the value and degree of a genetic risk. However after the counseling, about 80% of the patients consider their genetic risk to the «middle» but really have the lowest risk by the conclusion of a geneticist. The highest proportion of the patients which gave correct answers to the questions about a genetic risk was in the group of the respondents which had no affected children and which consulted to determine a risk of birth of the affected child and the chance of having a healthy child.

Key words: genetic counseling, estimation of efficiency, awareness, genetic risk, questionnaire forms

Мутация 14498 мтДНК: рокировка букв

Мазунин И.О.

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта,
236041 Калининград, ул. А.Невского, 14, 8 (4012) 53-62-60, e-mail: IMazunin@kantiana.ru

Ассоциация мутации m.14498T>C мтДНК с наследственной оптической нейропатией Лебера (LHON) впервые была показана в 1996 г. в работе Leo-Lottler с соавторами (1996 г.). С тех пор, однако, научная общественность разделилась на два «лагеря», представители одного из которых ссылаются на мутацию m.14498T>C, другого — на мутацию m.14498C>T. В настоящем сообщении мы попытаемся разобраться, когда именно и почему произошла рокировка в обозначаемых мутацию буквах.

Ключевые слова: мутации мтДНК, наследственная оптическая нейропатия Лебера

Наследственная оптическая нейропатия Лебера (LHON, OMIM #355000) — форма слепоты, связанная с дегенерацией ганглиозного слоя сетчатки и атрофией зрительного нерва. Впервые ассоциация данного заболевания с мутацией в митохондриальной ДНК (мтДНК) была показана в 1988 г. [10], и с тех пор выявлено более 60 мутаций [5]. В ходе молекулярно-генетического анализа патогенные мутации мтДНК удаётся выявить лишь в половине случаев, клинически диагностированных как LHON. Но когда мутация всё-таки выявляется, в 95% случаев — это одна из трёх так называемых «первичных» мутаций мтДНК (m.3460G>A, m.11778G>A и m.14484T>C). Оставшиеся долю составляют «вторичные» мутации, число которых растёт с каждым годом.

В существующих базах данных, где аннотированы полные последовательности мтДНК (например, MITOMAP или mtDB), в основном представлены последовательности, секвенированные в ходе популяционных исследований [9], т.е. принадлежащие «здоровому контролю», или, по крайней мере, людям, не имеющим клинических признаков какого-либо митохондриального заболевания. Если выполняется секвенирование полной последовательности мтДНК больного митохондриальным заболеванием, то чаще всего мутации просто прописаны в статье тексте либо в виде таблицы [8].

В настоящем сообщении мы остановимся на мутации мтДНК в положении 14498, где произошла замена тимина на цитозин (T>C). Впервые эта замена была описана германским коллективом исследователей в 1996 г. [6]. Затем, год спустя, вышла в свет другая работа того же коллектива [11]. В ряде публикаций, в том числе обширных обзорах по LHON [4, 12], ссылаются именно на эту работу 1997 г. Однако, ссылаясь на публикацию Wissinger с соавторами (1997), авторы в списке мутаций мтДНК, ассоциированных с LHON, пишут m.14498C>T, в то время как в Cambridge Reference Sequence (rCRS) в положении 14498 находится тимин [2, 3].

В публикации Leo-Lottler с соавторами (1996 г.) речь идет именно о замене T>C. В публикации Wissinger с соавторами (1997) в табл. 1 прописано уже 14498 C>T, однако на рис. 1 показана хроматограмма с подписью, где

говорится о замене T>C в положении 14498, хотя в результатах опять же прописана замена C>T со ссылкой на вышеописанный рис. 1. Таким образом, несколько опечаток по ходу текста привели в дальнейшем к тому, что вот уже 18 лет (с 1996 г.) научная общественность ссылается на неправильную мутацию.

Согласно сайту ISI Web of Knowledge, работа Leo-Lottler с соавторами (1996) была процитирована 24 раза, тогда как работа Wissinger с соавторами (1997 г.) — 37 раз (на 12.02.2014). При сопоставлении этих списков, в пяти случаях цитируют обе публикации. Причем в публикации Pasti с соавторами (2008) [7] цитируются обе эти работы, сначала в положении 14498 появляется замена T>C (табл. 1), а затем, через 4 страницы, в табл. 5, уже C>T.

Кроме того, были проверены все имеющиеся в свободном доступе полные последовательности мтДНК (20666 полных последовательностей на 19.02.2014, согласно MITOMAP). Оказалось, что во всех мтДНК в положении 14498, как и в rCRS, находится тимин. Это, в свою очередь, значит, что мутация m.14498T>C была выявлена лишь однажды в описываемой Leo-Lottler с соавторами (1996 г.) семье, после чего, однако, полная последовательность мтДНК этой семьи либо не была секвенирована, либо не была аннотирована в базу данных (GeneBank).

Такая же ситуация наблюдается и для других мутаций, опубликованных в работе Wissinger с соавторами (1997): в положениях 14199, 14272, 14365 и 14368 авторы произвели рокировку букв. Однако, видимо, в силу того, что эти мутации являются обычным полиморфизмом, — дальше этой статьи эти ошибки, видимо, не ушли.

Несмотря на то, что публикации в научных журналах проходят жёсткую рецензию, ошибки всё же могут закрадываться. Несомненно, рассматриваемая в настоящем сообщении ошибка не имеет последствий при анализе мтДНК, поскольку исследователь тут же увидит, что тимин в положении 14498 не может быть патогенной мутацией, поскольку:

а) уже присутствует в rCRS;

б) присутствует во всех имеющихся полных последовательностях мтДНК.

Смысл настоящего сообщения заключался лишь в том, чтобы обратить внимание исследователей на публикации, которые они цитируют в ходе написания своих работ, особенно обзорных, поскольку обзорная работа — единственный источник знакомства в общих чертах с новой областью знания. В данном же случае получается как в эссе Эрвина Чаргаффа «Белибердинское столпотворение»: «Библиографические списки составлялись сравнительно честно, в то время как сейчас целые блоки ссылок перетаскиваются путем своеобразной трансдукции из одной статьи в другую, так что если на какую-то работу перестают ссылаться, то уж навсегда» [1].

Список литературы

1. Семенов Н.Н., Энгельгардт В.А., Кнунянц И.Л., и др. Краткий миг торжества. О том, как делаются научные открытия. — М.: Наука, 1988.
2. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome // *Nature*. — 1981. — Vol. 290. — P. 457–465.
3. Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F. et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA // *Nat. Genet.* — 1999. — Vol. 23. — P. 147.
4. Carelli V., Ross-Cisneros F.N., Sadun A.A. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies // *Prog. Retin. Eye Res.* — 2004. — Vol. 23. — P. 53–89.
5. Koilkonda R.D., Guy J. Leber's Hereditary Optic Neuropathy-Gene Therapy: From Benchtop to Bedside // *J. Ophthalmol.* — 2011. — doi: 10.1155/2011/179412.
6. Leo-Kottler B., Christ-Adler M., Baumann B. et al. Leber's hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic results obtained in a family with a new point mutation at nucleotide position 14498 in the ND 6 gene // *Ger. J. Ophthalmol.* — 1996. — Vol. 5. — P. 233–240.
7. Patsi J., Kervinen M., Finel M., Hassinen I.E. Leber hereditary optic neuropathy mutations in the ND6 subunit of mitochondrial complex I affect ubiquinone reduction kinetics in a bacterial model of the enzyme // *Biochem. J.* — 2008. — Vol. 409. — P. 129–137.
8. Tonska K., Kurzawa M., Ambroziak A.M. et al. A family with 3460G>A and 11778G>A mutations and haplogroup analysis of Polish Leber hereditary optic neuropathy patients // *Mitochondrion*. — 2008. — Vol. 8. — P. 383–388.
9. Volodko N.V., Starikovskaya Y.B., Mazunin I.O. et al. Mitochondrial genome diversity in Arctic Siberians, with particular reference to the evolutionary history of Beringia and Pleistocene peopling of the Americas // *Am. J. Hum. Genet.* — 2008. — Vol. 82. — P. 1084–1100.
10. Wallace D.C., Singh G., Lott M.T. et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy // *Science*. — 1988. — Vol. 242. — P. 1427–1430.
11. Wissinger B., Besch D., Baumann B. et al. Mutation analysis of the ND6 gene in patients with Leber's hereditary optic neuropathy // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1997. — Vol. 234. — P. 511–515.
12. Yu-Wai-Man P., Griffiths P.G., Chinnery P.F. Mitochondrial optic neuropathies — disease mechanisms and therapeutic strategies // *Prog. Retin. Eye Res.* — 2011. — Vol. 30. — P. 81–114.

14498 mtDNA mutation: letters permutation

Mazunin I.O.

Immanuel Kant Baltic Federal University,
236041, Kaliningrad, 14 Nevskogo St., 8 (4012) 53-62-60, e-mail: IMazunin@kantiana.ru

The mutation *m.14498T>C* was first described in 1996 by *Leo-Lottler с соавторами* in patients with Leber hereditary optic neuropathy (LHON). Since then the scientific community was divided into two «camps», representatives one of which reference mutation *m.14498T>C*, the other ones — on the mutation *m.14498C>T*. In this report, we try to understand exactly when and why there was a reshuffle in the designated mutation letters.

Key words: mtDNA mutation, Leber hereditary optic neuropathy

Правила оформления статей в журнале «Медицинская генетика»

Настоящие правила являются приложением к договору публичной оферты, размещённому на сайте www.med-gen.ru, в разделе «Журнал «Медицинская генетика».

«Медицинская генетика» — ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал, публикующий результаты исследований отечественных и зарубежных учёных по современным проблемам генетики человека и медицинской генетики. К публикации принимаются ранее не опубликованные работы по профилю журнала: теоретические и обзорные статьи, результаты завершённых оригинальных исследований, краткие сообщения, описания клинических случаев, рецензии на книги, комментарии читателей к ранее опубликованным статьям и письма к редактору, информация о научных мероприятиях. Не принимаются к печати статьи, представляющие собой отдельные этапы незавершённых исследований, а также статьи, посвящённые исследованиям, выполненным с нарушением этических норм и правил и норм гуманного обращения с биообъектами. Решение о публикации принимается редколлегией журнала после рецензирования рукописи с учётом научной значимости и актуальности представленных материалов. При рассмотрении полученных авторских материалов редакционная коллегия руководствуется «Едиными требованиями к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» (www.ICMJE.org). Статьи, отклонённые редакционной коллегией, повторно не принимаются и не рассматриваются.

Статья должна быть написана на русском языке, представлена в одном печатном экземпляре в формате любой версии текстового редактора Microsoft Word for Windows и прислана в электронном виде на e-mail редакции. Статья должна сопровождаться направлением (сопроводительным письмом) от учреждения, где была выполнена научная работа, в котором должны быть отражены:

- информация о предшествовавших или повторных публикациях или о представлении в другой журнал любой части этой работы;
- заявление о финансовых или других взаимоотношениях, которые могут привести к «конфликту интересов»;
- заявление о том, что статья прочитана и одобрена всеми авторами, все требования к авторству соблюдены и все авторы уверены, что рукопись отражает действительно проделанную работу;
- заявление, что рукопись не содержит сведений, не подлежащих к опубликованию в открытой печати;
- указание на наличие письменных информированных согласий от пациентов на участие в исследовании и/или на публикацию информации о них, включая фотографии;
- указание на одобрение исследования локальным или центральным этическим комитетом.

В конце статьи должны быть подписи всех авторов и полностью указаны фамилия, имя, отчество, полный почтовый адрес, номер телефона, 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 25 мм. Нумерация страниц, включая первую, приводится внизу по центру. Общий объём рукописи, включая аннотации на русском и английском языках, список литературы, таблицы, рисунки и подписи под рисунками, не должен превышать для оригинальных статей 16 страниц, для обзорных и теоретических — 32 страницы, для кратких сообщений — 8 страниц. Число таблиц и число рисунков не должно быть более пяти, за исключением особых случаев, одобренных редколлекцией журнала. Размеры рисунков и таблиц не должны превышать одной страницы формата А4. Статьи большего объёма могут быть опубликованы в исключительных случаях по решению редакционной коллегии.

Структура статьи:

1. Название статьи, напечатанное строчными буквами без разрядки и выделения;
2. Фамилия(и) и инициалы автора(ов);
3. Место работы автора(ов): полное название учреждения (аббревиатуры недопустимы), город, почтовый адрес с индексом, адрес электронной почты (отметить арабскими цифрами соответствие авторов учреждениям, в которых они работают);
4. Аннотация (объёмом не более 0,5 стр.);
5. Ключевые слова (не более 5);
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 на части.
9. В завершении рукописи в обязательном порядке должны быть упомянуты все лица и организации, оказавшие финансовую поддержку исследованию (в виде грантов, дарения или предоставления оборудования, реактивов, расходных материалов, лекарств или всего этого вместе), а также принявшие другое финансовое или личное участие, которое может привести к конфликту интересов, или декларировано отсутствие у авторов конфликта интересов.
10. В конце текста статьи могут быть выражены признательность отдельным лицам и (или) научным или иным фондам и организациям, оказавшим помощь в выполнении работы;
11. После текста статьи приводится список литературы;
12. Каждая таблица печатается на отдельной странице;
13. На отдельной странице приводятся подписи к рисункам, с указанием названия статьи и авторов;
14. По-английски на отдельной странице печатаются название статьи, фамилия (фамилии) и инициалы автора (авторов), название учреждения, его адрес, включая адрес электронной почты, перевод аннотации статьи (не более 0,5 стр.), ключевые слова (не более 5).

Названия разделов печатаются заглавными буквами на отдельной строке. Подзаголовки внутри разделов также печатаются на отдельной строке. На левом поле по тексту статьи указываются места расположения рисунков и таблиц. Сложные математические формулы печатаются на отдельной строке (следует использовать редактор формул, встроенный в тексто-

вый 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 чёткими с минимальным количеством обозначений. Детали на рисунках обозначаются арабскими цифрами, либо русскими буквами, которые расшифровываются в подрисовочных подписях. В подписях к микрофотографиям необходимо указать метод окраски, если препарат окрашен, и увеличение.

Электронная версия рисунков, схем, фотографий должна быть представлена в точечных форматах tiff, jpeg или gif (300—600 dpi) или в векторных форматах Adobe Illustrator (ai, eps), Corel Draw (cdr). Файлы с иллюстрациями должны быть названы таким образом, чтобы было понятно, к какой статье они принадлежат, и каким по порядку является рисунок.

Цитируемая литература (не более 25 для оригинальных работ и не более 50 для обзорных статей) приводится в алфавитном порядке (вначале на русском языке). **Не допускаются ссылки на неопубликованные работы, материалы конференций, диссертации (можно указывать в качестве источника автореферат диссертации).** В тексте номер ссылки заключён 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 страницы. Пример оформления ссылок:

Сурин В.Л. Лабораторная диагностика острой перемежающейся 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:

Кадурина Т.И. *Наследственные коллагенопатии (клиника, диагностика, лечение и диспансеризация)*. — СПб.: Невский Диалект, 2000. — 271 с.

Ссылка на материалы авторефератов диссертаций:

Котлюкова Н.П. *Кардиоваскулярная патология у новорожденных и детей раннего возраста: Автореф. дисс. на соискание учёной степени д.м.н.* — М., 2001. — 57 с.

Рецензирование статьи осуществляется в соответствии с утверждёнными правилами, с которыми можно ознакомиться на сайте www.med-gen.ru.

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.

Отклонённые статьи не возвращаются.

Авторский гонорар не выплачивается.

Все статьи, в том числе статьи аспирантов и докторантов, публикуются бесплатно.

В случае обнаружения ошибок или описок в ранее опубликованных статьях журнал публикует в одном из последующих номеров на отдельной странице перечень ошибок и описок с цитированием оригинального текста статьи и со ссылкой на статью. При этом в оглавление номера включается раздел «Исправления». В случае выявления недостоверных данных в уже опубликованной статье редакция журнала публикует опровержение. Опровержение (как и редакторское мнение) помещается в журнале на отдельной странице и включается в оглавление. В тексте опровержения редактор приводит доказательства недостоверности данных, опубликованных в статье, и приводит все необходимые цитаты.

Статьи следует направлять по адресу:

115478, Москва, ул.Москворечье, 1,
Медико-генетический научный центр РАМН,
редакция журнала «Медицинская генетика».

Электронный вариант статьи следует направлять на электронный адрес редакции L_Tarlycheva@med-gen.ru.