

Главный редактор
ГИНТЕР Е.К.
академик РАН, д.б.н., профессор

Заместители главного редактора
ПУЗЫРЕВ В.П.
академик РАН, д.м.н., профессор

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

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

КУЧИНСКАС В. (Kucinskaskas V.)
академик Литовской АН, д.б.н., профессор
ЛИМБОРСКАЯ С.А.
чл.-корр. РАН, д.б.н., профессор
МАЦЕК М. (Masek M. Jr.)
доктор медицины и педиатрии (MD),
доктор философии по медицине
и молекулярной генетике (PhD), профессор

МИХАЙЛОВА Л.К.
д.м.н., профессор

НАЗАРЕНКО Л.П.
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, д.м.н., профессор

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

СТЕПАНОВ В.А.
академик РАН, д.б.н., профессор

ХУСНУТДИНОВА Э.К.
д.б.н., профессор

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

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

Издатель: Иришкин Дмитрий

E-mail: genius-media@mail.ru

Адреса редакции:
115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1,
Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
Медико-генетический научный центр
имени академика Н.П.Бочкова

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
редакцией журнала «Медицинская генетика»
обязательно. За содержание рекламных
публикаций ответственность
несет рекламодатель.

© Российское общество медицинских генетиков
© Российская академия медицинских наук
© ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»
© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич

Тираж 200 экз.

Медицинская ГЕНЕТИКА

Ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал

2023. Том 22, №6

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исаев А.А., Бардаков С.Н., Мкртчян Л.А., Мусатова Е.В., Хмелькова Д.Н., Гусева М.В., Каймонов В.С., Яковлев И.А., Деев Р.В.

Новые варианты нуклеотидных последовательностей гена *DYSF*, выявленные методом секвенирования нового поколения 3

Кадышев В.В., Гинтер Е.К., Куцев С.И., Кириллова М.О., Зинченко Р.А.

Груз наследственных болезней органа зрения в различных популяциях и этнических группах европейской части Российской Федерации. 12

Мансорунов Д.Ж., Кипкеева Ф.М., Музаффарова Т.А., Никулин М.П., Малихова О.А., Апанович Н.В., Алимов А.А.

Особенности экспрессии иммунных контрольных точек в микросателлитно стабильных опухолях рака желудка 24

Смирнова О.В., Лагутинская Д.В.

Полиморфные локусы генов *PNPLA3*, *HFE*, ассоциированные с неалкогольной жировой болезнью печени, у пациентов с метаболическим синдромом в Красноярском крае 32

Соловьёва Е.В., Склеймова М.М., Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Скрыбин Н.А.

Разработка универсальной панели STR-маркеров для проведения ПГТ-М муковисцидоза с учетом специфического гаплотипа хромосом, несущих вариант F508del гена *CFTR* 38

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Куликова К.С., Райкина Е.Н., Толмачева Е.Р., Померанцева Е.А.

Кожно-скелетный синдром с гипофосфатемией: первое в России клиническое описание двух случаев заболевания с генетической верификацией диагноза 51

ИСПРАВЛЕНИЕ

Исправление к статье Андреева М.В., Курило Л.Ф., Штаут М.И., Черных В.Б. «Частичный блок сперматогенеза у двух носителей робертсоновских транслокаций (14;15)». 62

Medical GENETICS

Monthly reviewed scientific and practical journal

2023. Vol. 22, Issue 6

Editor-in-Chief

GINTER E.K.

Deputies Editor-in-Chief

PUZYREV V.P.

Executive Editor

IZHEVSKAYA V.L.

Editorial Board

ARCHAKOV A.I.

VOEVODA M.I.

DURNEV A.D.

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.

NOSIKOV V.V.

ROGAEV E.I.

RUBTZOV N.B.

SVERDLOV E.D.

SEREDENIN S.B.

SMIRNOV V.N.

STEPANOV V.A.

KHUSNUTDINOVA E.K.

CHEKHONIN V.P.

CHUCHALIN A.G.

Publisher: Irishkin Dmitry

E-mail: genius-media@mail.ru

Editorial address:

Moskvorechie st.1, Moscow, 115522, Russia

Research Centre for Medical Genetics

Tel.: +7499 612 8107

E-mail: L_Tarlycheva@med-gen.ru

For the attention of authors and readers

Manuscripts and illustrations are not returned.

When reprinting materials, agreement with publisher is mandatory.

Responsibility for the content of advertising publications carried by the advertiser.

© Russian Society of Medical Genetics

© Russian Academy of Medical Sciences

© Research Centre for Medical Genetics

© IE Irishkin Dmitry Andreevich

Circulation (Print): 200 copies.

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Isaev A.A., Bardakov S.N., Mkrtchyan L.A., Musatova E.V., Khmelkova D.N., Guseva M.V., Kaimonov V.S., Yakovlev I.A., Deev R.V.*
New nucleotide sequence variants of the *DYSF* gene, identified by the next-generation sequencing. **3**
- Kadyshev V.V., Ginter E.K., Kutsev S.I., Kirillova M.O., Zinchenko R.A.*
The burden of hereditary diseases of the visual organ in various populations and ethnic groups of the European part of the Russian Federation **12**
- Mansorunov D.Zh., Kipkeeva F.M., Muzaffarova T.A., Nikulin M.P., Malikhova O.A., Apanovich N.V., Alimov A.A.*
Features of immune checkpoint expression in microsatellite stable gastric cancer. **24**
- Smirnova O.V., Lagutinskaya D.V.*
The frequencies of polymorphisms of *PNPLA3* and *HFE* genes associated with potentially non-alcoholic fatty liver disease in patients with metabolic syndrome in the Krasnoyarsk Territory **32**
- Soloveva E.V., Skleimova M.M., Minaycheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Skryabin N.A.*
STR panel for preimplantation genetic testing for cystic fibrosis, taking into account the specific haplotype of chromosomes carrying the *CFTR* F508del variant. **38**

CLINICAL CASE

- Kulikova K.S., Raikina E.N., Tolmacheva E.R., Pomerantseva E.A.*
Cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome: the first clinical description of two cases with genetic verification in Russia. **51**

ERRATUM

- Correction to the article
Andreeva M.V., Kurilo L.F., Shtaut M.I., Chernykh V.B.
«Partial block of spermatogenesis in two carriers of Robertsonian translocations (14;15)». **62**

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.06.3-11>

Новые варианты нуклеотидных последовательностей гена *DYSF*, выявленные методом секвенирования нового поколения

Исаев А.А.^{1,2}, Бардаков С.Н.³, Мкртчян Л.А.⁴, Мусатова Е.В.², Хмелькова Д.Н.², Гусева М.В.², Каймонов В.С.², Яковлев И.А.^{1,2,4}, Деев Р.В.^{1,4,5}

1 – ПАО «Институт стволовых клеток человека»
119333, г. Москва, ул. Губкина, д.3, стр.2, а/я 373

2 – ПАО «Центр генетики и репродуктивной медицины «Генетико»
119333, г. Москва, ул. Губкина, д. 3, корп.1

3 – ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации
194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

4 – ООО «Генотаргет»
121614, г.Москва, вн.тер. г. Муниципальный Округ Крылатское, ул. Крылатские Холмы, д. 32, к. 2

5 – ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41

Введение. Среди поясно-конечностных мышечных дистрофий (ПКМД) по частоте встречаемости дисферлинопатия занимает второе место в мире после кальпаинопатии. Заболевание характеризуется относительно поздней манифестацией, а сходная клиническая картина в группе ПКМД в ряде случаев создает значимые сложности в дифференциальной диагностике. Методом секвенирования нового поколения (NGS) можно быстро и эффективно определить вариант нуклеотидной последовательности гена *DYSF*, приводящий к нарушению синтеза белка дисферлина.

Цель исследования: определить эффективность выявления вариантов нуклеотидных последовательностей в гене *DYSF* методом NGS у пациентов с клиническим диагнозом диферлинопатия и оценить возможности данного метода в дифференциальной диагностике ПКМД.

Методы. Поиск генетических вариантов в гене *DYSF* производился у 157 пациентов при наличии клинических проявлений ПКМД, сопровождающихся повышением уровня креатинфосфокиназы (КФК) в 10-100 раз, манифестацией в возрасте 2-73 лет. У 27 пациентов выявлены изменения в последовательности гена *DYSF*. Методом Сэнгера было обследовано 9 из 27 человек – 34 (15-58)%. 18 пациентов было обследовано методом NGS, что составляет 67(42-85)%. У 2 родственных пациентов, у которых был выявлен только один вариант измененной последовательности гена *DYSF*, для поиска крупных делеций и (или) дупликаций была проведена мультиплексная лигаза-зависимая амплификация (MLPA). Выявленные методом NGS генетические варианты верифицировались референтным методом – ПЦР. Гистологическое и иммуногистологическое исследование выполнено четырьмя пациентам с неоднозначным результатом молекулярно-генетической диагностики. В качестве биоптата забран фрагмент (5 мм³) латеральной головки четырехглавой мышцы бедра.

Результаты и выводы. Методом NGS в гене *DYSF* был выявлен 21 различных генетический вариант у 27 пациентов. 16 из 21 генетических вариантов ранее описаны; в четверти случаев (5 вариантов, 25(0-52)%) генетические варианты являются ранее не описанными (novel). Из 21 выявленного варианта на основании критериев ACMG 12 (57(31-81)%) были классифицированы как патогенные, 5 (25(0-51)%) – как вероятно патогенные, 4 (20(0-46)%) – как варианты с неизвестной клинической значимостью.

Ключевые слова: секвенирование, NGS, дисферлин, дисферлинопатия, ПКМД R2 (2B).

Для цитирования: Исаев А.А., Бардаков С.Н., Мкртчян Л.А., Мусатова Е.В., Хмелькова Д.Н., Гусева М.В., Каймонов В.С., Яковлев И.А., Деев Р.В. Новые варианты нуклеотидных последовательностей гена *DYSF*, выявленные методом секвенирования нового поколения. *Медицинская генетика* 2023; 22(6): 3-11.

Автор для корреспонденции: Мкртчян Лилит Арменовна; e-mail: lilit@genotarget.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 01.06.2023

New nucleotide sequence variants of the *DYSF* gene, identified by the next-generation sequencing

Isaev A.A.^{1,2}, Bardakov S.N.³, Mkrtchyan L.A.⁴, Musatova E.V.², Khmelkova D.N.², Guseva M.V.², Kaimonov V.S.², Yakovlev I.A.^{1,2,4}, Deev R.V.^{1,4,5}

- 1 – Public joint stock company "Human Stem Cells Institute"
3, bldg. 2, Gubkina st., PO box 373, Moscow, 119333, Russian Federation
- 2 – Public joint stock company "Genetico" Center for Genetics and Reproductive Medicine
3, bldg.1, Gubkina st., Moscow, 119333, Russian Federation
- 3 – "Military Medical Academy named after S.M. Kirov"
6, Academician Lebedeva st., St. Petersburg, 194044, Russian Federation
- 4 – Limited liability Company "Genotarget"
32, bldg.2, Krylatskie Holmy st., Moscow, 121614, Russian Federation
- 5 – North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
14, Kirochnaya st., St. Petersburg, 191015, Russian Federation

Background. According to the frequency of occurrences dysferlinopathy occupies the second place in world among limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) after calpainopathy. The disease has a relatively late manifestation and the similar clinical picture with other LGMD. In some cases, that creates significant difficulties in differential diagnostics. New generation sequencing (NGS) is method that quickly and efficiently allows to determine the variant of the *DYSF* gene that leads to violation of protein synthesis.

Aim: to determine the effectiveness of identifying variants of nucleotide sequences in the *DYSF* gene by the NGS in patients with a clinical diagnosis of dysferlinopathy and also to evaluate the possibilities of this method in differential diagnostics of LGMD.

Methods. The search for genetic variants of the *DYSF* gene was performed in patients with detected phenotype of LGMD, as well as 10 to 100 times higher levels of creatine kinase (CK) and manifestation at the age of 2-73 years. In total, 157 patients with a clinical signs of LGMD were included in the study. Changes in the sequence of the *DYSF* gene were detected in 27 of them. 9 of 27 people – 34(15-58)% were examined with Sanger sequencing. 18 of them – 67(42-85)% were examined by the NGS method. In two patients only one changed variant in the *DYSF* gene was detected, in this regard multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) was performed to search for large deletions and (or) duplications. The identified genetic variants were verified by the reference method – PCR. Histological and immunohistological examination was performed in four patients with ambiguous results. As a biopsy material for examination were used fragments (5 mm³) of the lateral head of the quadriceps femoral muscle.

Results and conclusions. Using the NGS method, in 27 patients 21 genetic variant of the *DYSF* gene was identified. 16 variants out of 21 belong to the category of previously described; thus, in almost a quarter of cases (5) – 25(0-52)% variants weren't described before (novel). Among the 21 identified variants, based on ACMG criteria, 12 – 57(31-81)% variants were classified as pathogenic, 5 – 25(0-51)% as probably pathogenic and 4 – 20(0-46)% as variants with uncertain significance, however, all detected variants were accompanied by a detailed clinical signs of LGMD.

Keywords: sequencing, NGS, dysferlin, dysferlinopathy, LGMD R2 (LGMD 2B).

For citation: Isaev A.A., Bardakov S.N., Mkrtchyan L.A., Musatova E.V., Khmelkova D.N., Guseva M.V., Kaimonov V.S., Yakovlev I.A., Deev R.V. New nucleotide sequence variants of the *DYSF* gene, identified by the next-generation sequencing. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(6): 3-11. (In Russ.)

Corresponding author: Lilit A. Mkrtchyan; **e-mail:** lilit@genotarget.com

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Accepted: 01.06.2023

Введение

Среди поясно-конечностных мышечных дистрофий (ПКМД) по частоте встречаемости дисферлинопатия занимает 2 место в мире после кальпаинопатии [1]. Как известно, дисферлинопатия характеризуется относительно поздней манифестацией, а сходная клиническая картина в группе ПКМД в ряде случаев создает значимые сложности в дифференциальной диагностике [2]. Описано три клинических

фенотипа дисферлинопатии, являющихся заболеваниями с аутосомно-рецессивным типом наследования: миопатия Миоши (OMIM 254130), ПКМД тип R2 (2B) (OMIM 253601), дистальная миопатия в передней тиббиальной группе мышц голени (OMIM 606768). Для миопатии Миоши в начальный период заболевания характерно преимущественное поражение задней группы мышц голени, тогда как при ПКМД тип R2 (2B)

наблюдается преимущественно проксимальная мышечная слабость. Дистальная миопатия с началом в передней тиббиальной группе мышц голени характеризуется преобладанием поражения передней группы мышц. Однако ряд клинических форм заболевания характеризуется стертой или нетипичной клинической картиной, нуждающейся в современной молекулярно-генетической и морфологической дифференциальной диагностике [3, 4].

Установлено, что причиной заболевания является нарушение функции белка дисферлина, ответственного за кальций-зависимую репарацию сарколеммы в волокнах поперечнополосатой скелетной мышечной ткани. Этот белок также принимает участие в процессах регуляции слияния миобластов на этапах миогистогенеза и регенерации [1]. Ген дисферлина *DYSF* располагается в регионе 2p13 [1, 5].

Накопленный опыт показывает, что для возникновения клинических проявлений дефицита дисферлина необходимо наличие патогенных вариантов гена в гомозиготной или компаунд-гетерозиготной формах [6]. Известно, что нуклеотидные замены и инсерции и (или) делеции нескольких нуклеотидов встречаются гораздо чаще, чем крупные делеции и дубликации регионов гена *DYSF* [5]. В лабораторной практике могут возникать технические сложности в определении патогенных вариантов в протяженном гене *DYSF*, который содержит 55 экзонов (150 т.п.н.). В нем описано более 720 каузативных генетических вариантов [7]. Среди них не удается выделить группу мажорных повреждений [7].

Описаны этнические группы, в которых доля ряда генетических вариантов весьма высока: испанцы – с.6086C>T (p.R1905X) у пациентов из 5 неродственных семей [8]; итальянцы – с.2875C>T (p.R959W) (для этого варианта рассматривается эффект основателя) [9]. При обследовании 10 пациентов из 8 семей с ПКМД из Израиля, являющихся по своему происхождению кавказскими евреями, в результате анализа всей кодирующей последовательности и экзонно-интронных областей гена *DYSF* был выявлен частый генетический вариант с.2779delG в гомозиготной форме, приводящий к сдвигу рамки считывания, появлению преждевременного стоп-кодона и полной утрате функциональности белка. Частота носительства этого патогенного варианта в этнической группе составляет 4% [10, 11].

Выраженный клинико-генетический полиморфизм и нередко нетипичная клиническая картина вносят дополнительные сложности в процесс верификации забо-

левания. Часто методы ПЦР-диагностики оказываются неинформативными [12, 13]. Таким образом, особенности генетической природы болезни обуславливают необходимость внедрения в диагностический процесс метода секвенирования нового поколения (NGS) для ускорения поиска каузативных вариантов в большом количестве генов, ответственных за развитие клинически сходных форм заболевания, у пациентов с подозрением на дисферлинопатию [12-15].

Цель исследования: определить эффективность выявления вариантов нуклеотидных последовательностей в гене *DYSF* методом NGS у пациентов с клиническим диагнозом дифферлинопатия и оценить возможности данного метода в дифференциальной диагностике ПКМД.

Методы

Характеристика пациентов. Поиск генетических вариантов в гене *DYSF* производился у пациентов в случаях выявления фенотипа ПКМД с повышением уровня креатинфосфокиназы (КФК) в 10-100 раз и манифестации в возрасте 2-73 лет. Предположение о вероятном диагнозе дисферлинопатии также выдвигалось при наличии у пациентов фенотипа миопатии с преимущественным поражением задней и медиальной групп мышц бедер, сохранением ягодичных мышц и высокими значениями КФК.

Пациенты были включены в клиническое исследование (NCT04824040) на основании добровольного информированного согласия после разъяснения потенциальной пользы и возможных рисков. Показания к генетической диагностике были определены врачом-неврологом и врачом-генетиком после сбора анамнеза, составления генеалогической карты, клинического, лабораторного (определение уровня активности сывороточной КФК, миоглобина), инструментального (МРТ мышц, игольчатая ЭМГ), а в ряде случаев и патоморфологического исследований.

Всего в исследование было включено 157 пациентов. У 27 из них выявлены изменения в последовательности гена *DYSF*. Методом Сэнгера было обследовано 9 из 27 человек – 34(14-58)%¹, включая родственников и пробандов, вероятно имеющих эндемичный вариант измененной нуклеотидной последовательности гена *DYSF*. 18 из 27 пациентов – 67(42-86)% обследованы методом NGS. У 4 больных – 15(4-34)% обследо-

¹Здесь и далее в скобках приведены доверительные интервалы полученных значений.

ние методом NGS было выполнено в связи с неэффективностью ранее произведенных таргетных генетических исследований, реализованных секвенированием по методу Сэнгера. У 2 родственных пациентов, у которых был выявлен только один вариант измененной последовательности гена *DYSF*, для поиска крупных делеций и (или) дупликаций была проведена мультиплексная лигаза-зависимая амплификация (MLPA).

Выделение ДНК из клеток крови осуществлялось с использованием наборов для выделения нуклеиновых кислот «innuPREP Blood DNA kit» (AnalytikJena, Германия) и «QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit» (QIAGEN, Германия) на приборе QIAcube (QIAGEN, Германия). ДНК (1500 нг на образец) дробили до 150 нк при помощи системы Covaris (Thermo Fisher Scientific, США), после чего готовили библиотеки с использованием «SureSelect Human All Exon V7 kit» (Agilent, США) согласно протоколу производителя. Валидация библиотеки приводилась на приборе TapeStation 4200 (Agilent, США). Секвенирование экзона проводили на системе NovaSeq6000 (Illumina, США) методом парно-концевых чтений, с длиной прочтений в 100 нуклеотидов со средним покрытием не ниже 70×.

При помощи программного модуля SEQPURGE (США) была проведена очистка сырых данных и удалены последовательности адаптеров. Затем прочтения выравнивались на референсный геном человека hg19 с помощью программного модуля BWA-MEM (США). Фильтрацию оптических и ПЦР дубликатов проводили, используя модуль SAMBLASTER (США); локальную оптимизацию выравниваний – модуль ABRA2. Обнаружение вариантов и их фильтрацию согласно качеству проводили с использованием пакета FREEBAYES (США), аннотирование вариантов – модуля ENSEMBL-VEP (Великобритания).

При поиске клинически значимых генетических вариантов не учитывались не отмеченные в базе данных ClinVar [7] как патогенные, а также варианты, от-

меченные как патогенные с максимальной частотой встречаемости в популяциях менее 2%. Классификация вариантов проводилась в соответствии с рекомендациями Американской коллегии медицинской генетики и геномики (ACMG) [16].

Выявленные генетические варианты верифицировались референтным методом – ПЦР (табл. 1).

В первом раунде ПЦР использовали полимеразу BETAQ-1000 Bullseye Taq DNA Polymerase (MidSci, США). Далее ПЦР-продукты разгоняли в 2,5% агарозном геле и визуализировали под ультрафиолетом. Реакцию секвенирования проводили с использованием набора BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific, США) и амплификационных праймеров. Капиллярный электрофорез проводился на приборе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

При обнаружении только одного варианта измененной последовательности гена *DYSF* для поиска крупных делеций и (или) дупликаций была проведена MLPA с использованием набора P268-A3 *DYSF*-v01 (MRC-Holland BV, Нидерланды), который включает в себя 40 из 55 экзонов гена *DYSF*.

Гистологическое и иммуногистологическое исследование. Прижизненное патологоанатомическое исследование (инвазивное исследование) было выполнено четырьмя пациентам с неоднозначными результатами молекулярно-генетического анализа с целью дифференциальной диагностики и подтверждения морфофункциональной значимости выявленных генетических вариантов. В качестве материала забран фрагмент (5 мм³) латеральной головки четырехглавой мышцы бедра. Материал фиксировался и проводился или по рутинной «парафиновой» методике или с сохранением биоптата в жидком азоте с последующей криотомией. Парафиновые срезы изготавливались по стандартной методике, препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Изучали продольные и поперечные

Таблица 1. Праймеры для гена *DYSF*, использованные для проверки и подтверждения выявленных генетических вариантов.

Table 1. Primers for the *DYSF* gene used to test and confirm the identified genetic variants.

Генетический вариант, hg19	Праймеры F	Праймер R	Длина ПЦР продукта, нк
chr2:g.71795437del	GACTAAGTTGGCCCTTGTTG	TCAGTCCTGCGAGAGTTCA	308
chr2:g.71891537G>T	CCCAAGGAAAGAAGACTCC	TTGTCAGAGAAGCAGGCA	315
chr2:g.71839803dup	GCTGTGGGGATTATCTGC	CTTCTCATTCAGGTCTCCGT	389
chr2:g.71906303C>T	ACAGCCAAGAAGTGCTCCT	ACAGGTCACTATTAAGCCAATG	419
chr2:g.71780319G>A	ATCGGGAAGTACGGGAAC	CTGGCTGACTCCTTGAATG	344

срезы. Иммуногистохимическое исследование выполнено с применением антител к дисферлину (Anti-Dysferlin antibody, Abcam, Великобритания).

Статистический анализ. Анализ результатов проведен с использованием инструментов описательной и аналитической статистики в программе Past (версия 4.09, Норвегия), LePAC (версия 2.20.6, Франция). Для сравнения двух независимых выборок использован критерий Манна–Уитни, для анализа корреляций – ранговый коэффициент корреляции Пирсона. При проверке статистических гипотез ориентировались на p -значения и 95% доверительные интервалы (ДИ). Для графического представления данных использовалась программа GraphPadPrism (версия 6.01., США).

Результаты

Средний возраст манифестации дисферлинопатий составлял 17,6(14–20) лет, а средний возраст обследования составил 31(26–36) год.

В ходе проведения клинико-генетического сопоставления в 11 случаях заболевания (41(20–65)%) выявлен дистальный фенотип – миопатии Миоши, а в 12 случаях – 45(22–68)%, определен фенотип ПКМД тип R2 (2В). Кроме того, у трех пациентов, составляющих 11(0–33)% от общего числа пациентов, выявлен проксимо-дистальный фенотип. Наиболее редко встречающийся врожденный вариант фенотипа был обнаружен у одного пациента 24 лет – 4(0–21)% с компаунд-гетерозиготным изменением в гене *DYSF*, представленным однонуклеотидными делециями в экзонах 12 и 45.

Средний возраст манифестации составил 17,8 (16–19) года у пациентов с фенотипами миопатии Миоши и 18 (14–22) лет у пациентов с ПКМД. Таким образом, показатель возраста манифестации у пациентов с разными фенотипами статистически значимо не различался (критерий Манна–Уитни, $p = 0,89$). По уровню повышения КФК фенотипы миопатии Миоши и ПКМД 2В также статистически значимо не различались – 12793 Ед/л (6293 – 209712 Ед/л) и 8154 Ед/л (2589 – 14755 Ед/л), соответственно (критерий Манна–Уитни, $p = 0,45$).

При сравнении группы пациентов, имеющих гомозиготный вариант с.2833del, с остальными пациентами по возрасту манифестации, уровню КФК и оценкам функционального класса по шкалам Виньоса, ГМВ и Скотта статистически значимых различий не выявлено (критерий Манна–Уитни, $p > 0,05$).

Иммуногистохимическое исследование биоптатов у четырех пациентов позволило подтвердить миопатический паттерн поражения с отсутствием экспрессии дисферлина в мышцах.

Методами NGS, MLPA и секвенирования по Сэнгеру [13, 14] в гене *DYSF* был выявлен 21 различный генетический вариант у 27 больных (табл. 2), 16 из них относятся к категории ранее описанных патогенных, вероятно патогенных и вариантов с неизвестной клинической значимостью. В четверти случаев (5) – 25(0–52)% генетические варианты являются ранее не описанными (novel).

В одном случае при выявлении гетерозиготного миссенс варианта в гене *DYSF* не удалось обнаружить изменение во втором аллеле методом MLPA, несмотря на отсутствие экспрессии белка дисферлина при иммуногистохимическом исследовании биоптата мышцы.

У 27 пациентов методами NGS и секвенирования по методу Сэнгера, выявлено 18 – 67(42–86)% генетических вариантов, встречаемых однократно или же неоднократно, но среди родственных пациентов. Три варианта – 12(0–33)% (с.2833del, с.4941del, с.4282C>T) обнаружены неоднократно, в нескольких неродственных семьях. Методом MLPA у 2 – 8(0–27)% родственных пациентов выявлена крупная делеция, затрагивающая экзоны 41 и 42 гена *DYSF*.

Генетические варианты в гомозиготном состоянии выявлены у 16 пациентов – 59(35–81)% (у 7 пациентов – методом NGS и 9 – секвенированием по методу Сэнгера); компаунд-гетерозиготный вариант найден у 8 пациентов – 30(12–54)%, еще у трех пациентов – 12(0–33)% выявлен только один гетерозиготный генетический вариант (рис. 1а).

Выявлены генетические варианты следующих типов (рис. 1б):

- фреймшифт (с небольшими инсерциями и делециями, приводящими к сдвигу рамки считывания) – у 18 пациентов – 67(42–86)%;

- однонуклеотидные замены, приводящие к замене аминокислоты (генетические варианты по типу миссенс) представлены у семи обследованных пациентов – 26(0–50)%;

- точечные замены, приводящие к появлению преждевременной терминации трансляции белка (генетические варианты у типа нонсенс) выявлены у пяти пациентов – 19(0–42) %;

- однонуклеотидные замены в регионах сплайсинга обнаружены у четырех обследованных пациентов – 15(0–37)%;

- крупные делеции экзонов 41 и 42 обнаружены у двух пациентов – 8(0–27)%.

Таблица 2. Характеристика выявленных вариантов гена *DYSF* (hg19)Table 2. Characteristics of the identified variants of the *DYSF* gene (hg19)

№ п/п	Эк-зон	Изменение ДНК	Изменение кДНК	Изменение белка	Тип варианта	Зиготность	Класс патогенности	Ссылка на источник
1.	19	chr2:g.71778768T>C	c.1724T>C	p.Leu575Pro	Миссенс	Гомозигота	ВУС	База данных ClinVar [7]
2.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
3.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
4.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
5.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
6.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
7.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
8.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
9.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
10.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
11.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
12.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
13.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
14.	29	chr2:g.71797809C>T	c.3166C>T	p.Arg1056Ter	Нонсенс	Гомозигота	Пат.	K. Nguyen, et al., 2005 [18]
15.	11	chr2:g.71748001C>A	c.1116C>A	p.Ser372Arg	Миссенс	Гетерозигота	Пат.	K. Nguyen, et al., 2007 [19]
	44	chr2:g.71887719del	c.4941del	p.Lys1648ArgfsTer4	Фреймшифт		Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
16.	12	chr2:g.71748023del	c.1138del	p.Asp380ThrfsTer27	Фреймшифт	Гетерозигота	Вер. Пат.	База данных ClinVar [7]
	44	chr2:g.71887719del	c.4941del	p.Lys1648ArgfsTer4	Фреймшифт		Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
17.	18	chr2:g.71778294G>A	c.1692+8G>A	-	Нарушение сплайсинга	Гетерозигота	Вер. Пат.	База данных ClinVar [7]
	53	chr2:g.71908183G>A	c.6116G>A	p.Arg2039Gln	Миссенс		Вер. Пат.	M. Aoki, et al., 2001 [20]
18.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гетерозигота	Пат.	E.Harris et al., 2016 [17]
	41-42		del ex41,42 (MLPA)		Крупная делеция		Пат.	Вариант не описан
19.	41-42		del ex41,42 (MLPA)		Крупная делеция	Гетерозигота	Пат.	Вариант не описан
20.	39	chr2:g.71839803dup	c.4254dup	p.Ile1419HisfsTer8	Фреймшифт	Гетерозигота	Пат.	R.Cagliani et al., 2005 [21]
	-	chr2:g.71753478T>C	c.1276+2T>C	-	Нарушение сплайсинга		Пат.	Вариант не описан

Продолжение табл. 2 см. на стр. 9.

№ п/п	Эк-зон	Изменение ДНК	Изменение кДНК	Изменение белка	Тип варианта	Зиготность	Класс патогенности	Ссылка на источник
21.	39	chr2:g.71839831C>T	c.4282C>T	p.Gln1428Ter	Нонсенс	Гетерозигота	Пат.	База данных ClinVar [7]
22.	39	chr2:g.71839831C>T	c.4282C>T	p.Gln1428Ter	Нонсенс	Гетерозигота	Пат.	База данных ClinVar [7]
	43	chr2:g.71886125C>T	c.4873C>T	p.Arg1625Ter	Нонсенс		Пат	М. Aoki, et al., 2001 [20]
23.	8	chr2:g.71742844C>T	c.755C>T	p.Thr252Met	Миссенс	Гетерозигота	ВУС	М. Sacciotolo, 2011 [22]
	-	chr2:g.71780288A>G	c.1900A>G	p.Thr634Ala	Миссенс		Пат.	Вариант не описан
	44	chr2:g.71887717del	c.4822delG	p.Gly1608Glyfs	Фреймшифт		Вер. Пат.	К. Nguyen, et al., 2007 [19]
24.	45	chr2:g.71891537G>T	c.5143G>T	p.Ala1715Ser	Миссенс	Гетерозигота	ВУС	База данных ClinVar [7]
25.	46	g.71892311C>T	c.5194C>T	p.Arg1732Trp	Миссенс	Гомозигота	Пат.	М. Aoki, et al., 2001 [20]
26.	52	chr2:g.71906303C>T	c.6001C>T	p.Gln2001Ter	Нонсенс	Гетерозигота	Пат	S.Q. Jin, et al., 2016 [23]
	-	chr2:g.71780319G>A	c.1984+1G>A	-	Нарушение сплайсинга		Вер. Пат.	Вариант не описан
27.	-	chr2:g.71748039G>C	c.1149+5G>C	-	Нарушение сплайсинга	Гомозигота	ВУС	Вариант не описан

Примечания: Пат. – патогенный вариант; Вер. Пат. – вероятно патогенный вариант; ВУС - вариант неопределенного (или неизвестного) значения.

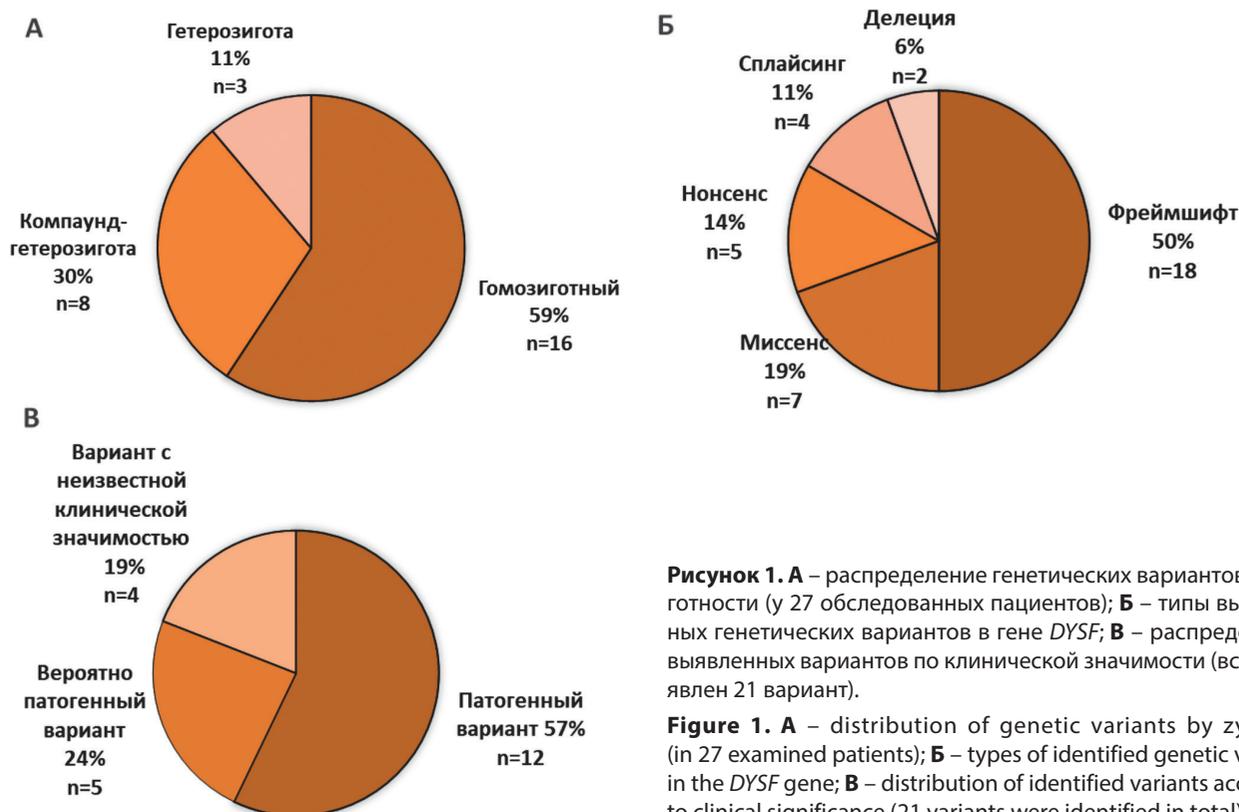


Рисунок 1. А – распределение генетических вариантов по зиготности (у 27 обследованных пациентов); **Б** – типы выявленных генетических вариантов в гене *DYSF*; **В** – распределение выявленных вариантов по клинической значимости (всего выявлен 21 вариант).

Figure 1. А – distribution of genetic variants by zygosity (in 27 examined patients); **Б** – types of identified genetic variants in the *DYSF* gene; **В** – distribution of identified variants according to clinical significance (21 variants were identified in total).

Среди 21 выявленного варианта генетической последовательности нуклеотидов на основании критериев ACMG [16] 12 – 57(31-81)% вариантов были классифицированы как патогенные, 5 – 25(0-51)% – как вероятно патогенные, 4 – 20(0-46)% – как варианты с неизвестной клинической значимостью (рис. 1в).

Обсуждение

Изменение последовательности нуклеотидов в гене *DYSF* в гомозиготной или компаунд-гетерозиготной формах может приводить к тяжелым клиническим проявлениям дефицита дисферлина. Генетические варианты с нуклеотидными заменами или делециями/инсерциями встречаются гораздо чаще (у 92,5% пациентов), чем крупные делеции и дубликации регионов гена *DYSF*, что соответствует результатам других исследовательских групп [5].

При сравнении группы пациентов, имеющих гомозиготный вариант, с остальными пациентами по возрасту манифестации, уровню КФК и оценкам функционального класса статистически значимых различий выявлено не было. Однако по данным некоторых исследователей пациенты с компаунд-гетерозиготными вариантами часто имеют более выраженный дефицит дисферлина, но клинические проявления средней степени тяжести [3].

Средний возраст манифестации составил 17,8 (16-19) лет у пациентов с фенотипами миопатии Миоши и 18 (14-22) лет у пациентов с клинической картиной ПКМД, что соответствует данным, полученным другими авторами [3, 9]. Однако средний возраст обследования составил 31 (26-36) год, что говорит о неэффективности ранее проводимого в данной группе пациентов диагностического процесса.

У 3 пациентов выявлен только 1 измененный генетический вариант последовательности нуклеотидов в гене *DYSF* в гетерозиготном состоянии, им было произведено иммуногистохимическое исследование биоптатов мышц для подтверждения диагноза. Выявлено отсутствие белка-дисферлина во всех случаях, что позволило установить диагноз дисферлинопатия.

Метод NGS позволяет эффективнее выявлять изменения в гене *DYSF* и сокращать длительность обследования пациентов и сроки установления точного диагноза.

Секвенирование по Сэнгеру и MLPA используются у пациентов с дисферлинопатией для подтверждения диагноза [14, 15]. Отсутствие дисферлина, зарегистрированное при иммуногистохимическом исследовании,

также позволяет подтвердить, что причиной клинических проявлений у данных пациентов является дефицит белка в скелетной мускулатуре.

Таким образом, диагностика дисферлинопатий остается актуальной проблемой, требующей комплексного подхода и внедрения в диагностический процесс новых высокотехнологичных методов, таких как NGS.

Литература

1. Чернова О.Н., Мавликеев М.О., Зейналова А.К. с соавт. Репаративный рабдомиоглиогенез у мышцей, мутантных по гену *DYSF*. *Гены и клетки* 2019; 14(2): 32-39.
2. Царгуш В.А., Бардаков С.Н., Багненко С.С. с соавт. Магнитно-резонансный паттерн изменений мышц тазового пояса и нижних конечностей у пациентов с дисферлинопатиями. *Лучевая диагностика и терапия* 2020; 11(1): 93-105.
3. Guglieri M., Magri F., D'Angelo M.G. et al. Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Hum Mutat.* 2008; 29(2): 258–266.
4. Бардаков С.Н., Емелин А.М., Никитин С.С., и др. Причины ложной диагностики полимиозита у пациентов с дисферлинопатией: клинический случай. *Нервно-мышечные болезни.* 2022;12(4):73-87.
5. Bushby K.M. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain.* 1999;122(8):1403–1420.
6. Diers A., Carl M., Stoltenburg-Didinger G. et al. Painful enlargement of the calf muscles in limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B) with a novel compound heterozygous mutation in *DYSF*. *Neuromuscular Disorders.* 2007;17(2):157–162.
7. Landrum M.J., Lee J.M., Benson M. et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018.
8. Vilchez J.J., Gallano P., Gallardo E. et al. Identification of a Novel Founder Mutation in the *DYSF* Gene Causing Clinical Variability in the Spanish Population. *Archives of Neurology.* 2005;62(8):1256.
9. Cagliani R., Fortunato F., Giorda R. et al. Molecular analysis of LGMD-2B and MM patients: identification of novel *DYSF* mutations and possible founder effect in the Italian population. *Neuromuscular Disorders.* 2003;13(10):788–795.
10. Leshinsky-Silver E., Argov Z., Rozenboim L. et al. Dysferlinopathy in the Jews of the Caucasus: A frequent mutation in the dysferlin gene. *Neuromuscular Disorders.* 2007;17(11-12):950–954.
11. Illarioshkin S.N., Ivanova-Smolenskaya I.A., Greenberg C.R. et al. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2b and distal myopathy. *Neurology.* 2000;55(12):1931–1933.
12. Коновалов Ф.А., Федотов В.П., Умаханова З.Р. и соавт. Молекулярная диагностика наследственных миопатий методом полноэкзомного секвенирования. *Медицинская генетика.* 2015;14(3):18-19
13. Ampleeva M., Tolmacheva E., Komarkov I. et al. NGS-based testing in diagnostics of hereditary neuro-muscular disorders: observations on a large cohort from a clinical bioinformatician's perspective. *Eur J Hum Genet.* 2020. <https://www.nature.com/articles/s41431-020-00739-z>.
14. Шаркова И.В., Дадали Е.Л. Клинико-генетические характеристики и алгоритм дифференциальной диагностики прогрессирующих мышечных дистрофий, манифестирующих после периода нормального моторного развития. *Нервно-мышечные болезни.* 2023;13(1):44-51.

15. Шагина О.А., Рыжкова О.П., Чухрова А.Л., и др. Применение экзомного секвенирования для диагностики наследственных моторно-сенсорных нейропатий. Нервно-мышечные болезни 2020;10(4):12-26.
16. Miller D.T., Lee K., Abul-Husn N.S., et al. ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2022;24(7):1407-1414.
17. Harris E., Bladen C.L., Mayhew A. et al. The Clinical Outcome Study for dysferlinopathy: An international multicenter study. Neurol Genet. 2016;2(4):89.
18. Nguyen K., Bassez G., Bernard R. et al. Dysferlin mutations in LGMD2B, Miyoshi myopathy, and atypical dysferlinopathies. Hum Mutat. 2005;26:165.
19. Nguyen K., Bassez G., Krahn M. et al. 2. Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. Arch Neurol. 2007;64(8):1176–1182.
20. Aoki M., Liu J., Richard I. et al. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. Neurology. 2001;57(2):271-278.
21. Cagliani R., Magri F., Toscano A. et al. Mutation finding in patients with dysferlin deficiency and role of the dysferlin interacting proteins annexin A1 and A2 in muscular dystrophies. Hum Mutat. 2005;26(3):283.
22. Cacciottolo M., Numitone G., Aurino S. et al. Muscular dystrophy with marked Dysferlin deficiency is consistently caused by primary dysferlin gene mutations. European Journal of Human Genetics. 2011;19(9):974–980.
23. Jin S.Q., Yu M., Zhang W. et al. Dysferlin Gene Mutation Spectrum in a Large Cohort of Chinese Patients with Dysferlinopathy. Chin Med J (Engl). 2016;129(19):2287-2293.
8. Vilchez J.J., Gallano P., Gallardo E. et al. Identification of a Novel Founder Mutation in the DYSF Gene Causing Clinical Variability in the Spanish Population. Archives of Neurology. 2005;62(8):1256.
9. Cagliani R., Fortunato F., Giorda R. et al. Molecular analysis of LGMD-2B and MM patients: identification of novel DYSF mutations and possible founder effect in the Italian population. Neuromuscular Disorders. 2003;13(10):788–795.
10. Leshinsky-Silver E., Argov Z., Rozenboim L. et al. Dysferlinopathy in the Jews of the Caucasus: A frequent mutation in the dysferlin gene. Neuromuscular Disorders. 2007;17(11-12):950–954.
11. Illarioshkin S.N., Ivanova-Smolenskaya I.A., Greenberg C.R. et al. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2b and distal myopathy. Neurology. 2000;55(12):1931–1933.
12. Konovalov F.A., Fedotov V.P., Umakhanova Z.R. et al. Molekulyarnaya diagnostika nasledstvennykh miopatiy metodom polnoekzomnogo sekvenirovaniya [Molecular diagnostics of hereditary myopathies by full-exome sequencing]. Meditsinskaya Genetika [Medical Genetics]. 2015;14(3):18-19. (In Russ.)
13. Ampleeva M., Tolmacheva E., Komarkov I. et al. NGS-based testing in diagnostics of hereditary neuro-muscular disorders: observations on a large cohort from a clinical bioinformatician's perspective. Eur J Hum Genet. 2020. <https://www.nature.com/articles/s41431-020-00739-z>.
14. Sharkova I.V., Dadali E.L. Kliniko-geneticheskiye kharakteristiki i algoritm differentsial'noy diagnostiki progressivnykh myshchnykh distrofiy, manifestiruyushchikh posle perioda normal'nogo motornogo razvitiya [Clinical and genetic characteristics and an algorithm for the differential diagnosis of progressive muscular dystrophies that manifest after a period of normal motor development]. Nervno-myshechnyye bolezni [Neuromuscular Diseases]. 2023;13(1):44-51. (In Russ.)
15. Shchagina O.A., Ryzhkova O.P., Chukhrova A.L., et al. Primeneniye ekzomnogo sekvenirovaniya dlya diagnostiki nasledstvennykh motorno-sensornykh neyropatiy [Diagnostic utility of exome sequencing for inherited peripheral neuropathies]. Nervno-myshechnyye bolezni [Neuromuscular Diseases]. 2020;10(4):12-26. (In Russ.)
16. Miller D.T., Lee K., Abul-Husn N.S., et al. ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2022;24(7):1407-1414.
17. Harris E., Bladen C.L., Mayhew A. et al. The Clinical Outcome Study for dysferlinopathy: An international multicenter study. Neurol Genet. 2016;2(4):89.
18. Nguyen K., Bassez G., Bernard R. et al. Dysferlin mutations in LGMD2B, Miyoshi myopathy, and atypical dysferlinopathies. Hum Mutat. 2005;26:165.
19. Nguyen K., Bassez G., Krahn M. et al. 2. Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. Arch Neurol. 2007;64(8):1176–1182.
20. Aoki M., Liu J., Richard I. et al. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. Neurology. 2001;57(2):271-278.
21. Cagliani R., Magri F., Toscano A. et al. Mutation finding in patients with dysferlin deficiency and role of the dysferlin interacting proteins annexin A1 and A2 in muscular dystrophies. Hum Mutat. 2005;26(3):283.
22. Cacciottolo M., Numitone G., Aurino S. et al. Muscular dystrophy with marked Dysferlin deficiency is consistently caused by primary dysferlin gene mutations. European Journal of Human Genetics. 2011;19(9):974–980.
23. Jin S.Q., Yu M., Zhang W. et al. Dysferlin Gene Mutation Spectrum in a Large Cohort of Chinese Patients with Dysferlinopathy. Chin Med J (Engl). 2016;129(19):2287-2293.

References

1. Chernova O.N., Mavlikeev M.O., Zeynalova A.K., et al. Reparativnyy rhabdomyogenez u myshy, mutantnykh po genu DYSF [Reparative rhabdomyogenesis in mice with DYSF mutation]. Geny i kletki [Genes and cells]. 2019;14(2):32-39. (In Russ.)
2. Tsargush V.A., Bardakov S.N., Bagnenko S.S. et al. Magnitno-rezonansnyy pattern izmeneniy myshits tazovogo poyasa i nizhnikh konechnostey u patsiyentov s disferlinopatiyami [MRI pattern changes in pelvic muscle and lower limb in patients with dysferlinopathy]. Luchevaya diagnostika i terapiya [Diagnostic radiology and radiotherapy]. 2020;11(1):93-105. (In Russ.)
3. Guglieri M., Magri F., D'Angelo M.G. et al. Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. Hum Mutat. 2008;29(2):258–266.
4. Bardakov S.N., Emelin A.M., Nikitin S.S., et al. Prichiny lozhnoy diagnostiki polimiozita u patsiyentov s disferlinopatiyey: klinicheskiy sluchay [Reasons for misdiagnosis of polymyositis in patients with dysferlinopathy: a clinical case]. Nervno-myshechnyye bolezni [Neuromuscular Diseases]. 2022;12(4):73-87. (In Russ.)
5. Bushby K.M. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. Brain. 1999;122(8):1403–1420.
6. Diers A., Carl M., Stoltenburg-Didinger G. et al. Painful enlargement of the calf muscles in limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B) with a novel compound heterozygous mutation in DYSF. Neuromuscular Disorders. 2007;17(2):157–162.
7. Landrum M.J., Lee J.M., Benson M. et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. Nucleic Acids Res. 2018.

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.06.12-23>

Груз наследственных болезней органа зрения в различных популяциях и этнических группах европейской части Российской Федерации

Кадышев В.В.¹, Гинтер Е.К.¹, Куцев С.И.¹, Кириллова М.О.¹, Зинченко Р.А.^{1,2}

1 – ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

2 – ФГБНУ «Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья имени Н.А. Семашко»
105064, г. Москва, ул. Воронцово поле, д. 12, стр. 1

Цель: оценить груз изолированных и синдромальных форм наследственной патологии органа зрения (НПОЗ) в ряде популяций и этнических групп европейской части РФ.

Методы. Всего было обследовано 3 195 054 человек (17 популяций, 12 этнических групп), проживающих в 14 регионах европейской части РФ. Семьи осмотрены врачами различного профиля, специализирующимися на наследственной патологии. Всем пациентам проведены клинические, генеалогические, лабораторные, стандартные и специальные офтальмологические, а также молекулярно-генетические исследования. По показаниям выполняли периметрию, оптическую когерентную томографию и электрофизиологические исследования. Для молекулярно-генетического анализа использованы прямое секвенирование по Сэнгеру, MLPA, RFLP, AFLP, полноэкзомное секвенирование.

Результаты. Среди всех больных доля пациентов с изолированными формами НПОЗ составила 49% (1458 человек), синдромальными – 51% (1539 человек). Преобладающим типом наследования является аутосомно-доминантный (АД). Распространенность изолированных форм НПОЗ составляет в среднем 1:2196 человек, синдромальных – 1:2076, суммарная распространенность всех форм НПОЗ составила 1:1066 человек. Распространенность НПОЗ среди русского населения (1:1479 человек) более, чем в 2 раза ниже, чем в этнических популяциях европейской части РФ (1: 778 человек). Выявлены достоверные различия по распространенности заболеваний со всеми типам наследования и общей отягощенности для изолированных НПОЗ (АД-И $\chi^2=56,51$; АР-И $\chi^2=11,79$; Х-сцепленный-И $\chi^2=28,58$; Общий-И $\chi^2=84,92$; $p \leq 0,05$; D.f.=1). При сравнении синдромальных форм наибольшие различия отмечены для суммарного груза (АД-Сум $\chi^2_{16}=56,51$; АР-Сум $\chi^2=11,79$; ХР-Сум $\chi^2=28,58$; Общий-Сум $\chi^2=84,92$; $p \leq 0,05$; D.f.=1).

Заключение: проведенное исследование указывает на наличие вариабельности груза НПОЗ между популяциями и этническими группами европейской части РФ.

Ключевые слова: офтальмогенетика, груз наследственной офтальмопатологии, синдромальная офтальмопатология, изолированная офтальмопатология, эпидемиология.

Для цитирования: Кадышев В.В., Гинтер Е.К., Куцев С.И., Кириллова М.О., Зинченко Р.А. Груз наследственных болезней органа зрения в различных популяциях и этнических группах европейской части Российской Федерации. *Медицинская генетика* 2023; 22(6): 12-23.

Автор для корреспонденции: Кадышев Виталий Викторович; e-mail: vvh.kad@gmail.com

Финансирование. Государственное задание Министерства науки и высшего образования для ФГБНУ МГНЦ.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 01.06.2023

The burden of hereditary diseases of the visual organ in various populations and ethnic groups of the European part of the Russian Federation

Kadyshev V.V.¹, Ginter E.K.¹, Kutsev S.I.¹, Kirillova M.O.¹, Zinchenko R.A.^{1,2}

1 – Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

2 – N.A. Semashko National Research Institute of Public Health
12, bldg. 1, Vorontsovo pole st., Moscow, 105064, Russian Federation

Objective: to assess the burden of isolated and syndromic forms of hereditary pathology of the organ of vision (HPOV) in a number of populations and ethnic groups of the European part of the Russian Federation.

Methods. A total of 3,195,054 people (17 populations (12 ethnic groups) living in 14 regions of the European part of the Russian Federation) were examined. The families were examined by doctors of various profiles specializing in hereditary pathology. All patients underwent clinical, genealogical, laboratory, standard and special ophthalmological, as well as molecular genetic studies. According to the indications, perimetry, optical coherence tomography and electrophysiological studies were performed. The methods of molecular

genetic analysis used included direct Sanger sequencing, MLPA, RFLP, AFLP, and full-exome sequencing. A comparative analysis of cargo between populations was carried out using the χ^2 test and the Student's t-test.

Results. Among all patients, the proportion of patients with isolated forms of HPOV was 49% (1458 patients), syndromic – 51% (1539 patients). The predominant type of inheritance is autosomal dominant (AD). The prevalence of isolated forms of pathology of the organ of vision is on average 1:2196 people, syndromic – 1:2076, the total prevalence of all forms of hereditary ophthalmopathy was 1:1066 people. The prevalence of HPOV among the Russian population (1:1,479 people) is more than 2 times lower than in the ethnic populations of the European part of the Russian Federation (1: 778 people). Significant differences were revealed in all types of inheritance and general burden for isolated HPOV (AD-I $\chi^2=56.51$; autosomal recessive (AR)-I $\chi^2=11.79$; X-linked-I $\chi^2=28.58$; Total-I $\chi^2=84.92$; $p \leq 0.05$; D.f.=1). When comparing the syndromic forms, the greatest differences were noted for the total load (AD-Sum $\chi^2_{16}=56.51$; AR-Sum $\chi^2=11.79$; XR- Sum $\chi^2=28.58$; Total- Sum $\chi^2=84.92$; $p \leq 0.05$; D.F.=1).

Conclusion. The study indicates the presence of variability in the cargo of NPOs between populations and ethnic groups of the European part of the Russian Federation.

Keywords: genetics, ophthalmology, ophthalmogenetics, the burden of hereditary ophthalmopathy, syndromic ophthalmopathy, isolated ophthalmopathy, epidemiology.

For citation: Kadyshhev V.V., Ginter E.K., Kutsev S.I., Kirillova M.O., Zinchenko R.A. The burden of hereditary diseases of the visual organ in various populations and ethnic groups of the European part of the Russian Federation. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(6): 12-23. (In Russ.)

Corresponding author: Kadyshhev V.V.; e-mail vvh.kad@gmail.com

Funding. The work was supported by the state task of the Ministry of Science and Higher Education for Research Centre for Medical Genetics.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Accepted: 01.06.2023

Введение

В последнее время в связи с улучшением диагностических возможностей и выявления большого количества нозологических форм, подтверждённых молекулярно-генетическими методами, проблема груза наследственных болезней в популяциях человека, приобретает все большее значение, однако остается недостаточно изученной. Э. Мерфи и Г. Чейз [1979] справедливо отметили: «... груз существует как реальность, даже если современная наука не может пока его измерить».

Одной из важных задач медико-генетической эпидемиологии является изучение причин дифференциации популяций по грузу и разнообразию наследственных заболеваний. Более 40 лет лаборатория генетической эпидемиологии проводит исследования российских популяций, целью которых является как установление генетической дифференциации между отдельными российскими популяциями и этническими группами по грузу и спектру менделирующих болезней, так и выявление факторов популяционной динамики и степени их влияния на обнаруженную дифференциацию. Для данных изысканий был разработан протокол генетико-эпидемиологических исследований, принципиально важным моментом которого являлось сохранение на протяжении длительного времени единых методов обследования пациентов и об-

работки материала, которые позволили бы проводить корректное сравнение полученных данных [1, 3].

За прошедший период обследовано около 4 млн населения из 14 регионов европейской части РФ, представителей 12 этнических групп: русских из Кировской, Костромской, Тверской, Брянской, Ростовской областей и Краснодарского края, татар из Республики Татарстан, башкир из Республики Татарстан, марийцев из Республики Башкортостан, чувашей из Чувашской Республики, удмуртов из Удмуртской Республики, осетин из Республики Северная Осетия Алания (РСОА), адыгейцев из Республики Адыгея, абазин, черкесов, ногайцев и карачаевцев из Республики Карачаево-Черкесия (КЧР) [4-11].

Результаты, полученные при медико-генетическом обследовании популяций, анализировались для оценки суммарного груза наследственной патологии, выявления частых и редких заболеваний, а также очагов накопления отдельных нозологических форм в конкретных популяциях или этнических группах. Распределение больных по органному и системному типу заболеваний в соответствии с общепринятой медицинской классификацией показало, что изолированная наследственная патология органа зрения (НПОЗ) составляет существенную долю (до 15%) от всей выявленной наследственной патологии [9, 11]. НПОЗ вы-

явлены и при наследственных синдромах и болезнях. Суммарная распространенность НПОЗ высока и составляет около 1:1700–1:2450 человек [9, 11, 12].

Груз (или отягощенность) наследственных заболеваний является составной частью общего генетического груза популяций и вносит существенный вклад в заболеваемость, инвалидизацию населения. Оценка отягощенности наследственной патологией в целом и зрительного аппарата в отдельности в популяциях человека дает представление не только о количественных характеристиках ее суммарной распространенности, но и позволяет оценить структуру отягощенности населения с учетом различных типов наследования, особенностей территориального распространения заболевания. Изучение наследственной офтальмопатологии в отдельных регионах и определение специфического груза и спектра позволяют ориентировать региональные органы здравоохранения на частые и «проблемные» заболевания, определить потребность в медико-генетическом консультировании [13–15].

Цель: оценить груз НПОЗ (изолированных и входящих в состав наследственных синдромов и болезней) в различных популяциях и этнических группах европейской части РФ.

Методы

Анализируемая выборка представлена 12 этническими группами, проживающими в 14 регионах европейской части РФ: русскими из 6 популяций РФ (Кировской, Костромской, Тверской, Брянской, Ростовской областей и Краснодарского края), представителями пяти этнических групп Поволжья (татарами из Республики Татарстан, башкирами из Республики Татарстан, марийцами из Республики Башкортостан, чувашами из Чувашской Республики, удмуртами из Удмуртской Республики) и шести народов Северного Кавказа (осетинами из РСОА, адыгейцами из Республики Адыгея, абазинами, черкесами, ногайцами и карачаевцами из КЧР). Проанализированы пациенты с изолированной и синдромальной наследственной офтальмопатологией.

Обследование населения проведено в период 1983–2021 гг. по разработанному в лаборатории генетической эпидемиологии протоколу комплексных генетико-эпидемиологических исследований, подробно описанному в ряде публикаций, который остается неизменным за все время работы, включая методы выявления пациентов и обработки материала [1, 2, 9, 11, 16]. Протокол позволяет выявлять в популяциях

максимально возможное число врожденных и наследственных заболеваний с поражением различных органов и систем: неврологические, офтальмологические болезни, генодерматозы, скелетные, наследственные синдромы, наследственные заболевания обмена веществ, крови, органа слуха и др.

Численность обследованного населения и этнический состав представлены в **табл. 1**. Обследовано все население независимо от пола и возраста. Для изучения НПОЗ отобраны пациенты с различными заболеваниями зрительного анализатора и составлен реестр выявленной в регионах изолированной и синдромальной офтальмопатологии для дальнейшего анализа [17]. После обследования всех пациентов верифицировано 554 клинически различных наследственных заболевания у 9979 больных.

Учитывая, что в анализ включено не все обследованное население, а только представители титульной нации регионов, расчет проведен на численность населения 3 195 054 человек.

Осмотр семей проведен в режиме консилиума группой врачей различного профиля, специализирующихся на наследственной патологии (генетик, педиатр, офтальмолог, невролог, психиатр, дерматолог, ортопед, отоларинголог, сурдолог). При постановке клинического диагноза кроме клинических, генеалогических, лабораторных методов обследования дополнительно использована документация с результатами инструментального обследования пациентов (МРТ, КТ, ЭЭГ, рентгенографии, миографии, биопсии и т.д.). Офтальмологическое обследование включало стандартные и специализированные офтальмологические исследования. Части больных по показаниям проводились периметрия, оптическая когерентная томография и электрофизиологические исследования (ЭФИ).

Учитывая возможную гетерогенность отдельных заболеваний, собранный материал подвергался комплексному сегрегационному анализу с учетом множественной регистрации семей для установления соответствия распределения больных и здоровых sibсов в ядерных семьях определенному типу наследования – доминантному (АД) и рецессивному (АР) [18, 19]. Подтверждающая молекулярно-генетическая диагностика проведена в лабораториях ФГБНУ «МГНЦ». Используются методы молекулярно-генетического анализа: прямое секвенирование по Сэнгеру, MLPA, RFLP, AFLP, полноэкзомное секвенирование.

Отягощенность населения НПОЗ рассчитана, как отношение реального числа больных с определенным типом наследования (АД или АР) к численности обследо-

ванного населения, и вычислялась по формуле: $f=n/N$, где n – число больных, N – численность популяции (на 10000). Отягощенность для X-сцепленной (X-сц.) патологии рассчитана на численность мужского населения [1]. Сравнительный анализ груза между популяциями проведен при помощи теста χ^2 , а в случае, если пациентов было менее 5 в группе, при помощи t-критерия Стьюдента ($p<0,05$) [20].

Пациенты предоставили письменное информированное согласие на участие в данном исследовании, осмотр, сбор анамнеза и биологического материала.

Результаты и обсуждение

В результате комплексного медико- и популяционно-генетического обследования 17 популяций/12 этнических групп из 14 регионов европейской части РФ и после проведения сегрегационного анализа выделено 2997 больных из 1985 семей с НПОЗ. В табл. 2 представлено число больных с изолированными и синдромальными формами (включая наследственные син-

дромы и болезни) НПОЗ с различными типами наследования в общей выборке.

Доля пациентов с изолированными формами НПОЗ среди всех больных в рассматриваемой выборке составила 49% (1458 больных), с синдромальными и входящими в состав клинической картины различных наследственных болезней – 51% (1539 больных) (рис. 1). Эти данные демонстрируют примерное равное соотношение больных с изолированными и синдромальными формами НПОЗ и необходимость вовлечения врачей различных специальностей в выявление и наблюдение за течением поражения глаз у пациентов с синдромальной патологией.

На рис. 2 представлено распределение больных с изолированными и синдромальными формами НПОЗ по типам наследования. Из рис. 2 следует, что для обеих групп характерно преобладание пациентов с АД типом наследования – 63,24% (922 больных) и 81,29% (1251 больных), соответственно, на втором месте АР заболевания – 30,45% (444 больных) и 17,48% (269 больных), соответственно. Меньше всего пациентов с X-сц.

Таблица 1. Численность и этнический состав обследованного населения субъектов РФ.

Table 1. The number and ethnicity of the populations of the Russian Federation included in the study.

Регион	Этнический состав	Численность обследованных (численность представителей титульной нации)
Русские различных регионов		
1. Костромская область	Русские (>90%) и др.	444 476
2. Кировская область	Русские (>90%) и др.	286 600
3. Краснодарский край	Русские (>90%) и др.	426 600
4. Ростовская область	Русские (>90%) и др.	497 460
5. Брянская область	Русские (>90%) и др.	88200
6. Тверская область	Русские (>90%) и др.	75 000
Полиэтнические популяции (Республики)		
7. Марий Эл	Марийцы, русские и др.	276 000 (171 571)
8. Чувашия	Чуваши, русские и др.	264 419 (178 722)
9. Удмуртия	Удмурты, русские и др.	267 655 (155 356)
10. Татарстан	Татары, русские и др.	264 098 (209 265)
11. Башкортостан	Башкиры, русские и др.	250 110 (173 765)
12. Адыгея	Адыгейцы, русские и др.	101 800 (65 000)
13. КЧР	Карачаевцы, черкесы, абазины, ногайцы, русские и др.	410 368 (162444, 50817, 32000, 14344 соответственно)
14. РСОА	Осетины, русские и др.	192 760 (162 308)
ИТОГО		3 845 546 (3 195 054)

наследованием – 6,31% (92 больных) и 1,23% (19 больных), соответственно.

Ранжирование всех больных по типам наследования заболевания из двух групп представлено на **рис. 3**. Как следует из гистограммы (рис. 3), при объединении двух групп пациентов число больных с АД типом наследования заболевания лидирует и составило 2173 (72,51%), число пациентов с АР типом наследования – 713 (23,79%), с Х-сц. типом наследования меньше всего пациентов – 111 (3,70%). Далее будет рассмотрен груз АД, АР и Х-сц. НПОЗ в отдельности для изолированных и синдромальных форм.

Отягощенность (груз) населения 17 популяций европейской части РФ НПОЗ

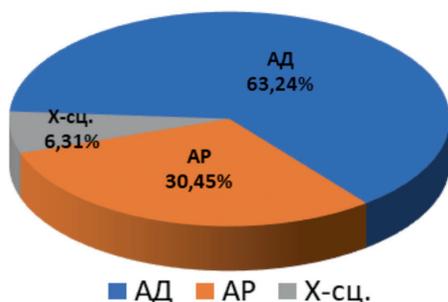
После сегрегационного анализа с целью подтверждения типов наследования заболеваний прове-



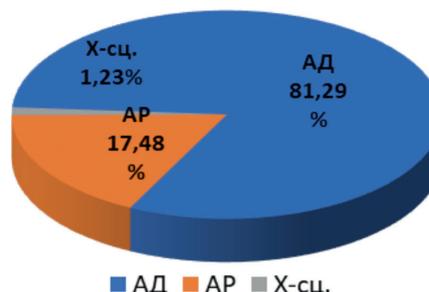
■ Изолированные ■ Синдромальные

Рисунок 1. Доля больных с изолированными и синдромальными формами среди всех НПОЗ в рассматриваемой выборке.

Figure 1. Proportion of isolated and syndromic forms of HPOV among all examined patients.



А. Изолированные формы НПОЗ



Б. Синдромальные формы НПОЗ

Рисунок 2. Распределения больных с изолированными и синдромальными формами НПОЗ по типам наследования

Figure 2. Distribution of patients with isolated and syndromic HPOV by type of inheritance

ден расчет груза АД, АР и Х-сц. НПОЗ в отдельности для изолированных и синдромальных форм. Всего в реестр выявленной в регионах изолированной и синдромальной офтальмопатологии включено 2997 больных, в том числе 1459 пациентов с изолированным поражением органа зрения и 1539 с синдромальными формами.

В **табл. 3** и на **рис. 4** представлен груз АД, АР и Х-сц. изолированных форм НПОЗ.

Значения груза изолированной НПОЗ с АД типом наследования варьировали от $0,26 \pm 0,186/10000$ в Тверской области до $5,51 \pm 1,041/10000$ у черкесов из КЧР ($t=4,96$). Средневзвешенное значение составило $2,89 \pm 0,095$.

Различия выявлены и при сравнении груза АР изолированной НПОЗ – от $0,57 \pm 0,253/10000$ в Брянской области до $3,49 \pm 0,986/10000$ у ногайцев из КЧР ($t=3,12$). Средневзвешенное значение изолированной НПОЗ с АР типом наследования составило $1,38 \pm 0,066/10000$. Значения отягощенности Х-сц. патологией колебались от 0 в 4-х популяциях до $2,79 \pm 1,972/10000$ мужчин у ногайцев из КЧР, достоверных различий не выявлено ($t=1,41$), средневзвешенное значение – $0,58 \pm 0,06/10000$ мужчин. Значения общего груза изолированной НПОЗ статистически достоверно различались по популяциям ($\chi^2_{17}=240,63$; $p \leq 0,05$; D.f.=16), средневзвешенное значение составило $4,85 \pm 0,012/10000$ (1:2196 человек).

Груз АД, АР, Х-сц. и общий для синдромальных форм НПОЗ представлен в **табл. 4** и на **рис. 4**.

Анализ значений отягощенности населения синдромальной НПОЗ с АД типом наследования показал так же, как и в случае с изолированной НПОЗ, неоднородность рассматриваемой выборки – значения варьировали в широких пределах от $0,91 \pm 0,321/10000$

в Тверской области до $12,55 \pm 2,956/10000$ у ногайцев КЧР ($t=3,91$). Средневзвешенное значение составило $3,92 \pm 0,112/10000$. Значения груза АР НПОЗ колебались от $0,31 \pm 0,312$ у абазин КЧР до $2,09 \pm 1,207/10000$

у ногайцев КЧР, однако статистически значимых различий не выявлено ($t=1,67$). Средневзвешенное значение отягощенности синдромальной НПОЗ с АР типом наследования составило $0,84 \pm 0,051/10000$. Значе-

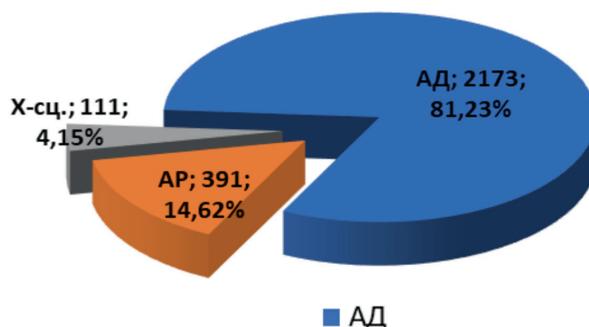


Рисунок 3. Доля больных с АД, АР и Х-сц. наследованием в общей выборке

Figure 3. Proportions of patients with AD, AR and X-linked inheritance in the total sample

Таблица 2. Число больных изолированными и синдромальными НПОЗ с различными типами наследования в 17 популяциях европейской части РФ

Table 2. The number of patients with isolated and syndromic HPOV with different types of inheritance in 17 populations of the European part of the Russian Federation

Популяция	Численность	Изолированные НПОЗ				Синдромальные НПОЗ				Суммарная по всем формам			
		АД	АР	Х-сц.	Общая	АД	АР	Х-сц.	Общая	АД	АР	Х-сц.	Общая
Осетины РСОА	162308	85	18	11	114	126	29	0	155	211	47	11	269
Ногайцы КЧР	14344	4	5	2	11	18	3	0	21	22	8	2	32
Карачаевцы КЧР	162444	51	32	5	88	87	21	0	108	138	53	5	196
Абазины КЧР	32000	12	2	0	14	30	1	0	31	42	3	0	45
Черкесы КЧР	50817	28	16	1	45	59	9	0	68	87	25	1	113
Адыгейцы Адыгеи	65000	8	12	5	25	41	12	0	53	49	24	5	78
Татары Татарстана	209265	113	35	10	158	136	31	4	171	249	66	14	329
Башкиры Башкортостана	173765	82	27	4	113	129	11	4	144	211	38	8	257
Удмурты Удмуртии	155356	63	21	16	100	76	15	1	92	139	36	17	192
Марийцы Марий Эл	171571	41	19	5	65	46	19	0	65	87	38	5	130
Чуваши Чувашии	178722	23	40	6	69	44	13	0	57	67	53	6	126
Ростовская область	497460	140	58	1	199	231	38	6	275	371	96	7	474
Костромская область	444476	85	51	0	136	59	16	1	76	144	67	1	212
Краснодарский край	426700	80	43	8	131	60	21	1	82	140	64	9	213
Кировская область	286616	82	53	18	153	94	20	2	116	176	73	20	269
Тверская область	76000	2	7	0	9	7	5	0	12	9	12	0	21
Брянская область	88210	23	5	0	28	8	5	0	13	31	10	0	41
Итого:	3195054	922	444	92	1458	1251	269	19	1539	2173	713	111	2997

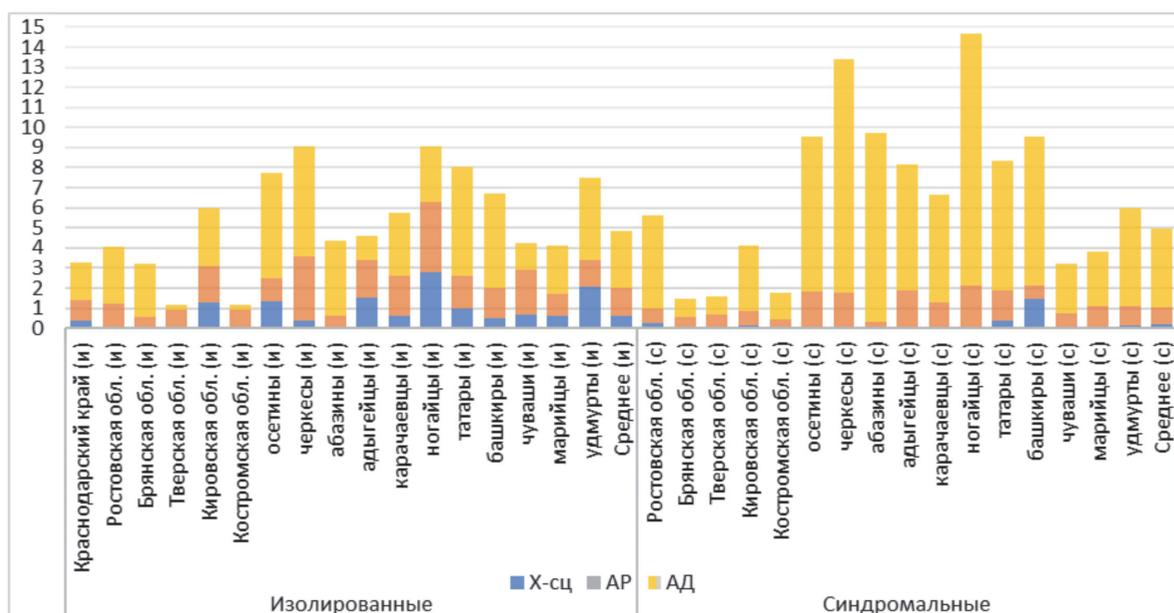


Рисунок 4. Отягощенность (на 10 000 чел.) изолированной и синдромальной НПОЗ в популяциях и этнических группах европейской части России.

Примечание: (с) – синдромальная НПОЗ; (и) – изолированная НПОЗ.

Figure 4. Prevalence (per 10,000) of isolated and syndromic HPOV in populations and ethnic groups of the European part of Russia.

Note: (c) syndromic HPOV; (i) isolated HPOV.

Таблица 3. Груз изолированной НПОЗ (на 10000 обследованных) в 17 популяциях

Table 3. Burden of isolated HPOV (per 10,000 examined) in 17 populations

Популяция	Численность	Груз на 10000 человек/мужчин*				Распр.
		АД	АР	Х-сц.*	Общий	
Изолированная наследственная офтальмопатология						
Осетины РСОА	162308	5,24±0,568	1,11±0,261	1,36±0,409	7,7±0,066	1:1423
Ногайцы КЧР	14344	2,79±1,394	3,49±0,986	2,79±1,972	6,97±0,197	1:1793
Карачаевцы КЧР	162444	3,14±0,44	1,97±0,348	0,62±0,275	5,73±0,058	1:1846
Абазины КЧР	32000	3,75±1,082	0,63±0,442	0	4,38±0,117	1:2286
Черкесы КЧР	50817	5,51±1,041	3,15±0,787	0,4±0,394	9,06±0,132	1:1129
Адыгейцы Адыгеи	65000	1,23±0,435	1,85±0,533	1,54±0,688	4,62±0,077	1:2600
Татары Татарстана	209265	5,4±0,508	1,67±0,283	0,96±0,302	8,03±0,06	1:1324
Башкиры Башкортостана	173765	4,72±0,521	1,55±0,299	0,46±0,23	6,73±0,061	1:1538
Удмурты Удмуртии	155356	4,06±0,511	1,35±0,295	2,06±0,515	7,47±0,064	1:1554
Марийцы Марий Эл	171571	2,39±0,373	1,11±0,254	0,58±0,261	4,08±0,047	1:2640
Чуваши Чувашии	178722	1,29±0,268	2,24±0,354	0,67±0,274	4,2±0,046	1:2590
Ростовская область	497460	2,81±0,238	1,17±0,153	0,04±0,04	4,02±0,028	1:2450
Костромская область	444476	1,91±0,207	1,15±0,161	0	3,06±0,026	1:3268
Краснодарский край	426700	1,87±0,21	1,01±0,154	0,38±0,133	3,255±0,027	1:3257
Кировская область	286616	2,86±0,316	1,85±0,254	1,26±0,296	5,97±0,043	1:1873
Тверская область	76000	0,26±0,186	0,92±0,348	0	1,18±0,039	1:8444
Брянская область	88210	2,61±0,544	0,57±0,253	0	3,18±0,06	1:3150
Средневзвешенное значение	3195054	2,89±0,095	1,38±0,066	0,58±0,06	4,85±0,012	1:2196

Примечание: Общий – суммарный груз, Распр. – суммарная распространенность.

ния груза X-сц. НПОЗ колебались от 0 в 10 популяциях до $0,46 \pm 0,230$ у башкир Башкортостана, достоверных различий не выявлено ($t=1,21$), средневзвешенное значение – $0,20 \pm 0,047/10000$ мужчин. Выявлены статистически значимые различия в общем грузе синдромальной НПОЗ по популяциям и этническим группам ($\chi^2_{17}=542,28$; $p < 0,05$; D.f.=16), средневзвешенное значение составило $4,96 \pm 0,228/10000$ (1:2076 человек).

Важной является оценка суммарного груза НПОЗ в популяциях, т.к. именно данный показатель позволяет рассчитать необходимый объем офтальмологической и медико-генетической помощи пациентам и их семьям, а также ориентирует здравоохранение на необходимое количество специалистов в регионе. Кроме того, учитывая, что в 70% случаев наблюдается инвалидизация пациентов, данный анализ демонстрирует социальное бремя как для региона, так и для страны в целом. В табл. 5 представлены значения суммарной

отягощенности (изолированной и синдромальной) НПОЗ в популяциях и этнических группах европейской части России

Значения груза суммарной отягощенности НПОЗ с АД типом наследования варьировали от $1,18 \pm 0,395/10000$ в Тверской области до $17,12 \pm 1,834/10000$ у черкесов КЧР ($\chi^2_{17}=622,55$; $p < 0,05$; D.f.=16). Средневзвешенное значение составило $6,80 \pm 0,146/10000$. Различия выявлены и при сравнении груза АР суммарной отягощенности НПОЗ – от $0,94 \pm 0,541/10000$ у абазин КЧР до $4,92 \pm 0,984/10000$ у черкесов КЧР ($\chi^2_{17}=625,55$; $p < 0,05$; D.f.=16). Средневзвешенное значение суммарной отягощенности НПОЗ с АР типом наследования составило $2,22 \pm 0,083/10000$. Значения отягощенности X-сц. патологией колебались от 0 в 3-х популяциях до $2,79 \pm 1,972/10000$ мужчин у ногайцев КЧР, достоверных различий не выявлено ($t=1,39$), средне-

Таблица 4. Груз синдромальных форм с НПОЗ (на 10000 обследованных) в 17 популяциях

Table 4. Burden of syndromic HPOV (per 10,000 examined) in 17 populations

Популяция	Численность	Груз на 10000 человек/мужчин*				Распр.
		АД	АР	X-сц.*	Общий	
Наследственные болезни и синдромы						
Осетины РСОА	162308	$7,76 \pm 0,691$	$1,79 \pm 0,332$	0	$9,55 \pm 0,077$	1:1047
Ногайцы КЧР	14344	$12,55 \pm 2,956$	$2,09 \pm 1,207$	0	$14,64 \pm 0,319$	1:683
Карачаевцы КЧР	162444	$5,36 \pm 0,574$	$1,29 \pm 0,282$	0	$6,65 \pm 0,064$	1:1504
Абазины КЧР	32000	$9,38 \pm 1,711$	$0,31 \pm 0,312$	0	$9,69 \pm 0,174$	1:1032
Черкесы КЧР	50817	$11,61 \pm 1,511$	$1,77 \pm 0,59$	0	$13,38 \pm 0,162$	1:747
Адыгейцы Адыгеи	65000	$6,31 \pm 0,985$	$1,85 \pm 0,533$	0	$8,16 \pm 0,112$	1:1226
Татары Татарстана	209265	$6,50 \pm 0,557$	$1,48 \pm 0,266$	$0,38 \pm 0,191$	$8,36 \pm 0,062$	1:1224
Башкиры Башкортостана	173765	$7,42 \pm 0,653$	$0,63 \pm 0,191$	$0,46 \pm 0,230$	$8,51 \pm 0,069$	1:1207
Удмурты Удмуртии	155356	$4,90 \pm 0,561$	$0,97 \pm 0,249$	$0,13 \pm 0,129$	$5,99 \pm 0,062$	1:1689
Марийцы Марий Эл	171571	$2,68 \pm 0,395$	$1,11 \pm 0,254$	0	$3,79 \pm 0,047$	1:2640
Чуваши Чувашии	178722	$2,46 \pm 0,371$	$0,73 \pm 0,202$	0	$3,19 \pm 0,042$	1:3135
Ростовская область	497460	$4,64 \pm 0,305$	$0,76 \pm 0,124$	$0,24 \pm 0,098$	$5,65 \pm 0,033$	1:1809
Костромская область	444476	$1,33 \pm 0,173$	$0,36 \pm 0,09$	$0,04 \pm 0,045$	$1,73 \pm 0,02$	1:5848
Краснодарский край	426700	$1,41 \pm 0,182$	$0,49 \pm 0,107$	$0,05 \pm 0,047$	$1,95 \pm 0,021$	1:5204
Кировская область	286616	$3,28 \pm 0,338$	$0,7 \pm 0,156$	$0,14 \pm 0,099$	$4,12 \pm 0,038$	1:2471
Тверская область	76000	$0,92 \pm 0,348$	$0,66 \pm 0,294$	0	$1,58 \pm 0,046$	1:6333
Брянская область	88210	$0,91 \pm 0,321$	$0,57 \pm 0,253$	0	$1,48 \pm 0,041$	1:6785
Средневзвешенное значение	3195054	$3,92 \pm 0,112$	$0,84 \pm 0,051$	$0,20 \pm 0,047$	$4,96 \pm 0,228$	1:2076

Примечание: Общий – суммарный груз, Распр. – суммарная распространенность.

взвешенное значение – $0,69 \pm 0,066/10000$ мужчин. Значения суммарного груза НПОЗ статистически достоверно различались по популяциям ($\chi^2_{17}=674,06$; $p \leq 0,05$; D.f.=16), средневзвешенное значение составило $9,71 \pm 0,017/10000$ (1:1066 человек).

Анализ груза НПОЗ в этнически различных популяциях РФ

Проведен сравнительный анализ груза НПОЗ для двух групп: русские и представители других этносов. В табл. 6 представлены средневзвешенные значения груза НПОЗ. Проведенный анализ показал, что выявлены достоверные отличия по значениях отягощенности изолированной НПОЗ со всеми типами наследования и общей отягощенности для изолированных НПОЗ

(АД-И $\chi^2=56,51$; АР-И $\chi^2=11,79$; Х-сц-И $\chi^2=28,58$; Общий-И $\chi^2=84,92$; $p \leq 0,05$; D.f.=1).

Различия выявлены и внутри этнических групп (АД-И $\chi^2_{11}=47,24$; АР-И $\chi^2_{11}=18,45$; Общий-И $\chi^2_{11}=58,21$; $p \leq 0,05$; D.f.=10). Средневзвешенное значение распространенности изолированных НПОЗ у русских ниже, чем у представителей других этносов.

При сравнении синдромальных форм наибольшие различия отмечены для суммарного груза (АД-С $\chi^2=209,26$; АР-С $\chi^2=35,20$; Общий-С $\chi^2=292,23$; $p \leq 0,05$; D.f.=1). Для Х-сцепленной патологии различий не выявлено (Х-сц.-С $\chi^2=0,14$; $p \geq 0,05$; D.f.=1). Различия выявлены внутри рассматриваемых этнических групп (АД-С $\chi^2_{11}=39,22$; АР-С $\chi^2=18,55$; Общий-С $\chi^2_{11}=134,17$; $p \leq 0,05$; D.f.=10). Средневзвешенное значение распро-

Таблица 5. Значения суммарной отягощенности (изолированной и синдромальной) НПОЗ в популяциях и этнических группах европейской части России (на 10000 чел.).

Table 5. Values of the total burden of isolated and syndromic HPOV in populations and ethnic groups of the European part of Russia (per 10,000).

Популяция	Численность	Груз на 10000 человек/мужчин*				Распр.
		АД	АР	Х-сц.*	Общий	
Суммарные значения по популяциям						
Осетины РСОА	162308	13,00±0,894	2,90±0,422	1,36±0,409	17,25±0,101	1:603
Ногайцы КЧР	14344	15,34±3,267	3,49±1,559	2,79±1,972	21,61±0,375	1:448
Карачаевцы КЧР	162444	8,50±0,723	3,26±0,448	0,62±0,275	12,38±0,086	1:829
Абазины КЧР	32000	13,125±2,024	0,94±0,541	0	14,06±0,209	1:711
Черкесы КЧР	50817	17,12±1,834	4,92±0,984	0,39±0,394	22,43±0,209	1:450
Адыгейцы Адыгеи	65000	7,54±1,077	3,69±0,754	1,54±0,688	12,77±0,136	1:833
Татары Татарстана	209265	11,90±0,754	3,15±0,388	1,34±0,358	16,39±0,087	1:636
Башкиры Башкортостана	173765	12,14±0,835	2,19±0,355	0,92±0,326	15,25±0,092	1:676
Удмурты Удмуртии	155356	8,95±0,759	2,32±0,386	2,19±0,531	13,46±0,089	1:809
Марийцы Марий Эл	171571	5,07±0,544	2,21±0,359	0,58±0,261	7,87±0,066	1:1320
Чуваши Чувашии	178722	3,75±0,458	2,97±0,407	0,67±0,274	7,39±0,063	1:1418
Ростовская область	497460	7,46±0,387	1,93±0,197	0,28±0,106	9,67±0,044	1:1049
Костромская область	444476	3,24±0,27	1,51±0,184	0,04±0,045	4,79±0,033	1:2097
Краснодарский край	426700	3,28±0,277	1,50±0,187	0,42±0,141	5,20±0,034	1:2003
Кировская область	286616	6,14±0,463	2,55±0,298	1,4±0,312	10,08±0,057	1:1065
Тверская область	76000	1,18±0,395	1,58±0,456	0	2,76±0,06	1:3619
Брянская область	88210	3,51±0,631	1,13±0,358	0	4,64±0,073	1:2151
Средневзвешенное значение	3195054	6,80±0,146	2,22±0,083	0,69±0,066	9,71±0,017	1:1066

Примечание: Общий – суммарный груз, Распр. – суммарная распространенность.

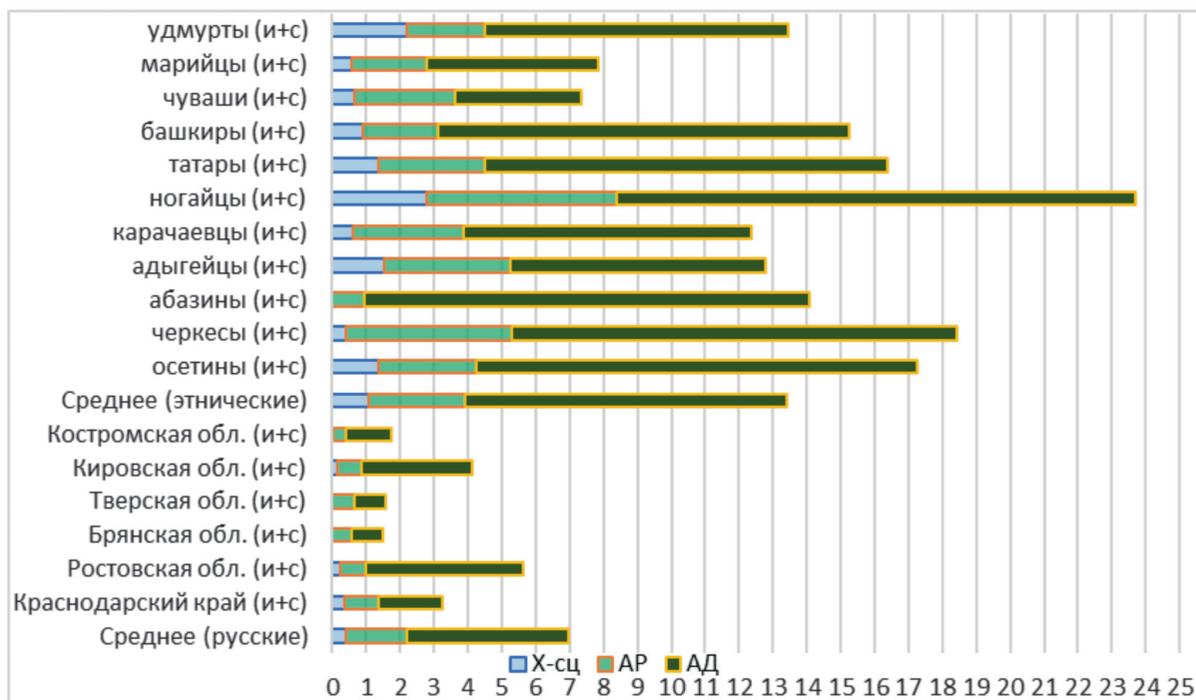


Рисунок 5. Суммарная отягощенность (на 10000 чел.) изолированной и синдромальной НПОЗ в популяциях и этнических группах европейской части России.

Figure 5. Total burden (per 10,000 people) of isolated and syndromic HPOV in populations and ethnic groups of the European part of Russia

Таблица 6. Средневзвешенные значения груза изолированной и синдромальной НПОЗ в этнических группах европейской части России.

Table 6. Weighted average values of the burden of isolated and syndromic HPOV in ethnic groups of the European part of Russia.

	Численность	Груз на 10000 человек/мужчин*				Распр.
		АД	AP	X-сц.*	Общий	
Изолированная наследственная офтальмопатология						
Средневзвешенное значение по представителям разных этносов	1375592	3,71±0,164	1,63±0,109	0,95±0,117	6,29±0,021	1:1715
Средневзвешенное значение по русским	1819462	2,26±0,112	1,19±0,081	0,30±0,057	3,750,014	1:2774
Наследственные болезни и синдромы						
Средневзвешенное значение по представителям разных этносов	1375592	5,76±0,205	1,19±0,093	0,13±0,044	7,08±0,023	1:1425
Средневзвешенное значение по русским	1819462	2,52±0,118	0,58±0,056	0,04±0,013	3,140,013	1:3170
Суммарные значения по популяциям						
Средневзвешенное значение по представителям разных этносов	1375592	9,47±0,262	2,82±0,143	1,08±0,125	13,37±0,031	1:778
Средневзвешенное значение по русским	1819462	4,79±0,162	1,77±0,099	0,41±0,067	6,97±0,019	1:1479

странности синдромальных НПОЗ у русских в два раза ниже, чем у представителей других этнических популяций.

Наибольшие различия прослеживаются при анализе суммарного груза (АД-Сум $\chi^2_{16}=56,51$; АР- Сум $\chi^2=11,79$; ХР- Сум $\chi^2=28,58$; Общий- Сум $\chi^2=84,92$; $p<0,05$; D.f.=1) и изолированного (АД-И $\chi^2_{11}=190,04$; АР-И $\chi^2_{11}=23,19$; Общий-И $\chi^2_{11}=667,05$; $p<0,05$; D.f.=10), что наглядно отражено на рисунке 5.

Заключение

Сравнительный анализ отягощенности населения изолированными и синдромальными формами НПОЗ и суммарного груза показал, что наблюдается вариабельность между популяциями и этническими группами. Распространенность изолированных форм НПОЗ составляет в среднем 1:2196 человек, синдромальной – 1:2076, суммарная распространенность всех форм НПОЗ составила 1:1066 человек. Показано, что распространенность НПОЗ среди русского населения (1:1479 человек) более, чем в 2 раза ниже, чем у представителей других этносов европейской части РФ (1: 778 человек).

Литература

- Гинтер Е.К., Зинченко Р.А. Наследственные болезни в российских популяциях. Информационный вестник ВОГиС. 2006; 10(1): 106-125.
- Зинченко Р.А., Куцев С.И., Александрова О.Ю., Гинтер Е.К. Основные методологические подходы к выявлению и диагностике моногенных наследственных заболеваний и проблемы в организации медицинской помощи и профилактических программ. Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2019; 27(5): 865-7 <https://doi.org/10.32687/0869-866X-2019-27-5-865-877>
- Методология генетико-эпидемиологического изучения наследственных болезней и врожденных пороков развития. Учебно-методическое пособие под редакцией Зинченко Р.А., Амелиной С.С., Куцева С.И., Гинтера Е.К. – Белгород: «ПОЛИТЕРРА», 2020:569с.
- Петрин А.Н., Гинтер Е.К., Руденская Г.И. и др. Медико-генетическое изучение населения Костромской области. Сообщение 4. Отягощенность и разнообразие наследственной патологии в 5 районах области. Генетика. 1988; 24(1): 151-155.
- Мамедова Р.А., Ельчинова Г.И., Старцева Е.А. и др. Генетическая структура и груз наследственных болезней в пяти популяциях Архангельской области. Генетика. 1996; 32(6): 837-841.
- Мамедова Р.А., Кадошников М.Ю., Брусинцева О.В. и др. Медико-генетическое описание населения двух районов Краснодарского края. Генетика. 1999; 35(1): 68-73.
- Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Руденская Г.Е. и др. Комплексное популяционно- и медико-генетическое изучение двух районов Тверской области. Генетика. 2004; 40(5):667-676 <https://doi.org/10.1023/B:RUGE.0000029157.14539.10>
- Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Гинтер Е.К. Факторы, определяющие распространение наследственных болезней в российских популяциях. Медицинская генетика. 2009; 8,12(90): 7-23.
- Zinchenko R.A., Makaov A.Kh., Marakhonov A.V. et al. Epidemiology of hereditary diseases in Karachay-Cherkess Republic. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21(1): 325. <https://doi.org/10.3390/ijms21010325>
- Гетоева З.К., Калышев В.В., Джайчиева М.Ю. и др. Медико-генетическое изучение населения Республики Северная Осетия Алания. II. Нозологический спектр наследственной патологией в трех районах. Медицинская генетика. 2020;19(10):10-18. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2020.10.10-18>
- Zinchenko R.A., Ginter E.K., Marakhonov A.V., et al. Epidemiology of rare hereditary diseases in European part of Russia: point and cumulative prevalence. Frontiers in Genetics. 2021: 678957. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.678957>
- Калышев В.В., Гинтер Е.К., Куцев С.И., Оганезова Ж.Г., Зинченко Р.А. Эпидемиология наследственных болезней органа зрения в популяциях Российской Федерации. Клиническая офтальмология. 2022; 22(2): 69-79 <https://doi.org/10.32364/2311-7729-2022-22-2-69-79>
- Козлова С.И., Семанова Е., Демикова Н.С., Блиникова О.Е. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование. Справочник. – Л.: Медицина, – 1987. – 320с.
- Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Нурбаев С.Д., Гинтер Е.К. Разнообразие аутосомно-доминантных заболеваний в российских популяциях. Генетика. 2001; 37(3):373-385.
- Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Козлова С.И., и др. Эпидемиология наследственных болезней в республике Чувашия. Медицинская генетика. 2002; 1(1):24-33.
- Мамедова Р.А., Гинтер Е.К., Петрин А.Н., и др. Структура и разнообразие наследственной патологии в Кировской области. Генетика. 1993; 29(7): 1186-1195.
- Гинтер Е.К., Зинченко Р.А. Ельчинова Г.И., и др. Генетико-эпидемиологическое изучение трех районов республики Чувашия. Генетика. 2001; 37(6): 840-847.
- Morton N.E. Genetic tests under incomplete ascertainment. Am J Hum Genet. 1959;11(1):1-16.
- Cavalli-Sforza L.L., Bodmer W.F. The genetics of human populations. Courier Corporation; 1999.
- Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991:128-130.

References

- Ginter E.K., Zinchenko R.A. Nasledstvennyye bolezni v rossijskikh populyatsiyakh [Hereditary diseases in Russian populations]. Informatsionnyy vestnik VOGiS [VOGiS Information Bulletin]. 2006; 10(1): 106-125. (In Russ.)
- Zinchenko R.A., Kutsev S.I., Aleksandrova O.Yu., Ginter E.K. Osnovnyye metodologicheskiye podkhody k vyyavleniyu i diagnostike monogennykh nasledstvennykh zaboolevaniy i problemy v organizatsii meditsinskoj pomoshchi i profilakticheskikh program [The main methodological approaches to the identification and diagnosis of monogenic hereditary diseases and problems in the organization of medical care and preventive programs]. Problemy sotsial'noy gigiyeny, zdavoookhraneniya i istorii meditsiny [Problems of social hygiene, health care and the history of medicine]. 2019; 27(5): 865-7 (In Russ.) <https://doi.org/10.32687/0869-866X-2019-27-5-865-877>
- Metodologiya genetiko-epidemiologicheskogo izucheniya nasledstvennykh bolezney i vrozhdennykh porokov razvitiya.

- Uchebno-metodicheskoye posobiye pod redaktsiyey Zinchenko R.A., Amelinoy S.S., Kutseva S.I., Gintera Ye.K. [Methodology of genetic and epidemiological study of hereditary diseases and congenital malformations. Educational and methodical manual edited by Zinchenko R.A., Amelinoy S.S., Kutseva S.I., Gintera E.K.]. – Belgorod: «POLITERRA» [Belgorod: «POLITERRA»]. 2020:569p. (In Russ.)
- Petrin A.N., Ginter E.K., Rudenskaya G.I. et al. Mediko-geneticheskoye izucheniye naseleniya Kostromskoy oblasti. Soobshcheniye 4. Otyagoshchennost' i raznoobraziye nasledstvennoy patologii v 5 rayonakh oblasti [Medical genetic study of the population of the Kostroma region. Message 4. The load and diversity of hereditary diseases in 5 regions]. Genetika [Genetics]. 1988; 24(1): 151-155. (In Russ.)
 - Mamedova R.A., El'chinova G.I., Starceva E.A. et al. Geneticheskaya struktura i gruz nasledstvennykh bolezney v pyati populyatsiyakh Arkhangel'skoy oblasti [Genetic structure and load of hereditary diseases in five populations of the Arkhangelsk region]. Genetika [Genetics]. 1996; 32(6): 837-841. (In Russ.)
 - Mamedova R.A., Kadoshnikova M.Yu., Brusinceva O.V. et al. Mediko-geneticheskoye opisaniye naseleniya dvukh rayonov Krasnodarskogo kraya [Medical genetic description the population of the two districts of the Krasnodar territory]. Genetika [Genetics]. 1999; 35(1): 68-73. (In Russ.)
 - Zinchenko R.A., El'chinova G.I., Rudenskaya G.E. et al. Kompleksnoye populyatsionno- i mediko-geneticheskoye izucheniye dvukh rayonov Tverskoy oblasti [Comprehensive population- and medical-genetic study of two districts of the Tver region]. Genetika [Genetics]. 2004; 40(5):667-676. (In Russ.) <https://doi.org/10.1023/B:RUGE.0000029157.14539.10>
 - Zinchenko R.A., El'chinova G.I., Ginter E.K. Faktory, opredelyayushchiye rasprostraneniye nasledstvennykh bolezney v rossiyskikh populyatsiyakh [Factors determining the spread of hereditary diseases in Russian populations]. Meditsinskaya genetika [Medical genetics]. 2009; 8,12(90): 7-23. (In Russ.)
 - Zinchenko R.A., Makaov A.Kh., Marakhonov A.V. et al. Epidemiology of hereditary diseases in Karachay-Cherkess Republic. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21(1): 325. <https://doi.org/10.3390/ijms21010325>
 - Getoeva Z.K., Kadyshev V.V., Dzhadzhieva M.Yu et al. Mediko-geneticheskoye izucheniye naseleniya Respubliki Severnaya Osetiya Alaniya. II. Nozologicheskii spektr nasledstvennoy patologiyey v trekh rayonakh [Medical and genetic study of the population of the Republic of North Ossetia Alania. II. Nosological spectrum of hereditary pathology in three districts]. Meditsinskaya genetika [Medical genetics]. 2020;19(10):10-18. (In Russ.) <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2020.10.10-18>
 - Zinchenko R.A., Ginter E.K., Marakhonov A.V., et al. Epidemiology of rare hereditary diseases in European part of Russia: point and cumulative prevalence. Frontiers in Genetics. 2021: 678957. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.678957>
 - Kadyshev V.V., Ginter E.K., Kutsev S.I., Oganezova Zh.G., Zinchenko R.A. Epidemiologiya nasledstvennykh bolezney organa zreniya v populyatsiyakh Rossiyskoy Federatsii [Epidemiology of hereditary diseases of the visual organ in the populations of the Russian Federation]. Klinicheskaya oftalmologiya [Clinical ophthalmology]. 2022; 22(2): 69-79. (In Russ.) <https://doi.org/10.32364/2311-7729-2022-22-2-69-79>
 - Kozlova S.I., Semanova E., Demikova N.S., Blinnikova O.E. Nasledstvennyye sindromy i mediko-geneticheskoye konsul'tirovaniye. Spravochnik. – L.: Meditsina [Hereditary syndromes and medical and genetic counseling. Reference book. – L.: Medicine]. 1987. – 320p. (In Russ.)
 - Zinchenko R.A., El'chinova G.I., Nurbaev S.D., Ginter E.K. Raznoobraziye autosomno-dominantnykh zabozevaniy v rossiyskikh populyatsiyakh [A variety of autosomal dominant diseases in the Russian population]. Genetika [Genetics]. 2001;37(3):373-385 (In Russ.)
 - Zinchenko R.A., El'chinova G.I., Kozlova S.I., et al. Epidemiologiya nasledstvennykh bolezney v respublike Chuvashiya [Epidemiology of hereditary diseases in the Republic of Chuvashia]. Meditsinskaya genetika [Medical genetics]. 2002; 1(1): 24-33. (In Russ.)
 - Mamedova R.A., Ginter E.K., Petrin A.N., et al. Struktura i raznoobraziye nasledstvennoy patologii v Kirovskoy oblasti [The structure and diversity of hereditary pathology in the Kirov region]. Genetika [Genetics]. 1993; 29(7): 1186-1195. (In Russ.)
 - Ginter E.K., Zinchenko R.A., El'chinova G.I., et al. Genetiko-epidemiologicheskoye izucheniye trekh rayonov respubliki Chuvashiya [Genetic and epidemiological study of three districts of the Republic of Chuvashia]. Genetika [Genetics]. 2001;37(6): 840-847 (In Russ.)
 - Morton N.E. Genetic tests under incomplete ascertainment. Am J Hum Genet. 1959;11(1):1-16.
 - Cavalli-Sforza L.L., Bodmer W.F. The genetics of human populations. Courier Corporation; 1999.
 - Zhivotovskiy L.A. Populyatsionnaya biometriya [Population biometrics]. M.: Nauka, 1991:128-130. (In Russ.)

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.06.24-31>

Особенности экспрессии иммунных контрольных точек в микросателлитно стабильных опухолях рака желудка

Мансорунов Д.Ж.¹, Кипкеева Ф.М.¹, Музаффарова Т.А.¹, Никулин М.П.², Малихова О.А.², Апанович Н.В.¹, Алимов А.А.¹

1 – ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

2 – ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

Рак желудка (РЖ) характеризуется агрессивным течением и является одной из ведущих причин смерти от онкологических заболеваний. Стандартные схемы лечения не всегда эффективны при этом заболевании, поэтому разработка новых подходов терапии и поиск предиктивных маркеров представляется актуальной научной задачей. Перспективными терапевтическими мишенями при злокачественных новообразованиях являются иммунные контрольные точки (ИКТ). Для понимания патогенеза и оптимизации терапии активно исследуется вклад ИКТ в процессы опухолевой прогрессии. В данном исследовании на выборке пациентов с микросателлитно стабильным фенотипом опухоли РЖ были изучены уровни экспрессии генов ИКТ и их коэкспрессия с генами, вовлеченными в эпителиально-мезенхимальный переход. Проведена оценка ассоциации экспрессии этих генов с клиническими характеристиками РЖ. Показано, что для низкодифференцированных опухолей характерно понижение экспрессии генов *CD276* и *PVR* ($p < 0,05$). Также обнаружено, что развитие метастазов ассоциировано с повышением уровня экспрессии гена *TDO2*. В случае неметастатического РЖ была выявлена корреляционная связь между уровнями экспрессии генов *CD44* и *CD276*. В группе метастатического РЖ корреляционная связь уровней экспрессии выявлена между генами *ADAM17*, *PVR*, *CD276* и генами *CD44*, *SNAI1*. Полученные данные дополняют представление о молекулярно-генетических механизмах, регулирующих прогрессию опухоли, и могут внести вклад в разработку новых терапевтических подходов, предполагающих совместное ингибирование генов, коэкспрессия которых является особенностью данной нозологии.

Ключевые слова: ген, экспрессия, рак желудка, иммунные контрольные точки, эпителиально-мезенхимальный переход, микросателлитная нестабильность.

Для цитирования: Мансорунов Д.Ж., Кипкеева Ф.М., Музаффарова Т.А., Никулин М.П., Малихова О.А., Апанович Н.В., Алимов А.А. Особенности экспрессии иммунных контрольных точек в микросателлитно стабильных опухолях рака желудка. *Медицинская генетика* 2023; 22(6): 24-31.

Автор для корреспонденции: Мансорунов Данзан Жаргалович; **e-mail:** gah3ah@mail.ru

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 01.06.2023

Features of immune checkpoint expression in microsatellite stable gastric cancer

Mansorunov D.Zh.¹, Kipkeeva F.M.¹, Muzaffarova T.A.¹, Nikulin M.P.², Malikhova O.A.², Apanovich N.V.¹, Alimov A.A.¹

1 – Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye str, Moscow, 115522, Russian Federation

2 – FSBI «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation
23, Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation

Gastric cancer (GC) is an aggressive tumor that is one of the leading causes of death from cancer. Treatment regimens are not often effective for this disease, so the development of new approaches to therapy and the search for predictive markers seems to be an urgent scientific task. Immune checkpoints (ICs) are promising therapeutic targets for malignant neoplasms. To understand the pathogenesis and optimize therapy, the role of ICs in tumor progression is being actively studied. In this study, IC gene expression levels and their co-expression with epithelial-mesenchymal transition-related genes were examined in a sample of patients with a microsatellite stable GC tumor phenotype. The association of the expression of these genes with the clinical characteristics of GC was assessed. It was found that the expression of the *CD276* and *PVR* genes was reduced in low-differentiated tumors ($p < 0.05$). The development of metastases is associated with an increased level of *TDO2* gene expression. In non-metastatic GC, a correlation was found between the expression

levels of the *CD44* and *CD276* genes. In metastatic GC, a correlation of expression levels was found between the *ADAM17*, *PVR*, *CD276* genes and the *CD44*, *SNAI1* genes. The findings add to the understanding of the molecular genetic mechanisms that regulate tumor progression and may contribute to the development of new therapeutic approaches involving mutual inhibition of genes.

Keywords: gene, expression, gastric cancer, immune checkpoint, epithelial-mesenchymal transition, microsatellite instability.

For citation: Mansorunov D.Zh., Kipkeeva F.M., Muzaffarova T.A., Nikulin M.P., Malikhova O.A., Apanovich N.V., Alimov A.A. Features of immune checkpoint expression in microsatellite stable gastric cancer. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(6): 24-31. (In Russ.)

Corresponding author: Danzan Zh. Mansorunov; e-mail: gah3ah@mail.ru

Funding: The research was carried out within the state assignment and funding of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest

Accepted: 01.06.2023

Введение

Рак желудка (РЖ) является одним из наиболее распространенных видов рака, занимает 5-е место по заболеваемости и 4-е место по смертности в мире [1]. В России за 2021 г. было выявлено более 32 тыс. случаев РЖ [2]. Стандартом терапии РЖ являются комбинации производных платины с фторпиримидином, такие как XELOX (оксалиплатин и капецитабин) и mFOLFOX6 (оксалиплатин, кальция фолинат и 5-фторурацил) [3]. Однако у значительной части пациентов эти терапевтические схемы являются недостаточно эффективными. Поэтому разработка новых подходов терапии и поиск предиктивных маркеров представляется актуальной научной задачей.

Существует несколько классификаций РЖ, в том числе построенных с учетом молекулярно-генетических особенностей опухоли, в частности, предложенные консорциумами The Cancer Genome Atlas (TCGA) и Asian Cancer Research Group (ACRG) [4,5]. В обеих молекулярно-генетических классификациях выделяют РЖ с микросателлитно стабильным и микросателлитно нестабильным фенотипом. Микросателлитная нестабильность используется в клинической практике как предиктивный маркер, наличие которого является показанием для назначения иммунотерапии [6].

Ингибиторы иммунных контрольных точек (ИКТ) рассматриваются как одно из наиболее перспективных направлений в лекарственной терапии онкологических заболеваний. В основе этой терапии лежит блокирование ИКТ моноклональными антителами, что препятствует ускользанию опухоли от иммунного ответа. Широкое распространение получили моноклональные антитела против таких ИКТ, как PD-1 (пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб), PD-L1 (атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб) и CTLA-4 (ипилимумаб, тремелимуаб). Необходимо отметить, что данный тип терапии более эффективен у когорты пациентов с микросателлитно нестабильным фенотипом опухоли. Согласно

имеющимся данным, доля таких пациентов с РЖ составляет от 10 до 22% [7].

В настоящее время активно исследуется вклад ИКТ в процессы опухолевой прогрессии. В частности, имеются данные о связи ИКТ с механизмами, регулируемыми эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и метастазирование при разных типах рака. Так, при гепатоцеллюлярной карциноме повышенная экспрессия *CD276* значительно коррелировала с метастазированием. В опухолевых клетках с нокдауном *CD276* экспрессия E-кадгерина повышалась, в то время как экспрессия N-кадгерина и виментина подавлялась [8]. В экспериментах на клеточных линиях почечно-клеточного рака и плоскоклеточного рака головы и шеи было показано, что при сверхэкспрессии PD-L1 наблюдалось подавление экспрессии эпителиальных маркеров наряду с активацией мезенхимальных маркеров [9, 10]. При РЖ было показано, что ЭМП приводит к повышению уровня экспрессии PD-L1 [11]. Однако сведения о вовлеченности генов ИКТ в процесс метастазирования опухоли при РЖ еще требуют уточнений. В данном исследовании на выборке пациентов с РЖ с микросателлитно стабильным фенотипом опухоли были изучены уровни экспрессии генов ИКТ и их коэкспрессия с генами, вовлеченными в ЭМП. Проведена оценка ассоциации экспрессии этих генов с клиническими характеристиками РЖ. Полученные данные дополняют представление о молекулярно-генетических механизмах, регулирующих прогрессию опухоли и могут оказаться полезными при разработке новых подходов терапии.

Методы

Образцы

Образцы РЖ (норма/опухоль) были получены в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Гистопатологическую характеристику

образцов тканей желудка проводили согласно рекомендациям 8-го издания классификации AJCC. В выборку были включены образцы ткани от 51 пациента, среди них 25 мужчин и 26 женщин. Средний возраст пациентов на момент постановки диагноза – 63,2 года. Распределение в выборке по стадиям: стадия I – 6 человек, стадия II – 16 человек, стадия III – 15 человек, стадия IV – 14 человек. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» (протокол № 7/4 от 9 ноября 2020 г.). Все пациенты подписали информированное согласие.

Анализ микросателлитной нестабильности

ДНК выделяли из образцов опухолевой и нормальной ткани желудка с использованием набора QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Qiagen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Количество и качество ДНК оценивали спектрофотометрически. ПЦР проводили общепринятым методом. В ходе реакции амплифицировали мононуклеотидные микросателлитные локусы BAT-25, BAT-26, NR21, NR24 и NR27, согласно существующему протоколу [12]. Анализ продуктов ПЦР осуществляли с использованием прибора 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Данные анализировали при помощи программного обеспечения (ПО) GeneMapper (Applied Biosystems, США). Интерпретацию результатов фрагментного анализа проводили согласно рекомендациям ESMO [13].

Анализ экспрессии генов

РНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Количество и качество РНК оценивали с помощью спектрофотометрии и электрофоретического разделения в агарозном геле. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием набора MMLV RT (Евроген, Россия). Флуоресцентный сигнал при проведении ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) регистрировали с использованием прибора QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Реакционную смесь для ПЦР готовили на основе набора реактивов qPCRmix-HS SYBR + HighROX Master Mix (Евроген, Россия).

В 51 паре образцов РЖ (опухоль/норма) изучали экспрессию генов *ADAM17*, *PVR*, *TDO2*, *CD274*, *CD276*, *CEACAM1*, *IDO1*, *LGALS3*, *LGALS9*, *HHLA2*, *CD44*, *SNAI1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *CDH1*. Ген *GAPDH* исполь-

зовали в качестве эндогенного контроля. Относительный уровень экспрессии мРНК каждого гена рассчитывали в опухолевых тканях по отношению к нормальной ткани желудка с помощью ПО QuantStudio Design and Analysis (Applied Biosystems, США) методом $\Delta\Delta C_t$ (RQ). Последовательности праймеров для каждого гена и размер ампликонов перечислены в **табл. 1**.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием ПО Statistica 10.0 и MedCalc. Группы сравнивали между собой, основываясь на критериях Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса. Для всех видов анализа статистически значимыми считались различия при уровне $p < 0,05$.

Результаты

Для исследования были отобраны образцы ткани 51 пациента. Характеристики образцов представлены в **табл. 2**. В результате гистопатологического анализа все образцы были классифицированы как аденокарцинома. В 49% случаев наблюдали низкую степень дифференцировки клеток опухоли. Метастазы в лимфатические узлы имели место в 65% случаев, отдаленные – в 27% случаев. У большинства пациентов опухоль была локализована в теле желудка.

С целью уточнения молекулярно-генетических характеристик образцов ткани опухоли в анализируемой выборке было проведено тестирование на наличие микросателлитной нестабильности. В 48 (94%) случаях микросателлитная нестабильность отсутствовала. Как отмечалось выше, для пациентов с микросателлитно стабильным фенотипом опухоли частота объективного ответа при назначении иммунотерапевтических препаратов на основе моноклональных антител против ИКТ значительно ниже, чем у пациентов с микросателлитно нестабильным фенотипом опухоли. Для понимания патогенеза и оптимизации терапевтических подходов при лечении РЖ у пациентов с микросателлитно стабильным фенотипом опухоли нами была предпринята попытка выявить особенности экспрессии генов, обеспечивающих иммунотолерантность и прогрессию опухоли. Изучена экспрессия генов ИКТ и их коэкспрессия с генами ЭМП.

В анализируемой выборке микросателлитно стабильных опухолей РЖ были исследованы уровни экспрессии следующих генов ИКТ: *ADAM17*, *PVR*, *TDO2*, *CD274*, *CD276*, *CEACAM1*, *IDO1*, *LGALS3*, *LGALS9*,

HHLA2. Показано, что для низкодифференцированных опухолей характерно достоверное понижение экспрессии генов *CD276* и *PVR* ($p < 0,05$). Также обнаружено, что развитие метастазов ассоциировано с повышением уровня экспрессии гена *TDO2* (рисунок), вовлеченного в метаболизм триптофана, что не противоречит результатам других исследований [14].

Исследование корреляционных связей между экспрессией генов ИКТ и генов *CD44*, *SNAI1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *CDH1*, вовлеченных в ЭМП, показало наличие связи между экспрессией генов ИКТ *ADAM17*, *PVR*, *CD276* и генами *CD44*, *SNAI1* (табл. 3). На следующем этапе анализа коэкспрессию генов ИКТ и ЭМП оценивали при неметастатическом и метастатическом РЖ.

Таблица 1. Последовательности праймеров для ПЦР-РВ.

Table 1. Primer sequences for real-time PCR.

Ген	Направление	Последовательность (5'→3')	Длина продукта (п.н.)
<i>GAPDH</i>	Forward	GGCTGCTTTTAACTCTGG	190
	Reverse	GGAGGGATCTCGCTCC	
<i>ADAM17</i>	Forward	GCTTGGATCTTGGCAAGTGT	150
	Reverse	CATCGACATAGGGCACACAG	
<i>IDO1</i>	Forward	CCAGCTATCAGACGGTCTG	228
	Reverse	CGGACTGAGGGATTTGACTC	
<i>CD274</i>	Forward	GTGCCGACTACAAGCGAATT	104
	Reverse	TGTCAGTTCATGTTCCAGAGGTG	
<i>PVR</i>	Forward	CTACACCTGCCTGTTTCGTC	186
	Reverse	TCTGAGTGCCAGGTGATTG	
<i>TDO2</i>	Forward	TCCTCAGGCTATCACTACCTGC	110
	Reverse	ATCTTCGGTATCCAGTGTCGG	
<i>CD276</i>	Forward	GGCTGTCTGTCTGTCTCATTG	176
	Reverse	TCCATCATCTTCTTTGCTGTCA	
<i>LGALS9</i>	Forward	GATGAGAATGCTGTGGTCCG	260
	Reverse	GAAGCCGCCTATGTCTGCA	
<i>CEACAM1</i>	Forward	TCTACCCCTGAACCTTTGAAGCCCA	150
	Reverse	TGAGAGACTTGAATACATCAGCACTG	
<i>HHLA2</i>	Forward	AGTGGTGCTAAAGGTGGGAGTT	154
	Reverse	CATGTTGTTTTCCAGAGATAGGTGTGT	
<i>LGALS3</i>	Forward	GGCCACTGATTGTGCCTTAT	154
	Reverse	AAGCGTGGGTAAAGTGGGAAG	
<i>CD44</i>	Forward	GCCTTGGCTTTGATTCTTGC	152
	Reverse	ATTCCTGAGACTTGCTGGC	
<i>SNAI1</i>	Forward	GCTGCAGGACTCTAATCCAGA	84
	Reverse	ATCTCCGGAGGTGGGATG	
<i>ZEB1</i>	Forward	GCCAACAGACCAGACAGTGT	95
	Reverse	TTTCTTGCCCTTCTTTCTG	
<i>ZEB2</i>	Forward	CAAGAGGCGCAAACAAGC	128
	Reverse	GGTTGGCAATACCGTCATCC	
<i>CDH1</i>	Forward	CGGACGATGATGTGAACACC	213
	Reverse	TTGCTGTTGTGCTTAACCCC	

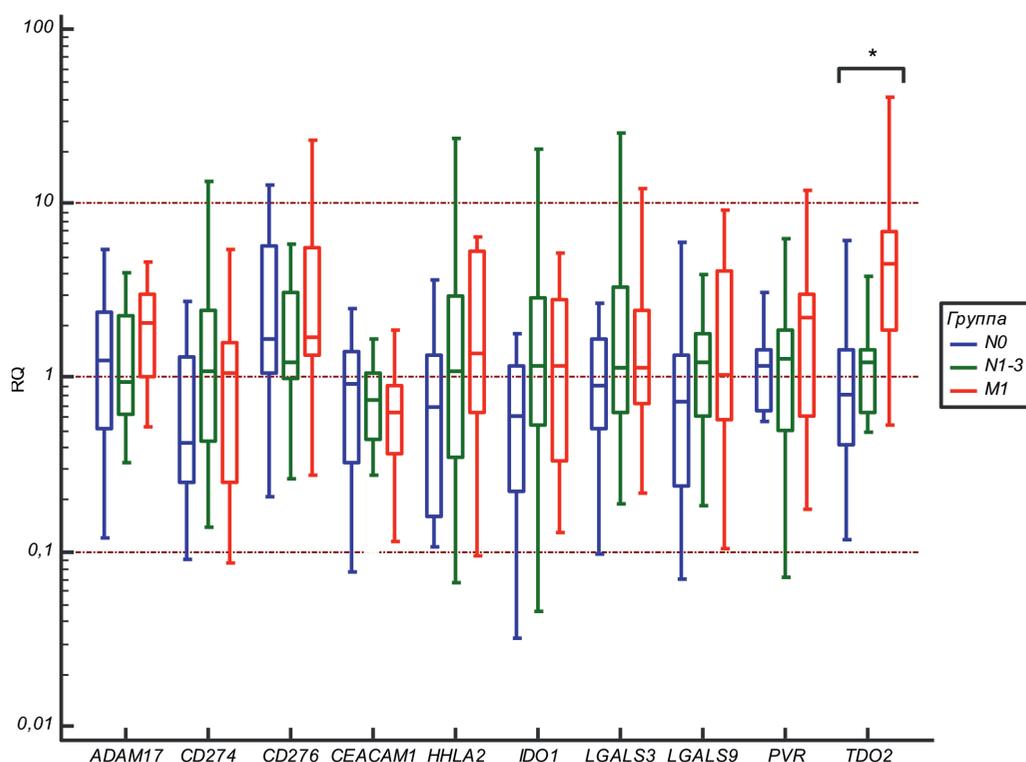


Рисунок. Изменение экспрессии генов ИКТ при метастазировании.

* – значимые различия ($p = 0,017$; критерий Краскела-Уоллиса).

Figure. Changes in IC gene expression during metastasis

* – significant differences ($p = 0,017$; Kruskal–Wallis test).

Таблица 2. Гистопатологические характеристики образцов РЖ.

Table 2. Histopathological characteristics of GC samples.

Характеристика		Количество пациентов
Локализация опухоли	Кардиальный отдел	10
	Тело	25
	Антральный отдел	16
Степень дифференцировки опухоли	Высокая/умеренная	26
	Низкая	25
Тип по классификации Lauren	Кишечный	29
	Диффузный	22
Наличие микросателлитной нестабильности	MSS	48
	MSI-H	3
Глубина инвазии опухоли (T)	1-2	9
	3-4	42
Наличие метастазов в лимфатических узлах (N)	0	18
	1	17
	2-3	16
Наличие отдаленных метастазов (M)	M0	37
	M1	14

Примечание: MSS – отсутствие микросателлитной нестабильности, MSI-H – наличие микросателлитной нестабильности в ≥ 2 локусах.

В случае неметастатического РЖ была выявлена корреляционная связь между уровнями экспрессии только одной пары генов: *CD44* – *CD276* (табл. 4). Оба гена являются трансмембранными белками, обеспечивающими выживаемость опухолевой клетки в ходе прогрессии. Полученные данные позволяют предположить, что экспрессия этих генов регулируется общими механизмами и может являться одной из причин уклонения опухоли от иммунного надзора на ранних стадиях. По имеющимся на сегодняшний день сведениям, ассоциация между экспрессией *CD44* и *CD276* была показана при глиоме [15]. Для РЖ полученная ассоциация выявлена впервые.

В группе метастатического РЖ корреляционная связь между уровнями экспрессии обнаружена для значительно большего количества генов (табл. 5). Так же, как и при неметастатическом РЖ, наблюдалась коэкспрессия генов *CD44* и *CD276*, что, скорее всего, можно рассматривать как молекулярно-генетическую особенность данной нозологии. Кроме этого, были выявлены связи между уровнями экспрессии *CD44* и экспрессией генов *ADAM17* и *PVR*. Также при метастатическом РЖ выявлена корреляционная связь между экспрессией гена транскрипционного ядерного фактора *SNAI1* и генами *ADAM17*, *PVR* и *CD276*, что не противоречит результатам, полученным на образ-

Таблица 3. Результаты корреляционного анализа экспрессии генов ИКТ и ЭМП при микросателлитно стабильном РЖ.

Table 3. Correlation of IC and EMT gene expression in microsatellite stable GC.

	<i>CD44</i>	<i>SNAI1</i>	<i>ZEB1</i>	<i>ZEB2</i>	<i>CDH1</i>
<i>ADAM17</i>	0,54*	0,52*	0,31	0,34	0,46
<i>IDO1</i>	0,15	0,25	0,34	0,36	-0,00
<i>CD274</i>	0,17	0,39	0,31	0,37	0,12
<i>PVR</i>	0,51*	0,55*	0,35	0,29	0,45
<i>TDO2</i>	0,06	0,31	0,32	0,12	-0,02
<i>CD276</i>	0,61*	0,45*	0,28	0,27	0,24
<i>LGALS9</i>	0,17	0,40	0,25	0,22	0,39
<i>CEACAM1</i>	-0,39	-0,13	0,01	-0,08	-0,23
<i>HHLA2</i>	0,12	-0,09	-0,07	0,01	0,31
<i>LGALS3</i>	0,27	0,15	0,12	0,23	0,42

Примечание: * - значимые коэффициенты корреляции по Спирмену ($p < 0,01$)

Таблица 4. Результаты корреляционного анализа экспрессии генов ИКТ и ЭМП при неметастатическом РЖ.

Table 4. Correlation of IC and epithelial-mesenchymal transition gene expression in non-metastatic GC.

	<i>CD44</i>	<i>SNAI1</i>	<i>ZEB1</i>	<i>ZEB2</i>	<i>CDH1</i>
<i>ADAM17</i>	0,63	0,29	0,29	0,23	0,52
<i>IDO1</i>	0,21	0,64	0,55	0,62	-0,28
<i>CD274</i>	0,46	0,32	0,34	0,35	-0,12
<i>PVR</i>	0,62	0,57	0,39	0,34	0,38
<i>TDO2</i>	-0,32	0,04	0,35	0,19	-0,14
<i>CD276</i>	0,66*	0,38	0,26	0,24	0,38
<i>LGALS9</i>	0,06	0,20	-0,01	0,12	0,24
<i>CEACAM1</i>	-0,45	-0,00	-0,12	-0,16	-0,10
<i>HHLA2</i>	0,13	0,05	-0,11	-0,18	0,18
<i>LGALS3</i>	0,36	0,17	0,35	0,31	0,33

Примечание: * - значимые коэффициенты корреляции по Спирмену ($p < 0,01$)

Таблица 5. Результаты корреляционного анализа экспрессии генов ИКТ и ЭМП при метастатическом РЖ.**Table 5.** Correlation of IC and epithelial-mesenchymal transition gene expression in metastatic GC.

	<i>CD44</i>	<i>SNAI1</i>	<i>ZEB1</i>	<i>ZEB2</i>	<i>CDH1</i>
<i>ADAM17</i>	0,54*	0,62*	0,26	0,40	0,43
<i>IDO1</i>	0,17	0,06	0,28	0,28	0,13
<i>CD274</i>	0,08	0,37	0,30	0,35	0,31
<i>PVR</i>	0,47*	0,50*	0,29	0,25	0,40
<i>TDO2</i>	0,22	0,35	0,30	0,07	0,07
<i>CD276</i>	0,60*	0,52*	0,24	0,30	0,30
<i>LGALS9</i>	0,24	0,35	0,32	0,25	0,44
<i>CEACAM1</i>	-0,42	-0,20	0,12	-0,07	-0,17
<i>HHLA2</i>	0,13	-0,24	-0,12	0,04	0,06
<i>LGALS3</i>	0,26	0,11	0,03	0,22	0,56

Примечание: * - значимые коэффициенты корреляции по Спирмену ($p < 0,01$)

цах других типов рака и клеточных линиях. В работе на клеточных линиях РЖ было показано, что нокдаун гена *ADAM17* приводил к подавлению уровней экспрессии мезенхимальных маркеров, в том числе *Snail*, и наоборот, гиперэкспрессия *ADAM17* приводила к повышению уровней экспрессии этих маркеров [16]. При гепатоцеллюлярной карциноме снижение экспрессии *ADAM17* приводило к подавлению ЭМП [17]. В экспериментах на клеточных линиях рака молочной железы было показано, что повышенный уровень экспрессии *CD155* был связан с мезенхимальным фенотипом клеток [18].

Обнаруженная в данной работе ассоциация генов ИКТ и ЭМП при РЖ не была описана ранее. Полученные результаты могут внести вклад в разработку новых терапевтических подходов, предполагающих совместное ингибирование генов, коэкспрессия которых является особенностью данной нозологии.

Выводы

В данном исследовании на выборке пациентов с РЖ с микросателлитно стабильным фенотипом впервые обнаружена корреляционная связь между уровнями экспрессии генов *ADAM17*, *PVR*, *CD276* и генами *CD44* и *SNAI1*, ассоциированными с ЭМП. Для остальных генов такая связь не была выявлена. Полученные сведения могут оказаться полезными при разработке новых подходов терапии, а также создания прогностических моделей, основанных на молекулярно-генетическом тестировании. Продолжение исследований

в данной области позволит значительно расширить наши представления о молекулярных механизмах, регулирующих прогрессию РЖ.

Литература

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May 4;71(3):209–249.
2. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Шахзадовой А.О. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2022.
3. Бесова Н.С., Болотина Л.В., Гамаюнов С.В. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака желудка. Злокачественные опухоли. 2022 Dec 24;12(3s2-1):382–400.
4. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014 Sep 11;513(7517):202–209.
5. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med.* 2015 May 20;21(5):449–456.
6. Prescribing information for KEYTRUDA® (pembrolizumab). https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2023/125514s1281bl.pdf
7. Ratti M., Lampis A., Hahne J.C. et al. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Nov 1;75(22):4151–4162.
8. Kang F.B., Wang L., Jia H.C. et al. B7-H3 promotes aggression and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting epithelial-to-mesenchymal transition via JAK2/STAT3/Slug signaling pathway. *Cancer Cell Int.* 2015 Apr 21;15(45).
9. Wang Y., Wang H., Zhao Q. et al. PD-L1 induces epithelial-to-mesenchymal transition via activating SREBP-1c in renal cell carcinoma. *Med Oncol.* 2015 Aug;32(8):212.

10. Ock C.Y., Kim S., Keam B. et al. PD-L1 expression is associated with epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Mar 29;7(13):15901–15914.
11. Xu D., Li J., Li R. et al. PD-L1 Expression Is Regulated By NF- κ B During EMT Signaling In Gastric Carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2019 Nov 25;12:10099–10105.
12. Goel A., Nagasaka T., Hamelin R., Boland C.R. An Optimized Pentaplex PCR for Detecting DNA Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancers. Najbauer J, editor. *PLoS One*. 2010 Feb 24;5(2):e9393.
13. Luchini C., Bibeau F., Ligtenberg M.J.L. et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol*. 2019 Aug 1;30(8):1232–1243.
14. Pham Q.T., Taniyama D., Akabane S. et al. Essential Roles of TDO2 in Gastric Cancer: TDO2 Is Associated with Cancer Progression, Patient Survival, PD-L1 Expression, and Cancer Stem Cells. *Pathobiology*. 2023;90(1):44–55.
15. Xiao Y., Yang K., Wang Z. et al. CD44-Mediated Poor Prognosis in Glioma Is Associated With M2-Polarization of Tumor-Associated Macrophages and Immunosuppression. *Front Surg*. 2022 Feb 3;8:775194.
16. Xu M., Zhou H., Zhang C. et al. ADAM17 promotes epithelial-mesenchymal transition via TGF- α /Smad pathway in gastric carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2016 Dec;49(6):2520–2528.
17. Yang B., Wang C., Xie H. et al. MicroRNA-3163 targets ADAM-17 and enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to molecular targeted agents. *Cell Death Dis*. 2019 Oct 14;10(10):784.
18. Zheng Q., Gao J., Yin P. et al. CD155 contributes to the mesenchymal phenotype of triple-negative breast cancer. *Cancer Sci*. 2020 Feb;111(2):383–394.
4. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014 Sep 11;513(7517):202–209.
5. Cristescu R., Lee J., Nebozhyn M. et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med*. 2015 May 20;21(5):449–456.
6. Prescribing information for KEYTRUDA® (pembrolizumab). https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2023/125514s128lbl.pdf
7. Ratti M., Lampis A., Hahne J.C. et al. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cell Mol Life Sci*. 2018 Nov 1;75(22):4151–4162.
8. Kang F.B., Wang L., Jia H.C. et al. B7-H3 promotes aggression and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting epithelial-to-mesenchymal transition via JAK2/STAT3/Slug signaling pathway. *Cancer Cell Int*. 2015 Apr 21;15(45).
9. Wang Y., Wang H., Zhao Q. et al. PD-L1 induces epithelial-to-mesenchymal transition via activating SREBP-1c in renal cell carcinoma. *Med Oncol*. 2015 Aug;32(8):212.
10. Ock C.Y., Kim S., Keam B. et al. PD-L1 expression is associated with epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Mar 29;7(13):15901–15914.
11. Xu D., Li J., Li R. et al. PD-L1 Expression Is Regulated By NF- κ B During EMT Signaling In Gastric Carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2019 Nov 25;12:10099–10105.
12. Goel A., Nagasaka T., Hamelin R., Boland C.R. An Optimized Pentaplex PCR for Detecting DNA Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancers. Najbauer J, editor. *PLoS One*. 2010 Feb 24;5(2):e9393.
13. Luchini C., Bibeau F., Ligtenberg M.J.L. et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol*. 2019 Aug 1;30(8):1232–1243.
14. Pham Q.T., Taniyama D., Akabane S. et al. Essential Roles of TDO2 in Gastric Cancer: TDO2 Is Associated with Cancer Progression, Patient Survival, PD-L1 Expression, and Cancer Stem Cells. *Pathobiology*. 2023;90(1):44–55.
15. Xiao Y., Yang K., Wang Z. et al. CD44-Mediated Poor Prognosis in Glioma Is Associated With M2-Polarization of Tumor-Associated Macrophages and Immunosuppression. *Front Surg*. 2022 Feb 3;8:775194.
16. Xu M., Zhou H., Zhang C. et al. ADAM17 promotes epithelial-mesenchymal transition via TGF- α /Smad pathway in gastric carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2016 Dec;49(6):2520–2528.
17. Yang B., Wang C., Xie H. et al. MicroRNA-3163 targets ADAM-17 and enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to molecular targeted agents. *Cell Death Dis*. 2019 Oct 14;10(10):784.
18. Zheng Q., Gao J., Yin P. et al. CD155 contributes to the mesenchymal phenotype of triple-negative breast cancer. *Cancer Sci*. 2020 Feb;111(2):383–394.

References

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May 4;71(3):209–249.
2. Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2021 godu (zabolevaemost' i smertnost') Pod red. Kaprina A.D., Starinskogo V.V., Shahzadovoj A.O. [Malignant neoplasms in Russia in 2021 (morbidity and mortality)]. M.: MNIOL im. P.A. Gercena – filial FGBU «NMIC radiologii» Minzdrava Rossii; 2022. (In Russ.)
3. Besova N.S., Bolotina L.V., Gamajunov S.V. et al. Prakticheskie rekomendacii po lekarstvennomu lecheniju raka zheludka [Practical guidelines for drug treatment of gastric cancer]. *Zlokachestvennye opuholi* [Malignant tumors]. 2022 Dec 24;12(3s2-1):382–400. (In Russ.)

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.06.32-37>

Полиморфные локусы генов *PNPLA3*, *HFE*, ассоциированные с неалкогольной жировой болезнью печени, у пациентов с метаболическим синдромом в Красноярском крае

Смирнова О.В.^{1,2}, Лагутинская Д.В.^{1,2}

- 1 – ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3г
- 2 – ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» 660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79

В последние годы метаболический синдром принимает размах эпидемии, поражая широкие группы населения по всему миру. Одной из его форм считается неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) – состояние, вызванное избыточным накоплением жира в гепатоцитах при низком употреблении алкоголя. Все больше подтверждений находится тому, что определенный вклад в риск возникновения и развития данного заболевания вносят не только образ жизни, но и генетические факторы. Одними из них являются полиморфизмы генов *PNPLA3* (rs738409), *HFE* (rs1800562, rs1799945, rs1800730), связанные не только с риском развития НАЖБП, но и с негативной динамикой ее развития. Распространенность вышеназванных полиморфизмов в группе пациентов с метаболическим синдромом, проживающих на территории Красноярского края практически не изучалась. **Цель исследования:** оценить распространенность полиморфизмов генов *PNPLA3* (rs738409), *HFE* (rs1800562, rs1799945, rs1800730) в группе пациентов с метаболическим синдромом, проживающих на территории Красноярского края. **Материалы и методы.** В ходе работы была сформирована группа пациентов с метаболическим синдромом и НАЖБП (n=72), а так же контрольная группа (n=83), состоящая из практически здоровых добровольцев, полученные результаты были сравнены с показателями встречаемости для европеоидов. Выделение ДНК производилось из лейкоцитов цельной крови, ПЦР-ПВ производилась с использованием гидролизных олигонуклеотидных зондов. **Результаты.** У практически здоровых добровольцев, проживающих на территории Красноярского края, не было выявлено различий в частоте аллелей и генотипов полиморфизмов генов *PNPLA3*, *HFE* относительно известных данных о европеоидах. У пациентов с метаболическим синдромом и НАЖБП обнаружена высокая распространенность аллеля Т и генотипа АТ, низкая частота генотипа АА rs1800730 гена *HFE*, низкая частота встречаемости генотипа СG полиморфизма rs1799945 гена *HFE*.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, метаболический синдром, адипонутрин, *PNPLA3*, *HFE*.

Для цитирования: Смирнова О.В., Лагутинская Д.В. Полиморфные локусы генов *PNPLA3*, *HFE*, ассоциированные с неалкогольной жировой болезнью печени, у пациентов с метаболическим синдромом в Красноярском крае. *Медицинская генетика* 2023; 22(6): 32-37.

Автор для корреспонденции: Лагутинская Д.В.; e-mail: dlagut1210@gmail.com

Финансирование. Исследование осуществляется в рамках Госзадания № 0287-2021-0005 «Исследование молекулярно-генетических и регуляторно-метаболических механизмов функциональной активности клеток иммунной системы в норме и при иммунопатологических состояниях».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 01.06.2023

The frequencies of polymorphisms of *PNPLA3* and *HFE* genes associated with potentially non-alcoholic fatty liver disease in patients with metabolic syndrome in the Krasnoyarsk Territory

Smirnova O.V.^{1,2}, Lagutinskaya D.V.^{1,2}

- 1 – Research Institute for Medical Problems in the North - Division of Federal Research Center “Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences” 3 g, Partizana Zheleznyaka st., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation
- 2 – Siberian Federal University 79, Svobodny pr., Krasnoyarsk, 660041, Russian Federation

The aim of the study was to assess the prevalence of polymorphisms of the *PNPLA3* (rs738409), *HFE* (rs1800562, rs1799945, rs1800730) genes in a group of patients with metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease living in the Krasnoyarsk Territory. In the

course of the work, groups of patients with metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease (n=72) and practically healthy volunteers (n=83) were formed. The data of the frequency of polymorphisms were obtained and compared with global frequencies. DNA extraction was performed from whole blood leukocytes; RT-PCR was performed using hydrolysis oligonucleotide probes.

Results. In practically healthy volunteers living in the Krasnoyarsk Territory, there were no differences in the frequency of alleles and genotypes of polymorphisms of the *PNPLA3*, *HFE*, genes compared to Caucasians.

In patients with metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease, a high prevalence of the mutant allele T and the AT genotype, a low frequency of the AA genotype of the *HFE* gene (rs1800730), and a low occurrence of the CG genotype of the *HFE* gene polymorphism (rs1799945) were found.

Keywords: nonalcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome, adiponutrin, *PNPLA3*, *HFE*.

For citation: Smirnova O.V., Lagutinskaya D.V. The frequencies of polymorphisms of *PNPLA3* and *HFE* genes associated with potentially non-alcoholic fatty liver disease in patients with metabolic syndrome in the Krasnoyarsk Territory. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(6): 32-37. (In Russ.)

Corresponding author: D.V. Lagutinskaya; **e-mail:** dlagut1210@gmail.com

Funding: The study is carried out according to State Order No. 0287-2021-0005.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest

Accepted: 01.06.2023

Введение

В настоящее время ожирение и ассоциированные с ним состояния (метаболический синдром, сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет 2 типа, нарушенный липидный профиль) принимают угрожающий размах эпидемии и поражают около 25% населения по всему миру [1]. Одной из форм манифестации вышеупомянутого метаболического синдрома является неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) — состояние, вызываемое избыточным накоплением жиров в гепатоцитах на фоне малого употребления алкоголя и отсутствующего вирусного поражения печени. Данное заболевание поражает клетки печени постепенно, что выражается в «тихом» и вялотекущем прогрессировании заболевания до стеатогепатита, а затем до фиброза с исходом в цирроз и гепатоцеллюлярную карциному [2]. «Золотым стандартом» диагностики выраженности НАЖБП является биопсия печени, которая, будучи инвазивной процедурой, несет в себе ряд рисков. Неинвазивные же методики (УЗИ и различные методы томографической визуализации), как правило, имеют низкую разрешающую способность и позволяют обнаружить только значительное жировое перерождение клеток печени [3, 4]. Поэтому крайне важными становятся неинвазивные методы исследования, которые могут иметь сопоставимую с биопсией чувствительность, но также могут нести и прогностическую функцию, выделяя группу тех пациентов, которые имеют высокий риск развития НАЖБП. Одним из таких методов может быть изучение генетических полиморфизмов. Несмотря на то, что генетические исследования активно входят в рутину лабораторной диагностики для ряда

заболеваний, в случае НАЖБП они не нашли широкого применения, несмотря на активную работу исследователей в данной сфере.

Ведущая роль во влиянии на возникновение и развитие НАЖБП отводится 15 генам, участвующим в метаболизме жиров и углеводов. Последние кандидатные и полногеномные ассоциативные исследования связывают гены *MBOAT7*, *TM6SF2*, *GCKR*, *PNPLA3* и *HFE* с формированием данного заболевания [5-7]. Так, полиморфизм гена *PNPLA3* (Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) rs738409 влияет на функциональную активность экспрессируемого им белка адипонутрина, который участвует в образовании липидных капель в клетках таким образом, что образуемые им капли имеют больший объем, что и приводит к избыточному накоплению жирных кислот в печени. Данное обстоятельство делает этот ген предиктором не только развития НАЖБП, но и его прогрессии [8-10].

В последние годы все больше внимания обращается на то, как нарушение метаболизма железа в гепатоцитах способствует развитию НАЖБП [11]. Показано, что полиморфизмы гена *HFE* (Homeostatic iron regulator) rs1800562, rs1799945, rs1800730 имеют корреляцию с риском развития крайне тяжелых осложнений НАЖБП — цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы [12, 13].

Исследования влияния вышеуказанных полиморфизмов генов на возникновение и развитие НАЖБП у пациентов с метаболическим синдромом в популяции Красноярского края практически не проводились. Поэтому целью данной работы является поиск ассо-

циации полиморфизмов генов *PNPLA3* rs738409; *HFE* rs1800562, rs1799945, rs1800730 с развитием НАЖБП у пациентов с метаболическим синдромом, проживающих на территории Красноярского края.

Методы

Для проведения исследования были отобраны 72 пациента (группа МС с НАБЖ) терапевтического отделения клиники НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН (г. Красноярск), также были привлечены 83 практически здоровых добровольца в 2021–2022 гг. Критериями отбора в группу пациентов с метаболическим синдромом являлось наличие НАЖБП в сочетании с компонентами метаболического синдрома (ожирение, гипертония, инсулинорезистентность и сахарный диабет II типа, дислипидемия). Все отобранные пациенты проходили лечение в стационаре, за ними осуществлялось динамическое наблюдение в течение всего времени их пребывания в клинике. Критериями исключения являлись злоупотребление алкоголем, наличие в анамнезе токсического поражения печени, вирусного гепатита В и С, отказ от участия в исследовании. Для группы практически здоровых добровольцев критериями исключения являлись наличие ожирения, НАЖБП, вирусного гепатита, алкоголизм и отказ от участия в исследовании. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск (протокол № 3 от 13.03.23 г.). Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие перед забором цельной крови из локтевой вены в вакутейнеры с ЭДТА.

Для дальнейшей работы проводилась процедура выделения ДНК на основе магнитных частиц с помощью комплекта реактивов для выделения ДНК из клинического материала человека ДНК-КРОВЬ-М-100 (ООО «ТестГен», Россия). Оценка полиморфных вариантов генов *PNPLA3* rs738409; *HFE* rs1800562, rs1799945, rs1800730 была проведена методом ПЦР с гидролизными зондами для генотипирования полиморфных маркеров и мутаций (ООО «ТестГен», Россия) на амплификаторе LightCycler96 (Roche Molecular Systems, Inc.). Повторное генотипирование 10% исследованных образцов, отобранных по случайному принципу и при отсутствии информации о статусе болезни, показало 100% воспроизводимость оригинальных результатов.

Для оценки встречаемости генотипов и аллелей проводился статистический анализ с использованием критерия отношения шансов (ОШ) с расчетом 95% доверительного интервала, также была проведена провер-

ка соответствия распределения полученных частот генотипов уравнению Харди-Вайнберга с использованием критерия χ^2 . Данную оценку проводили с помощью калькулятора для расчёта статистики в исследованиях «случай-контроль» (<http://84.201.145.131/index.php>).

Сравнение полученных частот аллелей проводилось с данными, представленными в базах данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) и Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>).

Результаты

В ходе работы были изучены данные о встречаемости полиморфных вариантов генов *PNPLA3* rs738409 и *HFE* rs1800562, rs1799945, rs1800730 в группе пациентов с НАЖБП относительно показателей европеоидов и данных, полученных в группе практически здоровых добровольцев. Частоты встречаемости аллелей и генотипов у европеоидов были получены в геномных базах данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) и Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>).

При проверке ожидаемого соответствия распределения частот генотипов уравнению Харди-Вайнберга не были найдены отклонения в группе практически здоровых добровольцев. Однако имелись изменения в группе пациентов для следующих полиморфизмов: *HFE* rs1799945 ($p=0,04$), *HFE* rs1800730 ($p=0,04$).

Далее было проведено сравнение встречаемости аллелей полиморфизмов *PNPLA3* rs738409; *HFE* rs1800562, rs1799945, rs1800730 у больных с НАЖБП относительно практически здоровых добровольцев и данных, показанных для европеоидов (табл. 1).

Для полиморфизмов rs738409 *PNPLA3*; rs1800562 и rs1799945 *HFE* не было найдено статистически значимых различий во встречаемости аллелей во всех исследуемых группах. Было найдено статистически значимое различие в частоте обоих аллелей А и Т полиморфизма rs1800730 гена *HFE*. У пациентов с НАЖБП доля аллеля А составила 83%, в группе с практически здоровых добровольцев частота аллеля была 97%. Частота аллеля Т у пациентов с НАЖБП была 16,9%, то есть приблизительно в 6 раз выше в сравнении с практически здоровыми добровольцами и с европеоидами. Таким образом, было выявлено значительное увеличение доли аллеля Т полиморфизма rs1800730 в группе пациентов с НАЖБП по сравнению со здоровыми добровольцами и данными о встречаемости у европеоидов.

На следующем этапе нами была оценена встречаемость генотипов полиморфизмов *PNPLA3* rs738409; *HFE* rs1800562, rs1799945, rs1800730. В первую очередь,

следует отметить, что для некоторых полиморфизмов (*PNPLA3* rs738409 и *HFE* rs1800562) не было обнаружено статистически значимых различий во встречаемости генотипов во всех исследуемых группах.

Для полиморфизма rs1800730 гена *HFE* были обнаружены следующие различия. Встречаемость генотипа AA в группе пациентов с НАЖБП была в 1,3 раза ниже, чем в группе практически здоровых добровольцев. Было выявлено, что гетерозиготы AT встречались в 3 раза чаще в группе пациентов с метаболическим синдромом и НАЖБП по сравнению с группой контроля. При этом, генотип TT практически не встречался в группе контроля, поэтому сложно оценить его частоту в сравнении с группой пациентов.

Для полиморфизма rs1799945 гена *HFE* были отмечены следующие особенности. Статистически значимые различия были отмечены только для геноти-

па CG, частота встречаемости которого была в 2 раза меньше среди пациентов с метаболическим синдромом и НАЖБП по сравнению с группой контроля. Генотипы CC и GG не показали статистически значимых различий во встречаемости ни в одной из групп.

Таким образом, можно предположить, что полиморфизм гена *HFE* rs1800730 связан с развитием метаболического синдрома и НАЖБП, а полиморфизм rs1799945 обладает протективным эффектом.

Обсуждение

У практически здоровых добровольцев, проживающих на территории Красноярского края, не было выявлено различий в частоте минорных аллелей полиморфизмов генов *PNPLA3* (rs738409), *HFE* (rs1800562, rs1799945, rs1800730) относительно европейской попу-

Таблица 1. Распространенность полиморфных вариантов генов *PNPLA3* (rs738409), *HFE* (rs1800562, rs1799945, rs1800730).

Table 1. Allele prevalence of *PNPLA3* (rs738409), *HFE* (rs1800562, rs1799945, rs1800730) genes.

Генотип	МС с НАБЖ (1)		Контроль (2)		Европеиды (3)		OR (95%CI)	p
	n=72		n=83		n=72			
<i>PNPLA3</i> rs738409								
	Частота	n, (abc)	Частота	n, (abc)	Частота	n, (abc)		
C	0,799	115	0,764	110	0,750	108		p _{1,2} = 0,48 p _{1,3} = 0,32 p _{2,3} = 0,08
G	0,201	29	0,236	34	0,250	36	OR _{1,2} = 0,82 (0,47 – 1,43) OR _{1,3} = 0,76 (0,43 – 1,32) OR _{2,3} = 0,93 (0,54 – 1,59)	
<i>HFE</i> rs1800562								
	Частота	n, (abc)	Частота	n, (abc)	Частота	n, (abc)		
C	0,957	132	0,965	139	0,979	141		p _{1,2} = 0,7 p _{1,3} = 0,28 p _{2,3} = 0,47
T	0,043	6	0,035	6	0,021	3	OR _{1,2} = 1,26 (0,38 – 4,24) OR _{1,3} = 2,14 (0,52 – 8,72) OR _{2,3} = 1,69 (0,40 – 7,21)	
<i>HFE</i> rs1800730								
	Частота	n, (abc)	Частота	n, (abc)	Частота	n, (abc)		
A	0,831	118	0,972	140	0,958	138		p _{1,2} = 0,00006 p _{1,3} = 0,0004 p _{2,3} = 0,52
T	0,169	24	0,028	4	0,042	6	OR _{1,2} = 7,12 (2,40 – 21,10) OR _{1,3} = 4,68 (1,85 – 11,83) OR _{2,3} = 0,66 (0,18 – 2,38)	
<i>HFE</i> rs1799945								
	Частота	n, (abc)	Частота	n, (abc)	Частота	n, (abc)		
C	0,831	118	0,826	119	0,813	117		p _{1,2} = 0,92 p _{1,3} = 0,68 p _{2,3} = 0,76
G	0,169	24	0,174	25	0,188	27	OR _{1,2} = 0,97 (0,52 – 1,79) OR _{1,3} = 0,88 (0,48 – 1,62) OR _{2,3} = 0,91 (0,50 – 1,66)	

ляции, что позволяет говорить о том, что данная популяция не имеет выраженных особенностей в сравнении с европеоидами.

У пациентов с НАЖБП и метаболическим синдромом обнаружена высокая распространённость аллеля Т и генотипа АТ полиморфизма rs1800730 гена *HFE*, низкая частота встречаемости генотипа СG полиморфизма rs1799945 гена *HFE*.

Экспрессия гена *HFE* влияет на депонирование железа, при мутациях приводя к избыточному накоплению железа в макрофагах и других соматических клетках. Избыток железа в гепатоцитах способен нарушить редокс-статус клетки, содействует появлению активных форм кислорода, стимулирует перекисное окисление липидов мембран клеток, усиливает окислительный стресс, способствуя развитию локального воспалительного процесса в печени, что может усугублять НАЖБП и приводить в дальнейшем к развитию гепатоцеллюлярной кар-

циномы [14-16]. Встречаемость полиморфных вариантов гена *HFE* (rs1800562, rs1799945, rs1800730) в группе контроля соответствовала их встречаемости в европейской популяции, для которой характерна повышенная частота мутантных аллелей в сравнении с представителями других рас. Вероятно, нарушение метаболизма железа является патогенетическим механизмом прогрессирования НАЖБП при метаболическом синдроме, что является отличительной особенностью европеоидов относительно других популяций [13].

Не было выявлено статистически значимых различий в распространённости полиморфизмов генов *HFE* (rs1800562) и *PNPLA3* (rs738409). В нашем исследовании была доказана патогенетическая роль гена *HFE* в развитии и прогрессировании НАЖБП при метаболическом синдроме, при этом различия были найдены в других полиморфных локусах этого гена. Отсутствие результатов по полиморфизму *HFE* (rs1800562),

Таблица 2. Распространённость генотипов полиморфизмов генов *PNPLA3* (rs738409), *HFE* (rs1800562, rs1799945, rs1800730).

Table 2. Prevalence of genotypes of the *PNPLA3* (rs738409), *HFE* (rs1800562, rs1799945, rs1800730) genes.

Генотип	МС с НАБЖ (1) n=72		Контроль (2) n=83		OR (95%CI)	p
<i>PNPLA3</i> rs738409						
	Частота	n, (abc)	Частота	n, (abc)		0,43
CC	0,681	49	0,597	49	OR _{1,2} =1,44 (0,73 – 2,85)	
CG	0,236	17	0,333	28	OR _{1,2} =0,62 (0,30 – 1,29)	
GG	0,083	6	0,069	6	OR _{1,2} =1,22 (0,35 – 4,19)	
<i>HFE</i> rs1800562						
	Частота	n, (abc)	Частота	n, (abc)		0,35
CC	0,913	63	0,944	75	OR _{1,2} =0,62 (0,17 – 2,29)	
CT	0,087	6	0,042	6	OR _{1,2} =2,19 (0,53 – 9,13)	
TT	0	0	0,014	2	OR _{1,2} =0,34 (0,01 – 8,56)	
<i>HFE</i> rs1800730						
	Частота	n, (abc)	Частота	n, (abc)		0,003
AA	0,746	53	0,944	78	OR_{1,2}=0,17 (0,06 – 0,54)	
AT	0,169	12	0,056	5	OR_{1,2}=3,46 (1,06 – 11,30)	
TT	0,085	6	0,000	0	OR _{1,2} =14,39 (0,80 – 260,43)	
<i>HFE</i> rs1799945						
	Частота	n, (abc)	Частота	n, (abc)		0,03
CC	0,746	53	0,667	55	OR _{1,2} =1,47 (0,71 – 3,04)	
CG	0,169	12	0,319	27	OR_{1,2}=0,43 (0,20 – 0,96)	
GG	0,085	6	0,014	1	OR _{1,2} =6,55 (0,77 – 55,91)	

вероятно, связано с этническими особенностями проживающих в Красноярском крае европеоидов. По результатам более ранних исследований важнейшая роль при НАЖБП отведена гену *PNPLA3* и его полиморфизму rs738409, ответственному за формирование липидных капель в гепатоцитах [17]. Отсутствие статистически значимых различий в нашем исследовании, возможно, связано с малой выборкой больных и с отсутствием деления больных по степени выраженности дислипидемии.

Заключение

Полиморфизмы генов *PNPLA3* и *HFE* были впервые изучены в популяции европеоидов с метаболическим синдромом и НАЖБП, проживающих на территории Красноярского края. Была установлена ассоциация между наличием минорных вариантов полиморфизмов rs1799945 и rs1800730 гена *HFE* и НАЖБП у пациентов с метаболическим синдромом.

В Восточной Сибири распространены аллель T и генотип AT полиморфизма гена *HFE* (rs1800730) среди пациентов с НАЖБП при метаболическом синдроме. Эспрессируемые белки полиморфных локусов гена *HFE* вызывают нарушения обмена железа и развитие НАЖБП. Изучение полиморфных локусов генетических предикторов развития НАЖБП при метаболическом синдроме позволит выявить и сформировать группу больных с высоким риском развития тяжелых осложнений для их ранней диагностики и профилактики.

Литература/References

- Madaleine G., Majumdar A. Metabolic associated fatty liver disease: Addressing a new era in liver transplantation. *World J Hepatol.* 2020;12(12):1168-1181. <https://doi.org/10.4254/wjh.v12.i12.1168>
- Vernon G., Baranova A., Younossi Z.M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34(3):274-285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x>
- European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;64(6):1388-1402. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>
- Qian L., Dhyani M., Grajo J., et al. Current status of imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2018;10(8):530-542. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i8.530>
- Yki-Jarvinen H., Luukkonen P., Hodson L., Moore J. Dietary carbohydrates and fats in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18(11):770-786. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00472-y>
- Speliotes E., Yerges-Armstrong L.M., Wu J., et al. Genome-Wide Association Analysis Identifies Variants Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease That Have Distinct Effects on Metabolic Traits. *PLoS Genet.* 2011;7(3):e1001324. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001324>
- Basyte-Bacevice V., Skieceviciene J., Valantiene I., et al. TM6SF2 and MBOAT7 Gene Variants in Liver Fibrosis and Cirrhosis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1277. <https://doi.org/10.3390/ijms20061277>
- Kumari M., Schoiswohl G., Chittraju C., et al. Adiponutrin Functions as a Nutritionally Regulated Lysophosphatidic Acid Acyltransferase. *Cell Metab.* 2012;15(5):691-702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.008>
- Xia M., Lin H., Chen L., et al. The PNPLA3 rs738409 C>G variant interacts with changes in body weight over time to aggravate liver steatosis, but reduces the risk of incident type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2019; 62:644-654. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4805-x>
- Delik A., Akkiz H., Sadik D. The effect of PNPLA3 polymorphism as gain in function mutation in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Indian J Gastroenterol.* 2020; 39(1):84-91. <https://doi.org/10.1007/s12664-020-01026-x>
- Corridani E., Buzzetti E., Dongiovanni P., et al. Ceruloplasmin gene variants are associated with hyperferritinemia and increased liver iron in patients with NAFLD. *J Hepatol.* 2021;75(3):506-513. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.03.014>
- Billesbolle C., Azumaya C., Kretsch R., et al. Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms. *Nature.* 2020;586(7831):807-811. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2668-z>
- Ye Q., Qian B., Yin W., et al. Association between the HFE C282Y, H63D Polymorphisms and the Risks of Non Alcoholic Fatty Liver Disease, Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis of 5,758 Cases and 14,741 Controls. *PLoS One.* 2016;11(9):e0163423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163423>
- Nelson J., Brunt E., Kowdley K. Lower serum hepcidin and greater parenchymal iron in nonalcoholic fatty liver disease patients with C282Y HFE mutations. *Hepatology.* 2012;56(5):1730-1740. <https://doi.org/10.1002/hep.25856>
- Lebron J., Bennett M., Vaughn D., et al. Crystal Structure of the Hemochromatosis Protein HFE and Characterization of Its Interaction with Transferrin Receptor. *Cell.* 1998;93(1):111-123. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81151-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81151-4)
- Katsarou M.S., Papasavva M., Latsi R., Drakoulis N. Chapter Ten - Hemochromatosis: Hereditary hemochromatosis and HFE gene. In: Litwack G, editor. *Iron Metabolism: Hepcidin.* California: Academic Press; 2019. p. 201-222. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.01.010>
- Delik A., Akkiz H., Sadik D., et al. The effect of PNPLA3 polymorphism as gain in function mutation in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Indian J Gastroenterol.* 2020;39(1):84-91. <https://doi.org/10.1007/s12664-020-01026-x>

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.06.38-50>

Разработка универсальной панели STR-маркеров для проведения ПГТ-М муковисцидоза с учетом специфического гаплотипа хромосом, несущих вариант F508del гена CFTR

Соловьёва Е.В., Склеимова М.М., Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Скрябин Н.А.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики,
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук
634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, д. 10

Введение. Преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) развивается как вариант ранней дородовой профилактики наследственных заболеваний. Таргетный вариант ПГТ моногенного заболевания (ПГТ-М) предусматривает сочетание анализа патогенного генетического варианта и косвенных ДНК-маркеров. Перечень сцепленных с геном *CFTR* ДНК-маркеров для целей ПГТ муковисцидоза (МВ) варьирует у разных авторов.

Цель: разработка панели STR-маркеров для ПГТ МВ.

Методы. С использованием данных литературы, баз данных выбраны внутригенные и внегенные STR-маркеры, сцепленные с геном *CFTR*. Панель маркеров протестирована на образцах ДНК семи семей с МВ, в которых заболевание обусловлено патогенным вариантом F508del. Только в одной семье второй мутацией была *CFTR*dele2,3(21kb). Для тестирования применяли методы ПЦР и фрагментного анализа на генетическом анализаторе.

Результаты. Подобрана панель из 15 основных и 4 дополнительных STR-маркеров. Основная панель STR была достаточно информативна для большинства образцов родителей – носителей патогенного варианта гена *CFTR*. Дополнительная панель потребовалась в связи с тем, что в одном из изученных образцов наблюдалась низкая информативность по косвенным маркерам вследствие особого гаплотипа, выявленного у одного из обследованных.

Заключение. Разработанная нами панель, учитывающая специфический F508del – гаплотип, может служить основой ПГТ МВ.

Ключевые слова: ПГТ-М, муковисцидоз, *CFTR*, F508del, STR, преимплантационное генетическое тестирование моногенных болезней.

Для цитирования: Соловьёва Е.В., Склеимова М.М., Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Скрябин Н.А. Разработка универсальной панели STR-маркеров для проведения ПГТ-М муковисцидоза с учетом специфического гаплотипа хромосом, несущих вариант F508del гена *CFTR*. *Медицинская генетика* 2023; 22(6): 38-50.

Авторы для корреспонденции: Соловьёва Елена Викторовна; **e-mail:** elena.soloveva@medgenetics.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский центр Российской академии наук; 1021032420800-1-3.1.2).

Конфликт интересов: Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила 01.06.2023

Development of a universal STR panel for PGT-M for cystic fibrosis, taking into account the specific haplotype of chromosomes carrying the CFTR F508del variant

Soloveva E.V., Skleimova M.M., Minaycheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Skryabin N.A.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences
10, Naberejnaya Ushaiki, Tomsk, 634050, Russian Federation

Background. Preimplantation genetic testing (PGT) is developing as a variant of early prenatal prevention of hereditary diseases. Targeted variant PGT for monogenic disease (PGT-M) involves a combination of pathogenic variant and indirect DNA markers analysis. The list of DNA markers linked to the *CFTR* gene for the purposes of cystic fibrosis PGT (PGT CF) varies by different authors.

Aim: development of a panel of STR-markers for PGT CF.

Methods Intragenic and extragenic STR markers linked to the *CFTR* gene were selected using scientific literature data and databases. The panel of markers was tested on DNA samples from seven families with CF, in which the disease is caused by the pathogenic F508del variant. Only one family had *CFTR*dele2,3(21kb) as the second mutation. For testing, PCR and fragment analysis methods were used.

Results. 15 main and 4 additional STR markers have been selected for a panel. Most of the samples of the parents carrying the pathogenic variant of the *CFTR* gene confirmed the sufficient information content of the main STR panel. An additional panel was required due

to the fact that one of the studied samples revealed low information rate for linked markers because of a special haplotype of the chromosome carrying the normal allele.

Conclusions. The developed panel, taking into account the specific F508del haplotype, can serve as a basis for PGT CF.

Keywords: PGT-M, cystic fibrosis, *CFTR*, F508del, STR, preimplantation testing for monogenic/single gene defects.

For citation: Soloveva E.V., Skleimova M.M., Minaycheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Skryabin N.A. STR panel for preimplantation genetic testing for cystic fibrosis, taking into account the specific haplotype of chromosomes carrying the *CFTR* F508del variant. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(6): 38-50 (In Russ.)

Corresponding author: Elena V. Soloveva; **e-mail:** elena.soloveva@medgenetics.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Accepted: 01.06.2023

Введение

Преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) на моногенные заболевания (ПГТ-М) — одно из новых актуальных направлений профилактики тяжелых наследственных заболеваний. При ПГТ-М генотипирование полученных с применением методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) эмбрионов проводится на ранних стадиях до имплантации и позволяет выбрать эмбрион с нормальным генотипом для переноса в полость матки.

Муковисцидоз (МВ) является частым тяжелым наследственным заболеванием и с момента внедрения ПГТ в клиническую практику занимает ведущие позиции по частоте проведения ПГТ-М в мире [1, 2]. Результаты клинического применения ПГТ на МВ были опубликованы и в России [3, 4]. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу, его причиной служат мутации гена *CFTR* (трансмембранного регулятора муковисцидоза; OMIM 602421), расположенного в локусе 7q31.2 [5]. Преобладающим патогенным вариантом гена *CFTR* во всем мире является с.1521_1523delCTT (p.Phe508del), который традиционно обозначается как F508del. В России его частота составляет около 52,8% в объединенной выборке больных МВ. На втором месте в России патогенный вариант *CFTR*dele2,3(21kb) — 6,2% [6]. Несмотря на успехи лечения МВ, актуальной остается дородовая диагностика заболевания. Основным преимуществом ПГТ по сравнению с пренатальной диагностикой является возможность выявления заболевания на максимально ранних сроках. Это позволяет предотвратить наступление беременности плодом с патологическим генотипом и существенно снижает вероятность прерывания беременности.

ПГТ МВ проводится в семьях высокого генетического риска в отношении МВ. Такое тести-

рование не является скринингом и выполняется в отношении конкретных патогенных вариантов для определенной семьи [6, 7]. ПГТ-М в отношении *CFTR*-ассоциированных заболеваний, которые нельзя отнести к тяжелым, — спорный вопрос и требует отдельного рассмотрения [7, 8]. Важнейшее значение при планировании и проведении ПГТ-М имеет медико-генетическое консультирование супружеской пары.

При выполнении ПГТ-М рекомендовано сочетание прямого анализа патогенного варианта и косвенной диагностики по сцепленным с геном полиморфным ДНК-маркерам во избежание ошибок тестирования, связанных с малым количеством образца ДНК эмбриона [6, 7, 9]. Готовых тест-систем для ПГТ МВ до настоящего времени не предложено, перечень применяемых ДНК-маркеров варьирует у разных авторов и в разных лабораториях. В качестве косвенных ДНК-маркеров применяются микросателлиты или STR (короткие tandemные повторы, short tandem repeats), либо SNP (однонуклеотидные полиморфизмы, single nucleotide polymorphisms). Распространенность SNP в геноме человека выше, однако STR-маркеры более полиморфны, для них характерен множественный аллелизм. Для целей ПГТ-М число используемых STR может быть меньше, чем SNP [9].

Некоторые ДНК-маркеры, сцепленные с геном *CFTR*, изучены лучше и чаще применяются для дородовой диагностики МВ, популяционных и эволюционных исследований МВ-хромосом [10, 11, 12]. Ранее в нашем исследовании приведены результаты анализа шести внутригенных и двух внегенных полиморфных STR-маркеров хромосом, несущих патогенные варианты F508del и *CFTR*dele2,3(21kb) гена *CFTR* [13]. F508del-хромосомы имеют особый гаплотип и содержат некоторые аллели, имеющие невысокую частоту в общей популяции. Также было показано, что хромо-

сомы с гомозиготными вариантами генотипов F508del характеризуются высокой степенью гомозиготности по внутригенным STR-маркерам, и для целей дородовой диагностики может быть полезно привлечение внегенных микросателлитов [13].

Технологические платформы генетического тестирования при ПГТ-М быстро развиваются и в настоящее время включают возможности полногеномной амплификации (WGA, whole genome amplification) и секвенирования нового поколения (NGS, next generation sequencing) наряду с таргетным подходом, основанном на тестировании патогенного варианта и сцепленных ДНК-маркеров [9]. Полногеномные технологии позволяют сочетать ПГТ-М с ПГТ на анеуплоидию (ПГТ-А). В то же время необходимо учитывать, что целью ПГТ-М, в частности в отношении МВ, служит преимущественно выявление точковых мутаций, а коммерческие полногеномные технологии на основе NGS пока адаптированы только к задачам ПГТ-А. Таргетный вариант, который в настоящее время комбинируют с WGA, на сегодняшний день остается основным подходом ПГТ-М и позволяет обеспечить надежность тестирования.

Целью настоящего исследования явилась разработка панели STR-маркеров для ПГТ-М МВ.

Методы

Подбор STR для ПГТ-М проводили из числа полиморфных ди-тетрануклеотидных STR, сцепленных с геном *CFTR*, на основании рекомендаций литературы, результатов собственных предшествующих исследований, а также поиска дополнительных STR в базах данных [7, 13, 14, 15]. После определения перечня ДНК-маркеров проводили подбор олигонуклеотидных праймеров методом ПЦР и фрагментного анализа. Анализ каждого ДНК-маркера отрабатывался сначала на тестовой ДНК, в дальнейшем проводилось исследование образцов ДНК членов семей пациентов с МВ.

Для проведения исследования использовали образцы геномной ДНК, выделенной из венозной крови. Выделение ДНК проводили сорбционным методом с помощью набора реагентов «ДНК-сорб-В» (Амплисенс, Россия). Всего обследовано 25 человек из 7 ядерных семей с МВ у ребенка. Семьи проходили обследование и стационарное лечение детей в Медико-генетическом центре (Генетической клинике) НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Из обследованных семей только одна обратилась за планированием беременности с целью ЭКО с ПГТ МВ. Осталь-

ные были приглашены специально для участия в настоящем исследовании по разработке расширенной панели косвенных маркеров для ПГТ МВ. В исследование включены семьи, в которых МВ обусловлен патогенным вариантом F508del гена *CFTR*. Семь пациентов были гомозиготами по F508del (в одной семье два ребенка) и один ребенок – компаунд-гетерозигота F508del/CFTRdele2,3(21kb). Средний возраст обследованных матерей составил 34,5 года, отцов – 37,1 лет, больных детей – 5,8 лет; все семьи были европеоидными. Дополнительно в исследование включены здоровые сибсы (два ребенка) и бабушка из одной семьи.

Семьи прошли медико-генетическое консультирование относительно возможности применения результатов исследования для ПГТ-М, получены информированные согласия. Патогенные варианты (F508del и CFTRdele2,3(21kb) были проверены у всех включенных в исследование лиц. Всего в ходе исследования изучено 50 хромосом и 29 гаплотипов неродственных индивидумов, из которых 14 содержали патогенный аллель (F508del – 13 хромосом, CFTRdele2,3(21kb) – 1) и 15 – нормальный (аллель дикого типа без выявленного патогенного варианта, принадлежащий лицу без диагноза МВ).

Молекулярно-генетическое исследование проводили методом ПЦР с флуоресцентно мечеными праймерами. Состав реакции включал 0,13 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 1,5 мМ MgCl₂, 6% ДМСО (диметилсульфоксида), буфер для Taq ДНК-полимеразы, 0,005% крезолового красного. На реакцию использовали по 1 пмоль каждого праймера (F и R), 0,9 ед. Taq или Hot Start Taq ДНК-полимеразы (СибЭнзим) и 1 мкл ДНК (6-20 нг/мкл). Часть последовательностей олигонуклеотидных праймеров брали из электронного ресурса STS. Для большей части локусов выполняли собственный дизайн праймеров; поиск последовательностей проводили с использованием электронного ресурса «UCSC genome browser» [14]. Для трех STR были использованы праймеры из базы UniSTS (в настоящее время не поддерживается; D7S677 UniSTS:18390; D7S486 UniSTS:1556; D7S522 UniSTS:48216). Для проверки патогенного варианта CFTRdele2,3(21kb) использовали праймеры по [10] с образованием фрагмента 210 п.н. при делеции и его отсутствием в норме. Для анализа поли-Т полиморфизма интрона 9 применяли двухраундовую ПЦР по ранее описанной схеме [16]. Во всех сериях амплификации использовали отрицательный контроль. В общей сложности в ходе настоящего исследования проведено более 400 реакций на STR.

Детекцию проводили методами полиакриламидного гель-электрофореза (7%, буфер TBE: трис-борат-ЭДТА) для первоначальной оценки амплификации и капиллярного гель-электрофореза на генетическом анализаторе «3130xl» (Applied Biosystems, США) или «Нанофор 05» (Синтол, Россия). При проведении капиллярного электрофореза на анализаторе ПЦР-продукты комбинировали по 2-4 STR на капилляр. В качестве контрольных образцов при фрагментном анализе STR-маркеров применяли ПЦР-фрагменты данного локуса с разными аллелями, используя их в качестве аллельной лестницы. Аллели STR-маркеров выражали в размерах амплифицируемых фрагментов (п.н.), для обозначения аллелей интрона 6 и последовательности поли-Т интрона 9 использовали число повторов.

Исследование было проведено с использованием ресурсов коллекции биологического материала «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ и оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

Результаты

С целью создания таргетной системы ПГТ МВ нами проработан перечень STR-маркеров локуса 7q31.2, тесно сцепленных с геном *CFTR*, а именно патогенным вариантом F508del. Такая панель необходима для гаплотипирования хромосом, несущих патогенные и нормальные аллели в обследуемой семье перед ПГТ-М с целью обеспечения точности и надежности диагностики при анализе малого количества ДНК. В панель включены только STR, для которых удалось достичь надежной амплификации и интерпретации результатов. В состав панели входит наиболее частый патогенный вариант при МВ – F508del. В **табл. 1** представлены перечень и характеристика ДНК-маркеров, подобранных нами для ПГТ МВ. Также в **табл. 1** представлены данные по гетерозиготности STR, полученные в ходе настоящего исследования.

В состав панели вошли 15 основных и 4 дополнительных ДНК-маркеров. Из основных маркеров 6 являются внутригенными интронными STR. Девять STR –внегенные, фланкирующие ген *CFTR* (4 с одной стороны и 5 с другой) на расстоянии, не превышающем 1,3-1,6 млн п.н. Для описанных в литературе и базах данных STR применяли, преимущественно, зарегистрированные названия. Для дополнительно найденных нами маркеров использовали собственное обо-

значение (плечо хромосомы и первые цифры локализации в геноме на основании GRCh38/hg38).

Из перечня панели STR (**табл.1**) девять входят в список ДНК-маркеров, часто применяемых при ПГТ МВ: IVS1(AC), D7S677, IVS9(AC), IVS20(AC), D7S486, D7S633, D7S2460, D7S2502, D7S2847 [7]. Часть STR была включена нами в панель тестирования на основании наших предыдущих данных по достаточной гетерозиготности для носителей F508del: IVS6 (AATC), IVS9 (поли-Т), D7S655 [13]. Для региона downstream от гена *CFTR* подобрано три дополнительных STR. Четыре upstream STR включены в качестве дополнительной панели.

Последовательности олигонуклеотидных праймеров и размеры фрагментов, полученные на основании обследования 7 семей с МВ в ходе настоящего исследования, представлены в **табл. 2**. Для четырех маркеров дополнительной панели пределы варьирования изучены только для трех семей.

Поскольку за методическую основу тестирования взят фрагментный анализ ПЦР-продуктов, один из праймеров в паре имел флуоресцентную метку FAM или R6G для удобства комбинирования фрагментов при капиллярном электрофорезе. Примеры результатов фрагментного анализа патогенного варианта, динуклеотидного STR интрона 1 и тетра-нуклеотидного STR представлены на **рисунке**.

Для удобства анализа патогенного варианта в ходе детекции в программе «Gene Mapper» были настроены бины на нормальный и мутантный аллель (**рисунок, А**). Каждый из исследованных микросателлитов имеет свои особенности профиля пиков при фрагментном анализе. Анализ STR часто осложнен присутствием статтеров или послепиков на электрофореграмме. В большинстве случаев они не мешают интерпретации результатов (интрон 1 на **рисунке, Б**). Для некоторых локусов возможна сложная для интерпретации форма пика. Три- и тетра-нуклеотидные STR чаще дают легко интерпретируемые пики (7q1184, **рис. В**). Однако выбор STR для ПГТ-М ограничен наличием определенных STR в интересующей области и меньшим уровнем гетерозиготности три- и тетра-нуклеотидных STR.

Все локусы из основной панели были протестированы на образцах ДНК семи супружеских пар, имеющих детей с МВ. В связи с тем, что для ПГТ-М основное значение имеет достаточное число фланкирующих информативных ДНК-маркеров, в **табл. 3** полученные результаты представлены в виде информативности (гетерозиготности) и неинформативности (гомозиготности) исследованных STR.

Таблица 1. STR-маркеры для ПГТ-М МВ

Table 1. STR markers for cystic fibrosis PGT-M

	Название локуса	Локализация ¹	Повтор	Локализация в геноме (старт, GRCh38/hg38)	Гетерозиготность ²	
					[15, 16]	N=14
*	7q1155	2,0	AT	chr7:115545635	0,8	-
*	7q1158 (D7S2502)	1,7	AC	chr7:115818137	0,8	-
*	7q1159	1,6	AC	chr7:115946397	0,7	-
*	7q1161 (D7S2543)	1,4	AC	chr7:116163057	0,6	-
1	D7S486	1,3	AC	chr7:116254748	0,8	0,8
2	D7S522	1,1	AC	chr7:116432742	0,7	0,8
3	D7S2460	0,8	AC	chr7:116767962	0,7	0,6
4	D7S633	0,2	AC	chr7:117370805	0,6	0,7
5	CFTR IVS1	Интрон 1	AC	chr7:117490313	0,7	0,8
6	CFTR D7S677	Интрон 1	AC	chr7:117499430	0,6	0,8
7	CFTR IVS6	Интрон 6	AATC	chr7:117536515	0,3	0,7
8	CFTR IVS9 AC	Интрон 9 (8)	AC	chr7:117548334	0,4	0,8
9	CFTR IVS9 T	Интрон 9 (8)	T	chr7:117548629	0,3	0,9
	CFTR F508del	Экзон 11 (10)	-			
10	CFTR IVS20 AC	Интрон 20 (17b)	AC	chr7:117612007	0,4	0,5
11	7q1177	0,2	AC	chr7:117773649	0,9	0,9
12	7q1179	0,4	AC	chr7:117999222	0,8	0,9
13	7q1184	0,9	AGAT	chr7:118464804	0,7	0,7
14	D7S655	1,5	AC	chr7:119028265	0,6	0,9
15	D7S2847	1,6	AGAT	chr7:119179487	0,8	1,0

Примечание: ¹ – Для внегенных локусов – расстояние от патогенного варианта F508del в млн п.н., для внутригенных – обозначение интронов и экзонов по современной номенклатуре (в скобках – традиционное); ² – гетерозиготность по данным «WebSTR» для европейской популяции (для поли-Т последовательности интрона 9 по данным Маркова с соавт. 2017) и по результатам настоящего исследования для носителей F508del; * – STR-маркеры дополнительной панели.

Индивидуальная сумма информативных STR подсчитана с каждой стороны от патогенного варианта в экзоне 11 для всех носителей F508del и интроне 1 для носителя CFTRdele2,3(21kb), соответственно. Максимальное число информативных маркеров составило 9 и 6 у женщины из семьи 5, минимальное – 0 и 3 у мужчины в семье 4. Достаточное число информативных маркеров (от 3 до 9) с каждой стороны от патогенного варианта было выявлено у всех родителей из обследованных семей за исключением вышеуказанного мужчины из семьи 4.

Общее число информативных STR-маркеров, представленных в табл. 3, также проанализировано индивидуально по каждому микросателлиту. Расчетные значения гетерозиготности по этим данным вынесе-

ны в табл. 1. Минимальная гетерозиготность составила 0,5 для AC-повторов интрона 20, максимальная – 1,0 (D7S2847). Большинство маркеров в обследованной выборке носителей подтвердили достаточный уровень информативности – выше 0,70.

В обследованных семьях были обнаружены некоторые особенные аллели и варианты генотипов. Так, для гетерозиготных по CFTRdele2,3(21kb) генотипов была характерна гемизиготность по локусу D7S677 интрона 1, который попадает в область делеции. В то же время в предшествующем локусе IVS1 AC присутствовали оба аллеля. В одной из семей нами обнаружен редкий аллель полиморфизма поли-Т интрона 9 – 11Т. Данный аллель выявлен в F508del-хромосоме у матери и у больного МВ ребенка. Семья прожива-

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры для анализа STR-маркеров, сцепленных с геном *CFTR*, и размеры амплифицируемых фрагментов

Table 2. Oligonucleotide primers for analysis of STR markers linked to the *CFTR* gene and sizes of amplified fragments

	Название	F / R	Последовательность, 5' -3'	Размер фрагмента, п.н.
1	CFTR F508del	F	gtgattatgggagaactgga	N=158, del=155
		R	FAM-tttgatgacgcttctgtatct	
2	CFTR IVS1	F	tgaacctcagctactctcgt	232-244
		R	FAM- ttggacttgttagccatcat	
3	CFTR D7S677	F	FAM-atcattcactatgggatagc	del, 278-292
		R	gaattacaagctactctatacaaaa	
4	CFTR IVS6	F	R6G-gcccatctgttgaataaaag	6 Rep=203 7 Rep=207
		R	ccagcagtatgccttaacag	
5	CFTR IVS9 AC	F	gtgtttatgtaccccgctta	166-184
		R	R6G-acggtttctagaggacatga	
6	CFTR IVS20 AC	F	R6G-catattggtgaaggctccta	260-272
		R	atttgaaaaacatggcactt	
7	D7S486	F	R6G-aaaggccaatggtatatccc	134-150
		R	gccaggtgattgatagtc	
8	D7S522	F	FAM-gccaaactgccacttctc	218-224
		R	acgtgttatgccactccc	
9	D7S633	F	FAM-tgggagtcctttaacagta	344-350
		R	aggcagattgatcacatgag	
10	D7S655	F	aatggtgctggaacaattag	154-172
		R	FAM-ctagtggttttggtttga	
11	D7S2460	F	agtgactaccagtatcact	187-191
		R	FAM-gataccaaaggacacatggt	
12	D7S2847	F	ttcacctcagaagatttgc	188-212
		R	FAM-agccacatagtgagggtttt	
13	7q1155*	F	R6G-ctttagggatcctctca	300-312
		R	atgagcatgaacaagacct	
14	7q1158*	F	FAM-ccagtggttttagtcattgt	243-261
		R	tgatgctcatggttgaaa	
15	7q1159*	F	FAM-gctcttcagaccctaaatgt	350-358
		R	gaaagaaggaaagcaagc	
16	7q1161*	F	aacacagaggcaacatatgt	158-164
		R	R6G-tttgtaagcctacattgcct	
17	7q1177	F	atgaatgtctggaggacaag	257-274
		R	FAM-tgaccaggctttctattgt	
18	7q1179	F	gctttatgcccagttttc	243-264
		R	R6G-aaaataaattcccacccta	
19	7q1184	F	ggtcacatccaattgagtt	289-301
		R	R6G-gtacaggcaaacaggctact	

Примечание: * – STR дополнительной панели; N – нормальный аллель; Rep – число повторов, del – отсутствие аллеля при патогенном варианте CFTRdele2,3(21kb).

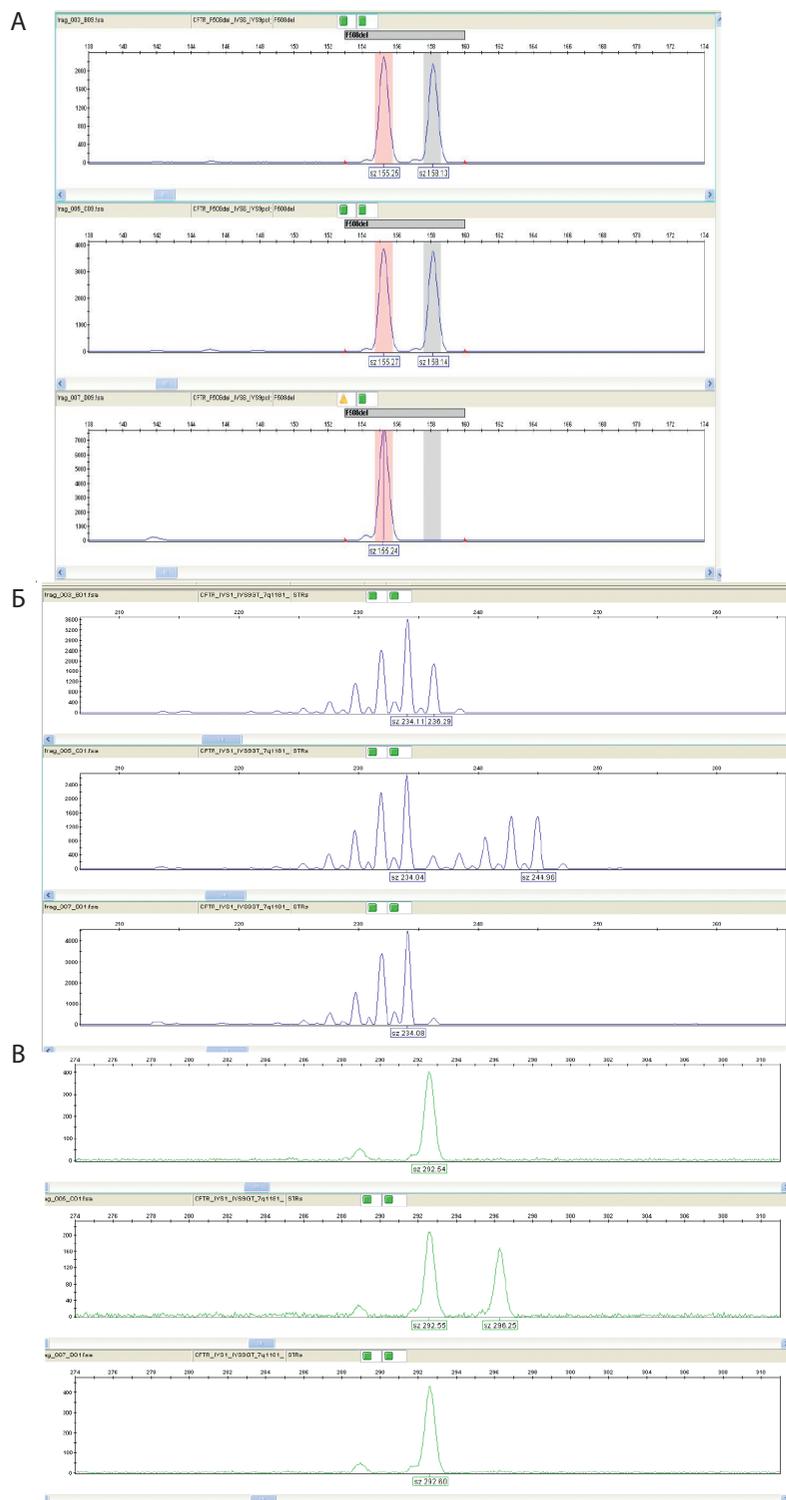


Рисунок. Примеры результатов фрагментного анализа продуктов ПЦР патогенного варианта F508del гена *CFTR* в семье (А: красным бином обозначен мутантный аллель, серым – нормальный; FAM), внутригенного динуклеотидного STR интрона 1 (Б; FAM) и тетра nukлеотидного внегенного STR локуса 7q1184 (Б; R6G); образцы: отец, мать, ребенок.

Figure. Examples of the fragment analysis of PCR products of the pathogenic F508del variant of the *CFTR* gene (A: the red bin denotes the mutant allele, the gray bin denotes the normal one; FAM), the intra-genic dinucleotide STR in intron 1 (Б; FAM), and the tetranucleotide extragenic STR in 7q1184 (Б; R6G).

ет в Кемеровской области, заболевание у ребенка заподозрено по результатам неонатального скрининга и характеризуется преимущественно кишечными проявлениями; диагноз поставлен в возрасте 1 года. Помимо одного случая 11Т во всех остальных изученных в нашем исследовании F508del-хромосомах выявлялся аллель 9Т.

В табл. 4 представлены детальные данные гаплотипирования семьи (проживают в Томской области; один из родителей отца немец), в которой разработанная нами стандартная панель STR-маркеров не позволила выявить достаточное для ПГТ-М число информативных маркеров у супруга. В связи с данным случаем была предложена дополнительная панель из четырех STR-маркеров; результаты также представлены в табл. 4.

В представленной в табл. 4 семье один ребенок болен МВ и имеет гомозиготный генотип по F508del,

второй ребенок здоров и является носителем материнской хромосомы с патогенным вариантом F508del. Как видно из результатов гаплотипирования семьи, F508del-несущие хромосомы, демонстрируют практически одинаковые гаплотипы по изученным внутригенным STR и различаются только по динуклеотидному полиморфизму AC(GT) интрона 9. По внутригенным STR материнская и отцовская хромосомы у больного МВ ребенка различимы только по данному полиморфизму. По внегенным маркерам отцовская и материнская хромосомы имеют достаточно различий. В данной семье полностью неинформативен только один STR-маркер – AC-повтор интрона 20. В обследованной семье ДНК матери (D1564) демонстрирует много информативных STR, однако в образце отца обнаружено большое число гомозиготных, неинформативных вариантов по изученным STR основной панели. Отцовский гаплотип хромосомы с нормальным

Таблица 3. Информативность (гетерозиготность) STR-маркеров у обследованных супружеских пар – носителей патогенного варианта гена *CFTR* (F508del для всех, за исключением одного родителя с CFTRdele2,3(21kb))

Table 3. Informativeness (heterozygosity) of STR-markers in the examined couples – carriers of the pathogenic variant of the *CFTR* gene (F508del for all, except for one parent with CFTRdele2,3(21kb))

STR	1 (F4)		2 (F100)		3 (F104)		4 (F115)		5 (F149)		6 (F277)		7 (F479)		Всего информ.
	О	М	О*	М	О	М	О	М	О	М	О	М	О	М	
1 D7S486							н					н	н		11
2 D7S522	н						н		н						11
3 D7S2460						н	н		н		н		н		9
4 D7S633	н	н			н		н								10
5 IVS1						н	н		н						11
6 D7S677					н		н						н		11
7 IVS6			н		н		н						н		10
8 IVS9 AC					н		н						н		11
9 IVS9 T			н				н								12
Всего информ.	7	8	6*	9	5	7	0	9	6	9	9	7	8	5	
10 IVS20 AC		н		н		н	н	н	н			н			7
11 7q1177				н			н								12
12 7q1179	н														13
13 7q1187		н					н				н		н		10
14 D7S655				н					н						12
15 D7S2847															14
Всего информ.	5	4	6	3	6	5	3	5	4	6	5	5	5	6	

Примечание: О – отец, М – мать; * носитель патогенного варианта CFTRdele2,3(21kb); серая заливка и «н» – неинформативный STR (гомозигота).

аллелем оказался похож на гаплотип F508del-несущей хромосомы. Вследствие выявленных особенностей гаплотипов, гомозигота по F508del (D3374) и гетерозиготный носитель (D3376) фактически неразличимы по достаточно протяженному фрагменту внутригенных и внегенных локусов с одной стороны от патогенного варианта, соответственно, входящие в эту область STR не позволяют различить хромосомы, несущие нормальный и патогенный аллели.

Дополнительная панель полиморфных микросателлитных маркеров была разработана в связи с выявленными особенностями F508del-подобного гаплотипа у отца в семье F115 (табл. 4). В табл. 4 представлены результаты гаплотипирования семьи по четырем дополнительным STR. Расширение панели STR по-

зволило выявить три информативных STR upstream от патогенного варианта. В приложении к ПГТ МВ это позволит четко различать отцовские хромосомы с патогенным вариантом и без него для обеих фланкирующих F508del областей.

Нами проводилась валидация подобранной панели STR на тестовых WGA-продуктах для фрагментов трофэктодермы преимплантационных эмбрионов, а также единичных лимфоцитов без полногеномной амплификации. Однако во всех этих случаях использовали двухраундовую ПЦР.

Все обследованные семьи включали полное трио – мать, отец и ребенок. В отдельных случаях генотипы по STR всех членов семьи представляли собой одинаковые гомозиготы, что позволяет сделать вывод об их

Таблица 4. Детальные результаты гаплотипирования одной из обследованных семей с использованием основной и дополнительной панелей STR

Table 4. Detailed results of family haplotyping using the main and additional STR panels

		Гаплотипы семьи F115				
	Название локуса	Отец (D3375)	Мать (D1564)	Ребёнок, МВ (D3374)	Ребёнок, (D3376)	
1*	7q_1155	312/304	312/302	312/302	304/302	
2*	7q_1158	243/261	260/261	243/261	261/261	
3*	7q_1159	354/354	354/350	354/350	354/350	
4*	7q_1161	158/162	162/162	158/162	162/162	
1	D7S486	144/144	146/134	144/134	144/134	
2	D7S522	224/224	218/224	224/224	224/224	
3	D7S2460	187/187	191/189	187/189	187/189	
4	D7S633	346/346	344/346	346/346	346/346	
5	CFTR	IVS1	234/234	236/234	234/234	234/234
6		D7S677	284/284	278/284	284/284	284/284
7		IVS6	6/6	7/6	6/6	6/6
8		IVS9 AC	182/182	168/170	182/170	182/170
9		IVS9 полиТ	9Т/9Т	7Т/9Т	9Т/9Т	9Т/9Т
		F508del	m/N	N/m	m/m	N/m
10	IVS20 AC	264/264	264/264	264/264	264/264	
11	7q_1177	267/267	271/269	267/269	267/269	
12	7q_1179	254/250	246/258	254/258	250/258	
13	7q_1184	289/289	289/297	289/297	289/297	
14	D7S655	170/172	154/168	170/168	172/168	
15	D7S2847	196/188	196/188	196/188	188/188	

Примечание: полужирным шрифтом и подчеркиванием отмечены аллели мутантных хромосом; серой заливкой отмечены гомозиготные локусы; * – дополнительная панель маркеров.

информативности, но не позволяет их гаплотипировать без дополнительных данных. Включение в исследование других членов семьи позволяет подтвердить сцепление и гаплотипировать гетерозиготные в трио локусы. Например, локус D7S2847 в семье (табл.4) гаплотипирован благодаря включению в исследование образца здорового ребенка-носителя (D3376).

Обсуждение

Основной молекулярно-генетических исследований при таргетном варианте ПГТ-М является сочетание прямой и косвенной диагностик [6, 7, 9]. Первым этапом такой технологии обычно служит поиск полиморфных STR, тесно сцепленных с причинным геном. Далее стандартно следует тестирование подобранных STR на образцах ДНК семьи, с целью выбора информативных в отношении хромосомы, содержащей патогенный аллель. Информативность полиморфных STR индивидуальна, и информативные в одной семье ДНК-маркеры могут быть неинформативны для другой, что, в том числе, демонстрируют и наши данные (табл.3). Стандартных таргетных панелей для ПГТ-М ни для каких заболеваний до настоящего времени фактически не разработано.

В нашем исследовании проведена разработка достаточно широкой панели STR-маркеров для косвенной диагностики МВ в ходе ПГТ-М. Панель включает 6 *CFTR*-внутригенных и 9 внегенных STR-маркеров в пределах 1,6 млн п.н. с каждой стороны от гена *CFTR* (табл. 1). Также предложена дополнительная панель из 4-х STR в пределах 2 млн п.н. согласно рекомендациям «ESHRE PGT Consortium» [9]. Проверка панели выполнена с привлечением образцов отягощенных семей, в которых МВ обусловлен мажорным патогенным вариантом F508del гена *CFTR*. Только в одной семье были разные патогенные варианты – материнский F508del и отцовский *CFTR*dela2,3(21kb). Предполагается, что данная панель может служить универсальной базой таргетного подхода ПГТ МВ не только для случаев патогенного варианта F508del, но и других патогенных вариантов. При этом потребуется дополнение системы исследования дизайном и проверкой конкретного патогенного варианта.

Полученные нами данные о гетерозиготности STR, сцепленных с геном *CFTR* (табл. 1), не отражают российскую популяцию ввиду специфичности выборки – включены исключительно носители патогенного варианта гена, а также небольшого объема выборки. Других данных о частотах изученных нами микросателлитов

в российской популяции в доступной литературе нами не найдено. Для целей ПГТ-М гетерозиготность соответствует информативности. Детальные данные по информативности для каждой семьи представлены в табл. 3. Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что во всех семьях за исключением одной выявлено достаточно число информативных STR (табл. 3).

При разработке систем ДНК-маркеров для ПГТ-М обычно выбор делается в пользу маркеров с высоким популяционным уровнем гетерозиготности [9]. В то же время гетерозиготность в семьях по определенным сцепленным с геном STR может отличаться от популяционных значений вследствие наследования гаплотипов, характерных для частых мутаций. В своем исследовании мы фиксировали определенные различия по частоте гетерозиготности в общей европейской популяции по данным электронного ресурса WebSTR и в нашей группе носителей патогенного варианта гена *CFTR*. Для части локусов мы обнаружили более высокие показатели гетерозиготности у носителей F508del в сравнении с популяционными данными, в частности для D7S677, интрона 6, интрона 9 (табл. 1). Это связано с тем, что во всех F508del-содержащих хромосомах присутствовали более редкие для общей популяции аллели. Очевидно, что особенности гаплотипа хромосом, несущих патогенные варианты, следует учитывать для оценки гетерозиготности носителей, особенно по внутригенным STR. Полученные в настоящем исследовании данные согласуются с ранее полученными собственными результатами на другой выборке МВ-носителей для внутригенных маркеров [13]. Для AC-повторов интрона 20 нами выявлен невысокий уровень гетерозиготности (0,5), сопоставимый с популяционным (0,4) и собственными более ранними данными (0,3). Данный STR может расцениваться как менее значимый для ПГТ МВ.

Внутригенные ДНК-маркеры часто рекомендованы как приоритетные для косвенной дородовой диагностики как пренатальной, так и преимплантационной в связи с их более тесным сцеплением с патогенным вариантом. Однако в определенных случаях применение внутригенных маркеров может иметь ограничения. При гомозиготном состоянии по F508del невозможно различить материнскую и отцовскую хромосомы по большинству внутригенных STR вследствие специфического F508del-гаплотипа. Это демонстрируют результаты как предыдущих исследований [13], так и настоящего исследования (табл. 4). Особый риск для ПГТ МВ несет невозможность различить по внутригенным STR носительство и комбинацию гомозиготного по мутации генотипа эм-

бриона с контаминацией родительской ДНК. Внегенные маркеры более полиморфны на F508del-содержащих хромосомах и дают возможность преодолеть проблему специфичного F508del-гаплотипа при ПГТ-М.

Детальный анализ STR-профиля F508del-несущих хромосом, разрабатываемого для целей ПГТ-М, в свою очередь предоставляет новые сведения для популяционной и эволюционной генетики МВ.

При применении панели STR непосредственно в ПГТ-М анализ локусов должен сочетаться с предшествующей WGA либо выполняться в «гнездовой» (nested) ПЦР. Для клинического использования обязательным является предварительный этап валидации системы тестирования на единичных клетках. Проработанные нами косвенные STR-маркеры могут быть использованы не только для преимплантационной, но и для пренатальной диагностики. В случае пренатальной диагностики такой объем косвенных ДНК-маркеров не требуется, поскольку она не связана с экстремально низкими концентрациями ДНК, как ПГТ-М. При использовании нашей системы молекулярного тестирования на большей выборке границы размеров выявляемых фрагментов, указанных в табл. 2 будут, очевидно, расширены.

Систему амплификации при ПГТ-М не следует перегружать ДНК-маркерами. В ПГТ-М включают исключительно информативные локусы. Согласно рекомендациям ESHRE PGT Consortium обычно достаточным является наличие двух информативных маркеров с каждой стороны от патогенного варианта [9]. Число маркеров зависит от применяемой системы (например, комбинации с WGA), частоты ADO (выпадения аллеля, allele drop out). На практике лаборатории часто увеличивают число сцепленных с исследуемым геном ДНК-маркеров для повышения точности диагностики. Помимо ADO к факторам риска ошибок ПГТ-М, связанным с малым количеством ДНК, относится плохая амплификация отдельных локусов, преимущественная амплификация одного аллеля, контаминация родительской или неродственной ДНК. Микросателлиты могут не всегда иметь простые для интерпретации пики амплификации (статтеры, послепики). В связи с этим конкретной семье после ее гаплотипирования по предложенной нами основной панели мы можем рекомендовать выбрать по 2-4 полностью информативных, фланкирующих патогенный вариант STR-маркера с надежной интенсивностью амплификации на единичных клетках и, по возможности, хорошо интерпретируемой формой пиков.

Некоторые сложные в исследовании полиморфизмы также можно отнести к менее приоритетным для ПГТ-М. Поли-Т полиморфизм — достаточно хорошо изученный

ДНК-маркер, подходящий для косвенной диагностики МВ [13, 16]. Известна ассоциация F508del с 9Т-аллелем. Гетерозиготность этого локуса в общей популяции не высока. Так, в российской популяции (N=2261) она составила всего около 0,3 в связи с преобладанием генотипа 7Т/7Т [16]. Однако в группе носителей гетерозиготность по поли-Т полиморфизму существенна и составила 0,9 (табл.3). В то же время анализ данного полиморфизма несколько сложнее, чем других локусов нашей панели. Для идентификации аллелей 5, 7 или 9Т требуются двухраундовая ПЦР и контрольные образцы с известными генотипами. Детали поли-Т тестирования не приведены в настоящем исследовании, так как детально описаны в более ранней публикации [16].

При проведении настоящего исследования в одной из семей в F508del-хромосоме обнаружен редкий аллель 11Т интрона 9. Ранее в собственных исследованиях такого аллеля выявлено не было [13, 16]. В литературе описаны единичные случаи аллеля 11Т, его частота и клиническое значение до настоящего времени не ясны [17].

К поли-Т полиморфизму интрона 9 непосредственно примыкают полиморфные AC(GT)-повторы. Теоретически, для дородовой диагностики МВ можно было бы использовать анализ комплексного аллеля «AC+поли-Т», однако для F508del-гаплотипа это не представляется целесообразным. Так, аллель 9Т преимущественно сцеплен с аллелем из 10 повторов AC, а наиболее распространенным в хромосомах, несущих нормальный аллель, вариантом является 11AC+7Т, что в сумме не даёт различий в размере фрагментов. Поэтому эти аллели лучше исследовать отдельно, либо отличным от фрагментного анализа методом. Анализ как поли-Т полиморфизма интрона 9, так и примыкающих AC может усложнять ПГТ-М. При наличии достаточного числа информативных маркеров данные полиморфные локусы можно не включать в ПГТ-М МВ. В настоящее исследование мы не включали GT(AC)-повторы, непосредственно примыкающие к поли-Т, однако включали другие более полиморфные и достаточно информативные для гетерозиготных F508del-носителей CA-повторы интрона 9.

Дополнительная панель STR-маркеров разработана нами в связи с возможностью столкнуться с редкими генотипами и гаплотипами при подготовке к ПГТ-М с высоким уровнем гомозиготности по ДНК-маркерам. В связи с этим информативных для ПГТ-М STR-маркеров может оказаться недостаточно. Так, в нашем исследовании в одной из 7 семей у мужчины мы обнаружили особый гаплотип хромосомы с нормальным аллелем,

который имел большое сходство с F508del-гаплотипом (табл. 4, образец ДНК D3375). У этого мужчины выявлено большое число гомозиготных STR-маркеров и, соответственно, недостаточное число информативных STR из основной панели с одной стороны от патогенного варианта. Распространенность такого F508del-подобного гаплотипа в российской популяции не ясна. На основании относительно редкой частоты ряда аллелей, характерных для F508del-хромосом (например, аллель 9T интрона 9 встречается в популяции с частотой около 9%), можно предполагать, что F508del-подобный гаплотип является относительно редким, по крайней мере в европейских популяциях. С помощью STR-маркеров дополнительной панели информативные маркеры для описанного семейного случая найдены.

Альтернативой таргетному подходу ПГТ МВ, на который ориентирована предлагаемая нами панель STR-маркеров, служат полногеномные методы ПГТ-М. Потенциально полногеномное секвенирование способно установить большинство мутаций гена. Однако приложения для ПГТ, основанные на NGS, разработаны пока только для выявления хромосомных нарушений и имеют ограничения в отношении разрешающей способности. Ни одна современная коммерческая полногеномная система для ПГТ не гарантирует выявление моногенных заболеваний. В отдельных исследованиях проводятся адаптация NGS к задачам ПГТ-М и проработка выявления патогенных вариантов в комбинации с минигаплотипами по SNP-маркерам. Так, в исследовании S. Chamaoui с соавт. предложена стратегия универсального подхода ПГТ МВ в отношении любой мутации гена *CFTR* в комбинации с ПГТ-А методом NGS [18]. Подход авторов подразумевает прямое секвенирование гена *CFTR* с анализом 38 тесно сцепленных с геном SNP (34 внутригенных и 4 внегенных) с первоначальной мультиплексной амплификацией фрагментов гена и фланкирующих областей. Авторы приводят данные о ПГТ для 17 супружеских пар с риском МВ, результатах тестирования 109 эмбрионов после первоначальной полногеномной амплификации [18]. Используемые исследователями SNP, хотя и были преимущественно внутригенными, показали достаточную информативность и позволили зафиксировать ADO в ходе тестирования.

Использование NGS длинных фрагментов ДНК потенциально позволяет проводить гаплотипирование хромосом, несущих патогенные варианты, без семейного анализа. С использованием такого подхода в исследовании D. Dilernia с соавт. проанализированы 14 образцов ДНК пациентов с МВ, гомози-

готных и компаунд-гетерозиготных по F508del [19]. Авторы показали, что F508del-несущие хромосомы демонстрируют чрезвычайно консервативный внутригенный гаплотип, что согласуется с результатами нашего исследования в отношении внутригенного STR-профиля F508del-хромосом.

Несмотря на мощность методов NGS, предлагаемое сочетание внегенных и внутригенных STR-маркеров имеет определенные преимущества в отношении косвенной диагностики при ПГТ-М. Панель STR позволяет охватывать интересующую в отношении МВ область гаплотипирования меньшим числом «реперных» полиморфных ДНК-маркеров. Наши данные подтверждают достаточную полиморфность и информативность 15 внутригенных и внегенных STR для выявления родительских хромосом, несущих патогенный и нормальный генетические варианты, а также артефактов амплификации. По результатам проведенного исследования достаточная степень гетерозиготности всех включенных в панель STR подтвердилась. Исключение составил один случай с особым генотипом, для которого потребовалось включение дополнительных STR. Мы рекомендуем дополнительную панель *CFTR*-сцепленных STR, если по результатам обследования семьи с использованием основной панели у кого-то из супругов, планирующих ЭКО с ПГТ-М, не будет обнаружено достаточное число информативных маркеров, в частности, при носительстве патогенной F508del-хромосомы в сочетании с F508del-подобным гаплотипом хромосомы, несущей нормальный аллель.

Литература

1. Harper J.C., Wilton L., Traeger-Synodinos J. et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Human Reproduction Update*. 2012;18(3):234–247. doi:10.1093/humupd/dmr052.
2. van Montfoort A., Carvalho F., Coonen E. et al. ESHRE PGT Consortium data collection XIX–XX: PGT analyses from 2016 to 2017. *Human Reproduction Open*. 2021;00(0):1–10. doi:10.1093/hropen/hoab024.
3. Базанов П.А., Гоголевский П.А., Гоголевская И.К. и др. Первые успешные результаты проведения в России преимплантационной генетической диагностики муковисцидоза. *Медицинская генетика*. 2009;2:25–29.
4. Соловьёва Е.В., Назаренко Л.П., Татару Д.А. и др. Профилактика муковисцидоза и применение вспомогательных репродуктивных технологий. Сб. тез. XIV Национального конгресса «Актуальные проблемы муковисцидоза». 2019, Красноярск: 38–39. <https://mukoviscidoz.org/doc/kongress/kongress-tezis-2019.pdf>
5. OMIM *602421. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR. <https://omim.org/entry/602421>
6. Национальный консенсус (2-е издание) «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» 2018 / Под ре-

- дакцией Кондратьевой Е.И., Каширской Н.Ю., Капанова Н.И. – М: ООО «Компания БОРГЕС». 2018; 356. <https://mukoviscidoz.org/doc/konsensus/2019/konsensus-2019-bez-rentgenogramm.pdf>
- Girardet A., Viart V., Plaza S. The improvement of the best practice guidelines for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis: toward an international consensus. *European Journal of Human Genetics*. 2016;24:469–478. doi:10.1038/ejhg.2015.99.
 - Bienvenu T., Lopez M., Girodon E. Molecular Diagnosis and Genetic Counseling of Cystic Fibrosis and Related Disorders: New Challenges. *Genes*. 2020;11(6):619. doi:10.3390/genes11060619
 - ESHRE PGT-M Working Group, Filipa Carvalho F., Moutou C, Dimitriadou E. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Human Reproduction Open*. 2020:1–18. doi:10.1093/hropen/hoaa018.
 - Ивашенко Т.Э., Баранов В.С. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. *Интермедика*, Санкт-Петербург. 2002:256.
 - Furgeri D.T., Marson F.A.L., Correia C.A.A. et al. Cystic fibrosis transmembrane regulator haplotypes in households of patients with cystic fibrosis. *Gene*. 2018;30(641):137–143. doi: 10.1016/j.gene.2017.10.052.
 - Petrova N.V., Kashirskaya N.Y., Vasilyeva T.A. et al. High frequency of complex CFTR alleles associated with c.1521_1523delCTT (F508del) in Russian cystic fibrosis patients. *BMC Genomics*. 2022;23:252. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08466-z>.
 - Маркова Е.В., Татару Д.А. STR-маркеры хромосом, несущих мутации F508del и CFTRdele2,3(21kb) гена CFTR. *Медицинская генетика*. 2017;16(6):9–20.
 - UCSC genome browser. <https://genome.ucsc.edu/index.html>
 - WebSTR: a population-wide database of short tandem repeat variation in humans <http://webstr.ucsd.edu/>
 - Маркова Е.В., Татару Д.А., Преда О.Г. Фрагментный анализ полиморфизма (TG)mTn интрона 8 гена CFTR. *Медицинская генетика*. 2017; 16(1):11–19.
 - Kobler D., Modi H., Goldman B. Identification of an 11T allele in the polypyrimidine tract of intron 8 of the CFTR gene. *Genet Med*. 2006;8(2):125–8. doi:10.1097/01.gim.0000200217.85820.47.
 - Chamayou S., Sicali M., Lombardo D. et al. Universal strategy for preimplantation genetic testing for cystic fibrosis based on next generation sequencing // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020: 37:213–222. doi.org/10.1007/s10815-019-01635-2.
 - Dilernia D., Amin P., Flores J. et al. Mutation profiling of the c.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator allele using haplotype-resolved long-read next generation sequencing. 2022. 43(5):595–603. doi: 10.1002/humu.24352.
 - implantation genetic diagnosis for cystic fibrosis in Russia.] *Medicinskaya genetika [Medical genetics]*. 2009;2:25–29. (In Russ.)
 - Soloveva E.V., Nazarenko L.P., Tataru D.A. et al. Profilaktika mukoviscidoza i primeneniye vspomogatel'nykh reproduktivnykh tekhnologij. [Prevention of cystic fibrosis and the use of assisted reproductive technologies]. Abstract XIV National Congress «Actual problems of cystic fibrosis». Krasnoyarsk. 2019:38–39. (In Russ.) <https://mukoviscidoz.org/doc/kongress/kongress-tezis-2019.pdf>
 - OMIM #602421. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR. <https://omim.org/entry/602421>
 - Nacional'nyj konsensus (2-e izdanie) «Mukoviscidoz: opredeleniye, diagnosticheskie kriterii, terapiya» / Pod redakciej Kondrat'evoy E.I., Kashirskoj N.Y.U., Kapranova N.I. – М: ООО «Компания БОРГЕС» [National consensus (2nd edition) «Cystic fibrosis: definition, diagnostic criteria, therapy» / Edited by Kondratieva E.I., Kashirskaya N.Y., Kapranov N.I. - М: BORGES]. 2018; 356. (In Russ.) <https://mukoviscidoz.org/doc/konsensus/2019/konsensus-2019-bez-rentgenogramm.pdf>
 - Girardet A., Viart V., Plaza S. The improvement of the best practice guidelines for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis: toward an international consensus. *European Journal of Human Genetics*. 2016;24:469–478. doi:10.1038/ejhg.2015.99.
 - Bienvenu T., Lopez M., Girodon E. Molecular Diagnosis and Genetic Counseling of Cystic Fibrosis and Related Disorders: New Challenges. *Genes*. 2020;11(6):619. doi:10.3390/genes11060619
 - ESHRE PGT-M Working Group, Filipa Carvalho F., Moutou C, Dimitriadou E. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Human Reproduction Open*. 2020:1–18. doi:10.1093/hropen/hoaa018.
 - Ivashchenko T.E., Baranov V.S. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза [Biochemical and molecular genetic basis of the cystic fibrosis pathogenesis]. *Intermedica*, St. Petersburg. 2002:256. (In Russ.)
 - Furgeri D.T., Marson F.A.L., Correia C.A.A. et al. Cystic fibrosis transmembrane regulator haplotypes in households of patients with cystic fibrosis. *Gene*. 2018;30(641):137–143. doi: 10.1016/j.gene.2017.10.052.
 - Petrova N.V., Kashirskaya N.Y., Vasilyeva T.A. et al. High frequency of complex CFTR alleles associated with c.1521_1523delCTT (F508del) in Russian cystic fibrosis patients. *BMC Genomics*. 2022;23:252. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08466-z>.
 - Markova E.V., Tataru D.A. STR-маркеры хромосом, несущих мутации F508del и CFTRdele2,3(21kb) гена CFTR. [STR markers of chromosomes carrying F508del and CFTRdele2,3(21kb) mutations of CFTR gene]. *Medicinskaya genetika [Medical genetics]*. 2017;16(6):9–20. (In Russ.)
 - UCSC genome browser. <https://genome.ucsc.edu/index.html>
 - WebSTR: a population-wide database of short tandem repeat variation in humans <http://webstr.ucsd.edu/>
 - Markova E.V., Tataru D.A., Preda O.G. Fragmentnyj analiz polimorfizma (TG)mTn introna 8 гена CFTR. [CFTR fragment analysis of intron 8 (TG)mTn polymorphism.] *Medicinskaya genetika [Medical genetics]*. 2017; 16(1):11–19. (In Russ.)
 - Kobler D., Modi H., Goldman B. Identification of an 11T allele in the polypyrimidine tract of intron 8 of the CFTR gene. *Genet Med*. 2006;8(2):125–8. doi:10.1097/01.gim.0000200217.85820.47.
 - Chamayou S., Sicali M., Lombardo D. et al. Universal strategy for preimplantation genetic testing for cystic fibrosis based on next generation sequencing // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020: 37:213–222. doi.org/10.1007/s10815-019-01635-2.
 - Dilernia D., Amin P., Flores J. et al. Mutation profiling of the c.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator allele using haplotype-resolved long-read next generation sequencing. 2022. 43(5):595–603. doi: 10.1002/humu.24352.

References

- Harper J.C., Wilton L., Traeger-Synodinos J. et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Human Reproduction Update*. 2012;18(3):234–247. doi:10.1093/humupd/dmr052.
- van Montfoort A., Carvalho F., Coonen E. et al. ESHRE PGT Consortium data collection XIX–XX: PGT analyses from 2016 to 2017. *Human Reproduction Open*. 2021;00(0):1–10. doi:10.1093/hropen/hoab024.
- Bazanov P.A., Gogolevsky P.A., Gogolevskaya I.K. et al. Pervye uspehnyye rezul'taty provedeniya v Rossii preimplantacionnoj geneticheskoy diagnostiki mukoviscidoza. [The first successful results of pre-

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.06.51-61>

Кожно-скелетный синдром с гипофосфатемией: первое в России клиническое описание двух случаев заболевания с генетической верификацией диагноза

Куликова К.С.^{1,2}, Райкина Е.Н.², Толмачева Е.Р.³, Померанцева Е.А.³

1 – ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

2 – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России
117036, г. Москва, ул. Дм. Ульянова, д.11

3 – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова»
Минздрава России
117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

Кожно-скелетный синдром с гипофосфатемией (КССГ), или синдром сального невуса, – это редкая форма гипофосфатемического рахита, обусловленная потерей фосфора из-за аномально повышенного уровня фактора роста фибробластов 23 в результате соматической мутации в одном из генов цепи RAS (*HRAS*, *NRAS*, *KRAS*). Клинические проявления КССГ, помимо рахита, включают врожденные эпидермальные, меланоцитарные или сальные невусы и очаговые поражения костей ипсилатеральнее невусов. Сложность генетической диагностики заболевания заключается в необходимости поиска мутаций в материале пораженных тканей (кость, эпидермис). Пациенты с данным заболеванием подвержены высокому риску инвалидизации из-за выраженной мышечной гипотонии, остеомалации, переломов костей и сложности коррекции тяжелой гипофосфатемии. Впервые в отечественной практике приведены клинические наблюдения двух неродственных пациентов с КССГ и подтвержденным молекулярно-генетически диагнозом.

Ключевые слова: *HRAS*, *NRAS*, *KRAS*, гипофосфатемический рахит, фактор роста фибробластов 23, гипофосфатемия, гиперфосфатурия, кожно-скелетный синдром с гипофосфатемией, эпидермального невуса синдром.

Для цитирования: Куликова К.С., Райкина Е.Н., Толмачева Е.Р., Померанцева Е.А. Кожно-скелетный синдром с гипофосфатемией: первое в России клиническое описание двух случаев заболевания с генетической верификацией диагноза. *Медицинская генетика* 2023; 22(6): 51-61.

Авторы для корреспонденции: Куликова Кристина Сергеевна; **e-mail:** kristinakulikova@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 01.06.2023

Cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome: the first clinical description of two cases with genetic verification in Russia

Kulikova K.S.^{1,2}, Raikina E.N.², Tolmacheva E.R.³, Pomerantseva E.A.³

1 – Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

2 – National Medical Research Center for Endocrinology
11, Dm. Ulyanova st., Moscow, 117036, Russian Federation

3 – National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology Named after V.I. Kulakov, of the Ministry of Healthcare of Russian Federation
4, Oparina st., Moscow, 117997, Russian Federation

Cutaneous-skeletal hypophosphatemia syndrome (CSHS) or Epidermal nevus syndrome (ENS) associated with hypophosphatemic rickets is a rare variation of hypophosphatemic rickets caused by phosphate wasting due to elevated fibroblast growth factor-23 (FGF23) as a result of somatic gain-of-function variants in the *HRAS*, *NRAS*, or *KRAS* genes. Clinical symptoms of CSHS, besides rickets, are congenital epidermal, melanocytic and sebaceous nevus as well as focal bone lesions ipsilateral to nevus. What makes genetic diagnosis of this condition extremely problematic is the necessity of location of mutations in the affected tissues (bones, epidermis). Such patients have a high risk of becoming disabled due to severe hypotonia, osteomalacia, bone fractures and difficulties associated with treatment of severe hypophosphatemia. The first two clinical cases of two unrelated patients with such condition have been performed in Russia. Both patients have CSHS confirmed by genetic testing.

Keywords: *HRAS*; *NRAS*; *KRAS*; hypophosphatemic rickets; fibroblast growth factor 23; hypophosphatemia; hyperphosphaturia; epidermal nevus syndrome; cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome.

For citation: Kulikova K.S., Raikina E.N., Tolmacheva E.R., Pomerantseva E.A. Cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome: the first clinical description of two cases with genetic verification in Russia. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(6): 51-61. (In Russ.)

Corresponding author: Kulikova Kristina; e-mail kristinakulikova@gmail.com

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Accepted: 1.06.2023

Введение

Синдром Шиммельпеннинга-Фейерштейна-Мимса (ОМIM 163200), также известный как синдром линейного сального невуса, представляет собой врожденное мультисистемное заболевание, вызванное соматическими мутациями, возникающими *de novo* в генах *HRAS*, *NRAS* или *KRAS*. Данный синдром характеризуется врожденными линейными сальными невусами в сочетании с аномалиями различных органов нейроэктодермального происхождения. Сочетание линейного сального невуса с гипофосфатемическим рахитом (ГФР) объединено в кожно-скелетный синдром с гипофосфатемией (КССГ). ГФР при данном синдроме развивается из-за аномально высокой секреции фактора роста фибробластов 23 (fibroblast growth factor 23, FGF23) в клетках диспластичной кости.

Aschinberg L. с соавт. впервые в 1977 г. описали 5-летнего мальчика с эпидермальными невусами и ГФР [1]. Особенностью поражения костей у пациентов с КССГ является сочетание рахитических изменений костной ткани с фиброзно-кистозной дисплазией. В 2014 году Avitan-Hersh E. с соавт. представили первый генетически подтвержденный случай КССГ: у пациента была обнаружена гетерозиготная мутация p.G13R в гене *HRAS* [2]. К настоящему времени в литературе представлено описание более 60 случаев КССГ с мутациями в генах *HRAS* (p.G13R) и *NRAS* (p.G12C, p.G13R, p.Q61R, p.Q61L)[2-8].

Современные способы лечения пациентов с КССГ включают многократный ежедневный прием препаратов фосфора в сочетании с аналогами активных метаболитов витамина D. Перспективным методом лечения может быть применение моноклональных антител к FGF23 или ингибиторов пути митоген-активируемой протеинкиназы MAPK/внеклеточной сигнал-регулируемой киназы ERK (МЕК-ингибиторы) [2-8].

Нами впервые в России проведено молекулярно-генетическое подтверждение диагноза у пациентов с КССГ: у двоих детей в материале невуса обнаружены соматические мутации в генах *HRAS* и *NRAS*.

Законные представители пациентов дали добровольное информированное согласие на обследование

и публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме в журнале «Медицинская генетика».

Описание клинических случаев

Пациент 1.

Мальчик от неблизкородственного брака, от 1 физиологично протекавшей беременности, оперативных родов. Родился с массой тела 2780 г, длиной тела 48 см. Мама пациента наблюдается с диагнозом рассеянный склероз с 27 лет, отец здоров. С рождения у ребенка отмечались плотные множественные невусы на волосистой части головы, на спине, руках, животе, ногах по линиям Блашко, местами сливающиеся, возвышающиеся над уровнем кожи (рис. 1, 2). Появления новых элементов за время наблюдения не отмечалось. Мальчик с первого года жизни наблюдался неврологом по поводу левостороннего гемипареза.

На первом году жизни у ребенка отмечалось отставание в моторном развитии: начал уверенно держать голову и ходить в кроватке с 1 года. С 1 года 2 месяцев родители заметили появление у ребенка рахитических «браслетов» на руках, с 1 год 4 месяцев – постепенное угасание двигательных функций с полным регрессом ходьбы через 1 месяц. Известно, что со 2 месяца жизни у мальчика манифестировал синдром мальабсорбции, в связи с чем он был переведен с грудного вскармливания на смесь на основе гидролизата белка.

Впервые мальчик был обследован в возрасте 1 года 8 месяцев. При осмотре обращали на себя внимание выраженная задержка роста (рост 70,7 см, SDS роста -4,33), отсутствие самостоятельной ходьбы, наличие множественных невусов, выраженных рахитических деформаций скелета в виде «браслетов» на руках, «четок» на ребрах, значительно увеличенный живот за счет выраженной мышечной гипотонии и повышенного газообразования (рис. 1). Также мальчик предъявлял жалобы на боль при опоре на ноги, что вместе с гипотонией ограничивало его возможность самостоятельно передвигаться. Нервно-психическое развитие ребенка

не отставало. При обследовании было зафиксировано значительное снижение уровня фосфора в крови, повышение активности щелочной фосфатазы (ЩФ), нормальные показатели кальция и паратгормона (ПТГ). В анализе мочи выявлена гиперфосфатурия (табл. 1). По данным рентгенографии костей верхних и нижних конечностей были зафиксированы тяжелые поражения костной ткани в виде сочетания рахитических изменений с кистозно-фиброзной дисплазией. Показатель тяжести рахитических изменений (Rickets Severity Scale) зон метафизов трубчатых костей имел максимальное значение 10 баллов (рис. 3). На основании полученных данных был установлен диагноз КССГ, инициирована терапия препаратами фосфора и активными метаболитами витамина D. На фоне проводимого лечения отмечалась умеренная положительная динамика: снизилась мышечная слабость, уменьшился болевой синдром и ребенок начал самостоятельно ходить на короткие дистанции. Однако на фоне данного лечения у мальчика усилился синдром мальабсорбции,

стул был водянистый до 10 раз в день. Развитие данного побочного эффекта ограничило возможность увеличивать дозу препаратов фосфора и, соответственно, снизить активность рахитического процесса не представлялось возможным. Пациент был обследован в гастроэнтерологическом стационаре, где были выполнены гастро- и колоноскопия с биопсией, по результатам которых органической причины синдрома мальабсорбции не выявлено. Через 1,5 года у мальчика возобновились жалобы на слабость и боль в ногах, из-за чего он перестал ходить. В настоящее время ребенок продолжает получать препараты фосфора в дозе 40-60 мг/кг/сутки и альфакальцидола 0,75 мкг/сутки. Несмотря на проводимое лечение в течение 4 лет достичь значимого улучшения состояния и показателей крови у ребенка не удалось (табл. 1), рахитические изменения костной ткани остаются значительной степени выраженности (рис. 3).

В возрасте 5 лет ребенку было проведено молекулярно-генетическое исследование: в образцах иссе-



Рис. 1. Внешний вид пациента 1. Невусы, расположенные по линиям Блашко.

Fig. 1. Patient 1, phenotype. Nevi located along Blaschko's lines.



Рис. 2. Участки алопеции в зоне невусов у пациента 1.

Fig. 2. Areas of alopecia in the area of nevi in patient 1.

ченного невуса выявлена ранее описанная мутация p.Gln61Arg в гене *HRAS*, доля мутантного аллеля составила 62% (284 из 459 прочтений). Других патогенных или вероятно-патогенных вариантов не было выявлено. Таким образом, диагноз КССГ был подтвержден молекулярно-генетически. Для молекулярно-генетического анализа проводилось секвенирование полного экзона методом массового параллельного секвенирования (МПС). Геномную ДНК выделяли из мате-

риала соскоба и образцов иссеченного невуса. Поиск осуществлялся по генам, ассоциированным с фенотипами, а также непосредственно в генах *HRAS*, *NRAS*, *KRAS*. Секвенирование проводилось на секвенаторе NovaSeq 6000, Illumina. Оценка клинической значимости (патогенности) выявленных вариантов выполнялась на основе рекомендаций ACMG и российских рекомендаций по интерпретации данных, полученных методами МПС [9, 10]. Для оценки популяционных ча-

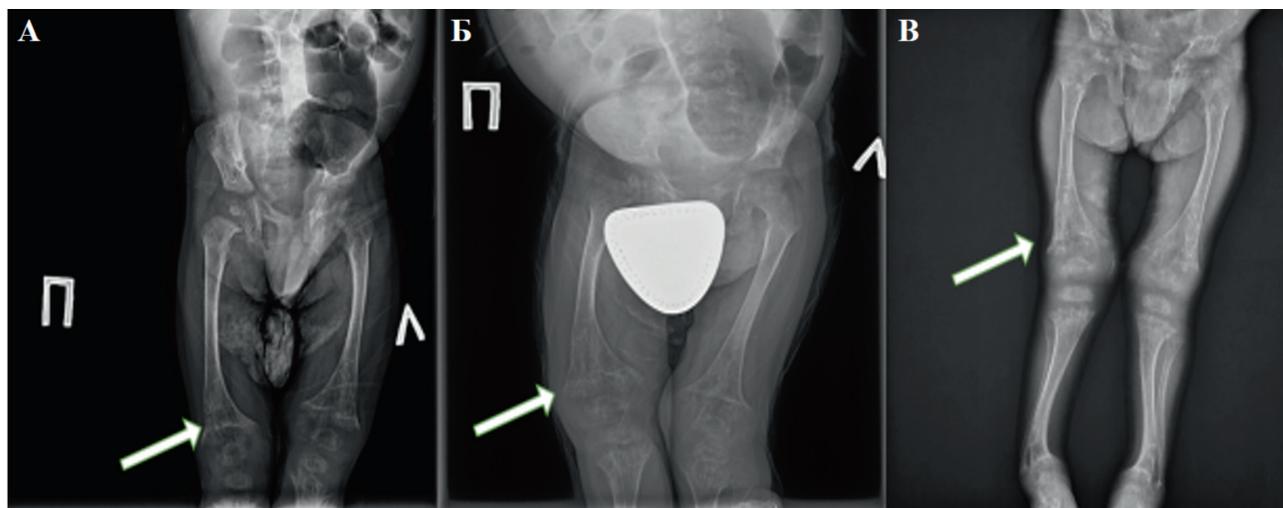


Рис. 3. Рентгенография пораженных костей нижних конечностей пациента 1 на фоне терапии. А - рентгенограмма пациента в 3 года; Б – рентгенограмма пациента в 4 года; В – рентгенограмма пациента в 5 лет. Белыми стрелками указаны зоны поражения костной ткани.

Fig. 3. X-ray of the affected bones of the lower extremities of patient 1 during therapy. А – X-ray of the patient at the age of 3 years; Б – X-ray of the patient at the age of 4 years; В – X-ray of a patient at the age of 5 years. White arrows indicate the affected areas of the bone tissue.

Таблица 1. Биохимические показатели пациента 1

Table 1. Biochemical parameters of patient 1

Параметр	На момент постановки диагноза	Через 1 год (терапия: препарат фосфора 50 мг/кг/сутки, альфакальцидол 0,75 мкг/сутки)	Через 3 года (терапия: препарат фосфора 40-60 мг/кг/сутки, альфакальцидол 0,75 мкг/сутки)
Фосфор сыв., ммоль/л (норма:1,45-1,78)	0,61	-	0,47
Щелочная фосфатаза сыв., Ед/л (норма:156-369)	1298	1277	1024
Кальций общий сыв., ммоль/л (норма:2,25-2,75)	2,35	2,58	2,14
Паратгормон сыв., пг/мл (норма:15-65)	60,52	49,57	56,56
Максимум тубулярной реабсорбции фосфатов к скорости клубочковой фильтрации, ммоль/ммоль (норма:1,15-1,73)	0,39	-	-

стот выявленных вариантов использована база данных Genome Aggregation Database (gnomAD).

Пациент 2.

Мальчик рожден от 3 беременности, протекавшей на фоне анемии, хламидиоза, угрозы прерывания, плацентомегалии, хронического пиелонефрита. Роды оперативные на 39 неделе с нормальными росто-весовыми показателями (3750 г, 52 см). Родители и старший ребенок в семье здоровы. С рождения отмечались множественные гигантские невусы на лице, спине, верхних и нижних конечностях, груди (рис. 4), по поводу которых был неоднократно оперирован. Психомоторное развитие с задержкой: стоял у опоры с 1,5 лет, самостоятельная ходьба с 2 лет, со слов матери «на носочках».

В возрасте 6 лет в результате прыжка с небольшой высоты получил перелом левой бедренной кости, установлена металлоконструкция, после чего появилось укорочение левой конечности. В 2018 году зафиксирован повторный перелом левой бедренной кости.

С 7 лет на протяжении двух лет мальчик получал терапию ибандроновой кислотой по 1 капельнице каждые 4 месяца. Всего было выполнено 6 курсов введения данного препарата без видимого эффекта.

В возрасте 8 лет ребенок впервые был обследован в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» с жалобами на деформации ног, невозможность самостоятельно ходить, хроническую боль в ногах и мышечную слабость. При осмотре выявлена задержка роста (рост 114,7 см, SDS роста -2,25), деформация левой бедренной кости по типу «посоха», X-образная деформация правой нижней конечности, деформация позвоночника, укорочение левой ноги, рахитические «браслеты» на руках, множественные пигментные невусы, половое развитие по Таннер 1. По результатам лабораторного обследования зафиксированы гипофосфатемия, повышение уровня ЩФ в крови и гиперфосфатурия (табл. 2). По данным рентгенографии выявлены рахитические изменения зон метафизов костей верхних и нижних конечностей в сочетании с кистозно-фиброзной дисплазией (рис. 5). Показатель рахитических изменений (Rickets Severity Scale) трубчатых костей имел значение 9 баллов. По совокупности данных пациенту был установлен диагноз КССГ. При проведении генетического анализа в образцах иссеченного невуса выявлена мутация p.Gln61Arg в гене *NRAS*, доля альтернативного аллеля составила 19% (20 из 104 прочтений).

Мальчику была назначена терапия препаратами фосфорного буфера (48 мг/кг/сутки по элементарному фосфору) в сочетании с альфакальциолом (0,75

мкг/сутки), на фоне которой отмечалось увеличение двигательной активности и снижение выраженности мышечной слабости и болевого синдрома. Однако несмотря на проводимое лечение улучшения структуры костной ткани незначительны и сохраняется необходимость использования средств поддержки при ходьбе. При динамическом обследовании через 4 года по данным ультразвукового исследования у пациента обнаружены признаки нефрокальциноза, по результатам МСКТ – признаки множественных кист до 10 мм и объемных образований до 10 мм в паренхиме левой почки, по фазам сканирования с контрастом 60-70-85-90 НУ. Биопсия данных образований не проводилась.

Обсуждение

КССГ относится к группе заболеваний, связанных с мутациями в генах RAS-цепи. Семейство генов



Рис. 4. Внешний вид пациента 2, возраст 11 лет.

Fig. 4. Patient 2, phenotype, 11 years old.

RAS (Retrovirus Associated DNA Sequences) включает 3 гена: *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*. Первые два гена получили название от своих гомологов, выделенных из линий вирусов мышинной саркомы Kirsten и Harvey, последний был идентифицирован в клеточной линии нейробластомы. Каскадная последовательность реакций сигнального пути *RAS* действует как выключатель, определяющий регуляцию генной экспрессии, требующуюся для реализации деления или дифференцировки клетки. Гены *RAS* известны своей ролью в канцерогенезе,

стимулируя пролиферацию клеток через MAP-киназный путь [4]. Активирующие миссенс-мутации в кодонах 12 (глицин), 13 (глицин) и 61 (глутамин) всех генов *RAS* обнаруживаются при большом количестве раковых заболеваний: меланоме, раке кишечника, печени, легких, поджелудочной железы и мочевого пузыря [11].

ГФР в структуре КССГ относится к FGF23-зависимой гипофосфатемии [12, 13]. FGF23 представляет собой белок, обычно секретируемый остеоцитами, который регулирует гомеостаз как фос-

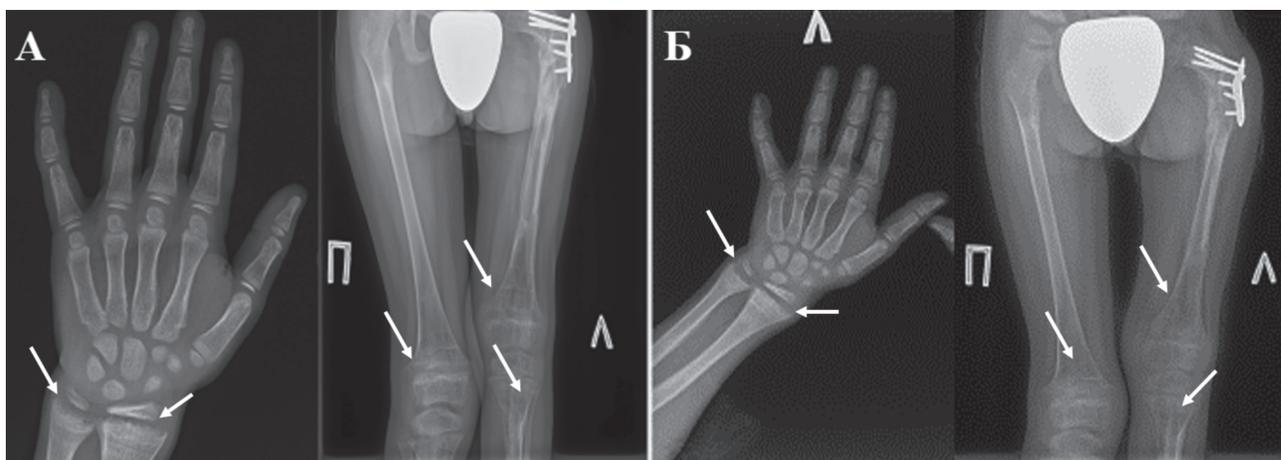


Рис. 5. Рентгенография пораженных конечностей пациента 2 на фоне терапии. А – рентгенография верхних и нижних конечностей в возрасте 9 лет; Б – рентгенография в возрасте 11 лет. Белыми стрелками указаны зоны поражения костной ткани.

Fig. 5. X-ray of the affected limbs of patient 2 during therapy. А – X-ray of the upper and lower extremities at the age of 9 years; Б – X-ray at the age of 11 years. White arrows indicate areas of bone tissue damage.

Таблица 2. Биохимические показатели пациента 2

Table 2. Biochemical parameters of patient 2

Параметр	На момент постановки диагноза	Через 3 месяца (терапия: препарат фосфора 48 мг/кг/сутки, альфа-кальцидол 0,75 мкг/сутки)	Через 3 года (терапия: препарат фосфора 24,6 мг/кг/сутки, альфакальцидол, 0,75 мкг/сутки)
Фосфор сыв., ммоль/л (норма: 1,45-1,78)	0,64	0,51	1,48
Щелочная фосфатаза сыв. крови, Ед/л (норма: 156-369)	798	759	339
Кальций общий сыв., ммоль/л (норма: 2,25-2,75)	2,4	2,44	2,47
Паратгормон сыв., пг/мл (норма: 15-65)	53,20	53,56	38,22
Максимум тубулярной реабсорбции фосфатов к скорости клубочковой фильтрации, ммоль/ммоль (норма: 1,15-1,73)	0,67	-	-

фатов, так и витамина D, модулируя экспрессию натрий-фосфорных котранспортеров (NaPi) в почечных канальцах и ферментов, метаболизирующих кальцитриол [14]. Трансгенные мыши со сверхэкспрессией FGF23 демонстрируют пониженные уровни NaPi-2a и NaPi-2c в проксимальных канальцах почек, что ведет к увеличению экскреции фосфата с мочой, тогда как удаление FGF23 приводит к гиперфосфатемии [15]. Доказано, что FGF23 подавляет активность 1-альфа-гидроксилазы, фермента, участвующего в гидроксилировании кальцидиола (25(OH)-витамин D) с образованием биоактивной формы кальцитриола (1,25-дигидроксивитамин D3), из-за чего снижается всасывание фосфора в стенке кишечника. Подавляя синтез кальцитриола, FGF23 активирует работу 24-гидроксилазы, тем самым усиливая катаболизм витамина D (рис. 6). В условиях патологической гиперпродукции FGF23 одновременно снижаются реабсорбция фосфора в почках и абсорбция фосфора в кишечнике, что и способствует возникновению симптомов рахита, включая частые переломы и мышечную слабость. Биохимическими маркерами ГФР являются гиперфосфатурия и гипофосфатемия.

Изначально предполагалось, что источником гиперпродукции FGF23 могут быть невусы. Однако это было опровергнуто: иммунолокализация и количественная ПЦР не выявили экспрессии FGF23 в невусах, хирургическое удаление и лазерная абляция невусов не привели к излечению ГФР у пациентов [16].

В последующем было представлено, что избыточная секреция FGF23 происходит из диспластичной кости. У пациентов с КССГ в костях происходит замена нормальной пластинчатой кости фокальными областями, содержащими неправильные фибробластоподобные веретенообразные клетки и обширные участки неминерализованного остеоида, что характерно для остеомалиции [2, 4]. В результате проведенных исследований было показано, что ДНК из диспластических поражений кости, но не здоровой пластинчатой костной ткани, содержит те же мутации *HRAS* или *NRAS*, которые были обнаружены в ДНК, выделенной из клеток невусов или циркулирующих лейкоцитов [16]. Известно, что мутации с усилением функции в членах сигнального пути RAS вызывают повышенную экспрессию FGF23 за счет повышенной активации рецептора 1 фактора роста фибробластов. В ранее опубликованных статьях, у пациентов с КССГ фиксировался высокий уровень FGF23 в крови, однако четкой корреляции между степенью повышения данного показателя и тяжестью течения рахита не зафиксировано.

В представленных нами случаях у пациента 1 течение заболевания более тяжелое, что обусловлено более ранней манифестацией ГФР и синдромом мальабсорбции. У данного пациента жалобы на деформацию нижних конечностей, позвоночника, задержку роста, мышечную слабость и угасание двигательных навыков появились после 1 года. У второго ребенка рахитические изменения не столь выражены, и манифестация на-



Рис. 6. Механизм развития ГФР при КССГ.

Fig. 6. Mechanism of hypophosphatemic rickets development in cutaneous-skeletal hypophosphatemia syndrome

рушений фосфорного обмена отмечалась после 5 лет. По опубликованным данным, возраст манифестации ГФР при КССГ варьирует от 1 года до 14 лет (медиана 2,7 лет, средний возраст 4 года) [3], отсроченное начало связано со временем, которое требуется пациентам для развития достаточной массы диспластичной кости, в которой продуцируется FGF23. И важно сказать, что в ранее представленных статьях синдром мальабсорбции не рассматривался как проявление КССГ, а представлял собой осложнение терапии фосфатами. Как известно, препараты на основе фосфатного буфера обладают слабительным эффектом. Синдром мальабсорбции у нашего пациента манифестировал до начала терапии фосфатами, при этом целиакия и другие причины, которые могли бы обусловить данный симптом, были исключены. Усугубление мальабсорбции на фоне проводимой терапии было основным фактором, осложняющим компенсацию ГФР: невозможность наращивать дозу фосфатов для коррекции гипофосфатемии, а, соответственно, невозможность купирования мышечной гипотонии, болевого синдрома и рахитических изменений в костях.

Для КССГ характерны кожные проявления в виде эпидермальных невусов, а именно: кератиноцитарного невуса, сального невуса, комедонового невуса или невуса Беккера [16]. В ряде случаев невусы располагаются по линиям Блашко и могут иметь V-образную форму на спине, форму завитков на боках и плечах, и волнообразную на голове. Сальные невусы чаще обнаруживаются на голове и шее, они имеют желтый цвет с восковой поверхностью и ассоциируются с очагами алопеции. Такие невусы имелись у первого пациента. У второго пациента на коже имелись кератиноцитарные эпидермальные невусы. Корреляции между тяжестью течения ГФР и размером или структурой невусов не наблюдается. Распределение и локализация диспластических поражений скелета не ограничивались стороной тела с невусом. По данным публикаций, у всех пациентов с КССГ были поражения кожи более 10–60% площади поверхности тела.

При диагностике КССГ важно проводить и дифференциальную диагностику с похожим заболеванием – синдромом МакКьюна-Олбрайта-Брайцева (МОБ), для которого характерно также наличие невусов цвета «кофе с молоком», FGF23-зависимой гипофосфатемии, поражение костей в виде сочетания рахита и фиброзно-кистозной дисплазии [4]. Основным отличием данного заболевания от КССГ будет множественное поражение эндокринной системы в виде преждевременного полового развития, гипертиреоза, гиперпро-

дукции гормонов гипофиза и надпочечников. Этиологическим фактором МОБ являются соматические активирующие мутации гена *GNAS*.

При КССГ у пациентов могут фиксироваться внекожные и внекостные нарушения. Учитывая соматический характер мутации, спектр проявлений зависит от момента ее возникновения, вследствие чего могут поражаться как один, так и несколько зародышевых листков. Неврологические и офтальмологические аномалии – наиболее часто встречающаяся сопутствующая патология при КССГ. Чаще всего упоминаются задержка развития и умственная отсталость, двустороннее и одностороннее увеличение желудочков головного мозга, эпилепсия и изменения на ЭЭГ, нейромеланцитоз по ходу спинного мозга или в головном мозгу без развития неврологической симптоматики, колобома, лимбальный дермоид глаз, страбизм и помутнение роговицы. В некоторых случаях у пациентов отмечалась кардиологическая патология: перикардиальный выпот, коарктация аорты, аномалия аортального клапана. Из неопластических процессов описаны врожденная рабдомиосаркома, медуллярный рак щитовидной железы, диагностированный в возрасте 15 лет без отягощенного наследственного анамнеза, злокачественное образование ЦНС, базальноклеточная карцинома [3]. Интерес представляет тот факт, что, несмотря на выраженные изменения костной ткани, не описано ни одного случая развития остеосаркомы.

Обнаруженные нами мутации p.Gln61Arg в гене *HRAS* и p.Gln61Arg в гене *NRAS* – часто встречающиеся варианты у пациентов с синдромом линейного невуса. Так, у некоторых пациентов с аналогичными мутациями были обнаружены липома ствола мозга, узел щитовидной железы, гемангиомы селезенки, эккринная порома, хористатома глаза, гамартома, что согласуется с соматическим мозаицизмом мутаций, способствующих мультисистемному заболеванию. У представленного нами пациента 2 кроме основных проявлений заболевания были обнаружены признаки двустороннего мультикистозного поражения почек и объемного образования в левой почке, которое по своим характеристикам напоминает ангиомиелолипому. Merz L.M. с соавт. представили описание пациентки с КССГ и мутацией p.G61R в гене *NRAS*, у которой также отмечались ультразвуковые признаки мультикистозной дисплазии правой почки без других пороков развития [7]. Интересно, что у данного пациента тяжесть клинической картины была обусловлена выраженной деформацией грудной клетки со сколиозом и перенесенной легионеллезной пневмонией,

на фоне которой развилась хроническая потребность в кислороде.

Традиционная терапия пациентов с КССГ включает в себя применение препаратов фосфора и альфакальцидола или кальцитриола. К сожалению, предыдущие исследования показали, что данная терапия приводит только к временному повышению уровня фосфатов в сыворотке, не влияя на потерю фосфатов с мочой [3,4,8]. Об ограничении эффективности данной схемы лечения также свидетельствует сохранение патологических изменений в костях даже после длительного лечения фосфатами и метаболитами витамина D на примере наших пациентов. Данная терапия также сопряжена с высоким риском развития осложнений в виде нефрокальциноза, вторичного или третичного гиперпаратиреоза, и, наиболее часто, с диареей. Многообещающим новым терапевтическим подходом к FGF23-опосредованной гипофосфатемии является лечение моноклональными антителами к FGF23 (буросумаб). Буросумаб представляет собой человеческое рекомбинантное IgG-антитело, которое связывается с рецептором к FGF23 и таким образом ингибирует его чрезмерную активность [17]. В 2018 г. данный препарат был зарегистрирован для лечения детей старше 6 месяцев с X-сцепленным доминантным ГФР и опухоль-индуцированной остеомаляцией.

Khadora M. с соавт. представили первое описание применения буросумаба у пациентки 3 лет 10 месяцев с КССГ, у которой после 3 первых инъекций полностью нормализовался уровень фосфора в крови, через 12 месяцев терапии значительно улучшилась физическая активность ребенка, и контрольные рентгенограммы нижних и верхних конечностей показали заживление рахита [6]. Самый длительный период лечения буросумабом – 42 месяца – был представлен Merz L.M. с соавт.: применение буросумаба у ребенка 3 лет с КССГ позволило нормализовать все биохимические параметры, значительно снизить проявления болевого синдрома и рахитических изменений в костях, что способствовало увеличению физической активности и отказу от использования ребенком инвалидного кресла, а увеличение размера грудной клетки на фоне улучшения динамики роста привело к восстановлению дыхательной механики и прекращению подачи кислорода [7].

В 2023 г. были опубликованы данные открытого одностороннего исследования фазы 2, в котором изучалась эффективность и безопасность буросумаба у пациентов с КССГ. В исследовании приняли участие мужчина 20 лет и ребенок 11 лет, у обоих пациентов

стартовая доза буросумаба составляла 0,3 мг/кг, вводилась каждые 2 (ребенку) и каждые 4 недели (взрослому), дозу при необходимости корректировали по уровню фосфора крови до возможной максимальной 2 мг/кг. На фоне лечения при использовании минимальной дозы препарата 0,3 мг/кг оба участника продемонстрировали клинически значимые улучшения в нескольких ключевых аспектах: нормализация биохимических параметров, купирование болевого синдрома, улучшение физической активности, гистологически отмечалось снижение выраженности остеомаляции, у ребенка – улучшение динамики роста. Нежелательных побочных реакций зафиксировано не было, за исключением легких реакций в месте инъекции у пациента детского возраста. Переносимость и эффективность буросумаба, продемонстрированные в данном исследовании, позволяют предположить, что этот препарат может служить основным вариантом лечения пациентов с КССГ. Следует отметить, что оценка эффективности применения препарата в детском возрасте, показывает, что раннее лечение буросумабом может свести к минимуму деформации скелета в критический период роста костей у детей, снизив таким образом инвалидизацию пациента [8].

Интересным представляется сообщение Carli D. с соавт. об успешном применении ингибитора активности митоген-активируемых киназ (МЕК-ингибитор) у 4-летнего мальчика с КССГ, у которого кроме себорейного невуса и ГФР имелись хористомы глаза, множественные гамартомы, порок развития головного мозга, плевральная лимфангиома и хилоторакс [18]. При генетическом анализе в ДНК невуса пациента была обнаружена соматическая мутация с.182A>G; p.Gln61Arg в гене *NRAS*. Селективный ингибитор МЕК, одобрен для лечения BRAF-позитивной меланомы и немелкоклеточного рака легкого, имеются сообщения о его применении у ребенка с нейрофиброматозом 1 типа [19]. В статье сообщается, что лечение данным препаратом привело к быстрой нормализации фосфатемии и фосфатурии, ускорению динамики роста пациента, регрессу хилоторакса, улучшению минеральной плотности костей, уменьшению эпидермальных невусов и гамартом [18].

Стоит упомянуть и тот факт, что в некоторых публикациях представлены данные о возможности спонтанного восстановления реабсорбции фосфора у пациентов с КССГ в период пубертата или в более взрослом возрасте [20], что предположительно может быть связано с прекращением активного роста диспластичной кости и, соответственно, снижением продукции FGF23.

Заключение

Таким образом, нами представлено описание двух генетически подтвержденных клинических случаев КССГ. Приведенные наблюдения подчеркивают важность настороженности по поводу диагностики ГФР при наличии у пациента невуса и клинических признаков рахита. Сложность ведения данной группы пациентов обусловлена более тяжелым течением рахита и ограниченной эффективностью терапии фосфатами. Перспективным методом лечения пациентов с КССГ является патогенетически обоснованная терапия препаратом на основе антител к FGF23 или лекарственными средствами, контролирующими RAS/МАРК- сигнальный путь.

Литература

- Aschinberg L.C., Solomon L.M., Zeis P.M., Justice P., Rosenthal I.M. Vitamin D-resistant rickets associated with epidermal nevus syndrome: demonstration of a phosphaturic substance in the dermal lesions. *J Pediatr.* 1977;91(1):56–60.
- Avitan-Hersh E., Tatur S., Indelman M. et al. Postzygotic HRAS mutation causing both keratinocytic epidermal nevus and thymoma and associated with bone dysplasia and hypophosphatemia due to elevated FGF23. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99 (1):E132-6. doi: 10.1210/jc.2013-2813.
- Ovejero D., Lim Y.H., Boyce A.M. et al. Cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome: clinical spectrum, natural history, and treatment. *Osteoporos Int.* 2016;27(12):3615-3626. doi: 10.1007/s00198-016-3702-8.
- de Castro L.F., Ovejero D., Boyce A.M. Diagnosis of endocrine disease: mosaic disorders of FGF23 excess: fibrous dysplasia/McCune-albright syndrome and cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* 2020; 182 (5):R83-R99;
- Huynh C., Gillis A., Fazendin J., Abdullatif H. A case report to assess the safety and efficacy of Burosumab, an investigational antibody to FGF23, in a single pediatric patient with Epidermal Nevus Syndrome and associated hypophosphatemic rickets. *Bone Rep.* 2022;17:101605. doi: 10.1016/j.bonr.2022.101605.
- Khadora M., Mughal M.Z. Burosumab treatment in a child with cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome: A case report. *Bone Rep.* 2021;15:101138. doi: 10.1016/j.bonr.2021.101138.
- Merz L.M., Buerger F., Ziegelasch N. et al. A Case Report: First Long-Term Treatment With Burosumab in a Patient With Cutaneous-Skeletal Hypophosphatemia Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:866831. doi: 10.3389/fendo.2022.866831.
- Sugarman J., Maruri A., Hamilton D.J. et al. The efficacy and safety of burosumab in two patients with cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome. *Bone.* 2023;166: 116598, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2022.116598>.
- Richards S., Aziz N., Bale S., et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
- Рыжкова О. П., Кардымон О. Л., Прохорчук Е. Б., и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК

- человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). *Медицинская генетика*, 2019; 18(2):3-23
- Rauen K.A. The RASopathies. Annual review of genomics and human genetics. 2013;14:355–69. doi: 10.1146/annurev-genom-091212-153523.
 - Куликова К.С., Тюльпаков А.Н. Гипофосфатемический рахит: патогенез, диагностика и лечение. *Ожирение и метаболизм.* 2018;15(2):46-50.
 - Lim Y.H., Ovejero D., Sugarman J.S., et al. Multilineage Somatic Activating Mutations in HRAS and NRAS Cause Mosaic Cutaneous and Skeletal Lesions, Elevated FGF23 and Hypophosphatemia. *Hum Mol Genet.* 2014; 23(2):397–407. doi: 10.1093/hmg/ddt429
 - Shimada T., Urakawa I., Yamazaki Y., et al. FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;314:409–414.
 - Shimada T., Hasegawa H., Yamazaki Y., et al. FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2004;19: 429-435. <https://doi.org/10.1359/JBMR.0301264>
 - Lim Y.H., Ovejero D., Derrick K.M.; Yale Center for Mendelian Genomics; Collins M.T., Choate K.A. Cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome (CSHS) is a multilineage somatic mosaic RASopathy. *J Am Acad Dermatol.* 2016;75(2):420-7. doi:10.1016/j.jaad.2015.11.012.
 - Carpenter T.O., Whyte M.P., Imel E.A., Boot A.M., Högl W., Linglart A., et al. Burosumab Therapy in Children With X-Linked Hypophosphatemia. *N Engl J Med.* 2018; 378(21):1987–98. doi: 10.1056/nejmoa1714641.
 - Carli D., Cardaropoli S., Tessaris D., et al. Successful treatment with MEK-inhibitor in a patient with NRAS-related cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome. *Genes Chromosomes Cancer.* 2022; 61(12):740-746. doi: 10.1002/gcc.23092.
 - Ершов Н.М., Пшонкин А.В., Мареева Ю.М., и др. Первый опыт применения MEK-ингибиторов при нейрофиброматозе I типа у детей в Российской Федерации в условиях стационара кратковременного лечения национального медицинского исследовательского центра. *Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГиО).* 2021;8(1):85-92. <https://doi.org/10.21682/2311-1267-2021-8-1-85-92>.
 - Zutt M., Strutz F., Happle R., et al. Schimmelpenning-Feuerstein-Mims syndrome with hypophosphatemic rickets. *Dermatology.* 2003;207(1):72-6. doi: 10.1159/000070948.

References

- Aschinberg L.C., Solomon L.M., Zeis P.M., Justice P., Rosenthal I.M. Vitamin D-resistant rickets associated with epidermal nevus syndrome: demonstration of a phosphaturic substance in the dermal lesions. *J Pediatr.* 1977;91(1):56–60.
- Avitan-Hersh E., Tatur S., Indelman M. et al. Postzygotic HRAS mutation causing both keratinocytic epidermal nevus and thymoma and associated with bone dysplasia and hypophosphatemia due to elevated FGF23. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99 (1):E132-6. doi: 10.1210/jc.2013-2813.
- Ovejero D., Lim Y.H., Boyce A.M. et al. Cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome: clinical spectrum, natural history, and treatment. *Osteoporos Int.* 2016;27(12):3615-3626. doi: 10.1007/s00198-016-3702-8.
- de Castro L.F., Ovejero D., Boyce A.M. Diagnosis of endocrine disease: mosaic disorders of FGF23 excess: fibrous dysplasia/Mc-

- Cune-albright syndrome and cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* 2020; 182 (5):R83-R99;
5. Huynh C., Gillis A., Fazendin J., Abdullatif H. A case report to assess the safety and efficacy of Burosumab, an investigational antibody to FGF23, in a single pediatric patient with Epidermal Nevus Syndrome and associated hypophosphatemic rickets. *Bone Rep.* 2022;17:101605. doi: 10.1016/j.bonr.2022.101605.
 6. Khadora M., Mughal M.Z. Burosumab treatment in a child with cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome: A case report. *Bone Rep.* 2021;15:101138. doi: 10.1016/j.bonr.2021.101138.
 7. Merz L.M., Buerger F., Ziegelasch N. et al. A Case Report: First Long-Term Treatment With Burosumab in a Patient With Cutaneous-Skeletal Hypophosphatemia Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:866831. doi: 10.3389/fendo.2022.866831.
 8. Sugarman J., Maruri A., Hamilton D.J. et al. The efficacy and safety of burosumab in two patients with cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome. *Bone.* 2023;166: 116598, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2022.116598>.
 9. Richards S., Aziz N., Bale S., et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
 10. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prohorchuk E.B., et al. Ru-kovodstvo po interpretatsii dannykh posledovatel'nosti DNK cheloveka, poluchennykh metodami massovogo parallel'nogo sekvenirovaniya (MPS) (redaktsiya 2018, versiya 2) [Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2)]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2019;18(2):3-23. (In Russ.) <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23>
 11. Rauen K.A. The RASopathies. Annual review of genomics and human genetics. 2013;14:355–69. doi: 10.1146/annurev-genom-091212-153523.
 12. Kulikova K.S., Tiulpakov A.N. Gipofosfatemicheskiy rakhit: patogenez, diagnostika i lecheniye. [Hypophosphatemic rickets: pathogenesis, diagnosis and treatment]. *Ozhireniye i metabolizm. [Obesity and metabolism]*. 2018;15(2):46-50. (In Russ.) <https://doi.org/10.14341/omet9672>
 13. Lim Y.H., Ovejero D., Sugarman J.S., et al. Multilineage Somatic Activating Mutations in HRAS and NRAS Cause Mosaic Cutaneous and Skeletal Lesions, Elevated FGF23 and Hypophosphatemia. *Hum Mol Genet.* 2014; 23(2):397–407. doi: 10.1093/hmg/ddt429
 14. Shimada T., Urakawa I., Yamazaki Y., et al. FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;314:409–414.
 15. Shimada T., Hasegawa H., Yamazaki Y., et al. FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2004;19: 429-435. <https://doi.org/10.1359/JBMR.0301264>
 16. Lim Y.H., Ovejero D., Derrick K.M.; Yale Center for Mendelian Genomics; Collins M.T., Choate K.A. Cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome (CSHS) is a multilineage somatic mosaic RASopathy. *J Am Acad Dermatol.* 2016;75(2):420-7. doi:10.1016/j.jaad.2015.11.012.
 17. Carpenter T.O., Whyte M.P., Imel E.A., Boot A.M., Högl W., Linglart A., et al. Burosumab Therapy in Children With X-Linked Hypophosphatemia. *N Engl J Med.* 2018; 378(21):1987–98. doi: 10.1056/nejmoa1714641.
 18. Carli D., Cardaropoli S., Tessaris D., et al. Successful treatment with MEK-inhibitor in a patient with NRAS-related cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome. *Genes Chromosomes Cancer.* 2022; 61(12):740-746. doi: 10.1002/gcc.23092.
 19. Ershov N.M., Pshonkin A.V., Mareeva Yu.M., et al. Pervyy opyt primeneniya MEK-ingibitorov pri neyrofibromatoze I tipa u detey v Rossiyskoy Federatsii v usloviyakh statsionara kratkovremennogo lecheniya natsional'nogo meditsinskogo issledovatel'skogo tsentra [The first experience of using MEK inhibitors for type I neurofibromatosis in children in the Russian Federation in a hospital for short-term treatment at the National Medical Research Center]. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii [Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology]*. 2021;8(1):85-92. (In Russ.) <https://doi.org/10.21682/2311-1267-2021-8-1-85-92>.
 20. Zutt M., Strutz F., Happle .R, et al. Schimmelpenning-Feuerstein-Mims syndrome with hypophosphatemic rickets. *Dermatology.* 2003;207(1):72-6. doi: 10.1159/000070948.

Исправление к статье

Андреева М.В., Курило Л.Ф., Штаут М.И., Черных В.Б.

«Частичный блок сперматогенеза у двух носителей робертсоновских транслокаций (14;15)»

По просьбе авторов в статье Андреевой М.В., Курило Л.Ф., Штаут М.И., Черных В.Б. «Частичный блок сперматогенеза у двух носителей робертсоновских транслокаций (14;15)», опубликованной в номере 4 за 2023 год [*Медицинская генетика* 2023; 22(4): 44-48], вносится изменение в раздел «**Финансирование**»: Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

Correction to the article

Andreeva M.V., Kurilo L.F., Shtaut M.I., Chernykh V.B.

«Partial block of spermatogenesis in two carriers of Robertsonian translocations (14;15)»

At the request of the authors in the article Andreeva M.V., Kurilo L.F., Shtaut M.I., Chernykh V.B. «Partial block of spermatogenesis in two carriers of Robertsonian translocations (14;15)», published in the journal [*Medical Genetics* 2023; 22(4): 44-48], a change is made to the section «**Funding**»: The study was carried out within the framework of the state task of the Research Centre for Medical Genetics.