

Главный редактор
ГИНТЕР Е.К.
академик РАН
Ответственный секретарь
редакции
ИЖЕВСКАЯ В.Л.
д.м.н.

Редакционная коллегия

БОЧКОВ Н.П.

академик РАН

БАРАНОВ В.С.

чл.-корр. РАН

ДУРНЕВ А.Д.

чл.-корр. РАН

ИЛЛАРИОШКИН С.Н.

д.м.н., профессор

КОЗЛОВА С.И.

д.м.н., профессор

ЛИМБОРСКАЯ С.А.

д.б.н., профессор

МИХАЙЛОВА Л.К.

д.м.н., профессор

НАЗАРЕНКО Л.П.

д.м.н., профессор

НОВИКОВ П.В.

д.м.н., профессор

ПУЗЫРЕВ В.П.

академик РАН

РУБЦОВ Н.Б.

д.б.н., профессор

ХУСНУТДИНОВА Э.К.

д.б.н., профессор

**Председатель
редакционного совета**

ИВАНОВ В.И.

академик РАН

Редакционный совет

АРЧАКОВ А.И.

академик РАН

БАРАНОВ А.А.

академик РАН

КОПНИН Б.П.

д.б.н., профессор

ЛАЗЮК Г.И.

чл.-корр. РАН

СВЕРДЛОВ Е.Д.

академик РАН

СЕРЕДЕНИН С.Б.

академик РАН

СМИРНОВ В.Н.

чл.-корр. РАН, академик РАН

ЧУЧАЛИН А.Г.

академик РАН

Издатель: ООО Издательство «Гениус Медиа»

ИРИШКИН Андрей Александрович

Председатель Совета директоров

ИРИШКИН Дмитрий Андреевич

Генеральный директор

ЛУКАШЕВИЧ Ирина Александровна

Литературная редакция

КОМАРОВА Анна Константиновна

Дизайн и верстка

ШЕВЧУК Ольга Анатольевна

Распространение и подписка

СКВОРЦОВ Владимир Владимирович

Предпечатная подготовка

Адреса редакции:

1. 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1, Федеральное государственное бюджетное учреждение Медико-генетический научный центр РАН
Тел. (499) 612-81-07, факс: 324-07-02

2. 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8.

Тел. (495) 518-14-51, 601-23-74.

E-mail: genius-media@mail.ru

Внимание авторов и читателей:

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

© Российское общество медицинских генетиков

© Российская академия медицинских наук

© Медико-генетический научный центр РАН

© ООО Издательство «Гениус Медиа»

Тираж 200 экз.

Медицинская ГЕНЕТИКА

Ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал

2013 г. Том 12. №2 (128)

СОДЕРЖАНИЕ

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

Мглинец В.А.

Генетические нарушения вестибулярной системы.....3

Туманов А.С.

Влияние генетических факторов человека
на высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ)13

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Гордеева Е.Г., Сорокина Т.М., Шилейко Л.В.,
Остроумова Т.В., Борзова О.С., Магомедова Х.Д.,
Кузина Н.Ю., Баркова О.В., Курило Л.Ф.**

Частота встречаемости гамет с анеуплоидией
у мужчин с нарушением репродуктивной функции
и патозооспермией.....18

**Мещерякова Т.И., Маркова С.И., Жилина С.С.,
Гончаков Г.В., Гончакова С.Г., Абрамов А.А.,
Петрин А.Н., Мutowин Г.Р.**

Полиморфизм C677T гена *MTHFR*
и риск формирования несиндромальных
орофациальных расщелин25

**Бурденный А.М., Казубская Т.П., Брага Э.А.,
Носиков В.В., Логинов В.И.**

Ассоциация генов *TP53* и *MDM2*
с риском развития рака молочной железы
у русских женщин Московского региона28

**Кузнецова Е.Б., Пудова Е.А., Танас А.С.,
Залетаев Д.В., Стрельников В.В.**

SEMA6B — кандидат на роль гена супрессора опухолевого роста
в критическом хромосомном районе 19p13.332

СЛУЧАЙ ИЗ ПРАКТИКИ

Федотов В.П., Галеева Н.М., Поляков А.В.

Мезомелическая дисплазия
с преаксиальной полидактилией Вернера,
обусловленная мутацией в регуляторном элементе ZRS гена *SHH*37

Editor-in-Chief
GINTER E.K.

Secretary
IZHEVSKAYA V.L.

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

Chairman
of Editorial Council
IVANOV V.I.

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

Publisher: Genius Media Ltd, Moscow

IRISHKIN A.A.
Chairman of the Board
IRISHKIN D.A.
CEO
LUKASHEVICH I.A.
Text editor
KOMAROVA A.K.
Technical editor
SHEVCHUK O.A.
Distribution and subscribe
SKVORTSOV V.V.
Prepress

Medical GENETICS

Monthly reviewed scientific and practical journal

2013. Volume 12. №2 (128)

Content

REVIEWS

- Mglinets V.A.**
Genetic disorders of vestibular system3
- Tumanov A.S.**
The influence of human genetic factors on HAART13

ARTICLES

- Gordeeva E.G., Sorokina T.M., Shileiko L.V.,
Ostroumova T.V., Borzova O.S., Magomedova H.D.,
Kuzina N.Y., Barkova O.V., Kurilo L.F.**
The frequency of aneuploidy
in sperm of infertile men with pathozoospermia.....18
- Meshcheryakova T.I., Markova S.I., Zhylina S.S.,
Gonchakov G.V., Gonchakova S.G., Abramov A.A.,
Petrin A.N., Mutovin G.R.**
MTHFR C677T gene polymorphism
and the risk of nonsyndromic orofacial cleft25
- Burdenny A.M., Kazubskaya T.P., Braga E.A.,
Nosikov V.V., Loginov V.I.**
Association of polymorphic markers of *TP53* and *MDM2* genes
with breast cancer in females of Moscow Region28
- Kuznetsova E.B., Pudova E.A., Tanas A.S.,
Zaletaev D.V., Strelnikov V.V.**
SEMA6B is a candidate tumor suppressor gene
in the critical chromosome region 19p13.332

CASE REPORT

- Fedotov V.P., Galeeva N.M., Polyakov A.V.**
Werner mesomelic syndrome with preaxial polydactyly,
induced by mutation in zone of polarizing activity
regulatory sequence (ZRS) of *SHH* gene37

Генетические нарушения вестибулярной системы

Мглинец В.А.

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

Рассмотрены некоторые генетические нарушения вестибулярного аппарата (ВА) у модельных животных. Эти нарушения, в основном, затрагивают формирование или всего ВА, или полукружных каналов, сферического, эллиптического или эндолимфатического мешочка. Нарушения могут касаться и нейрального или сенсорного компонентов ВА. Рассмотрены также нарушения образования отоконий и эндолимфы ВА. Приведены некоторые нарушения ВА у человека.

Ключевые слова: вестибулярная система, генетические нарушения

Введение

В предыдущей работе [2] мы рассмотрели структуру, функцию и генетический контроль образования структур ВА, поэтому не будем здесь возвращаться к этому вопросу. Схематическое изображение структур внутреннего уха представлено на рисунке.

Нарушения

выделения вестибулярной части внутреннего уха

В отсутствие рецепторов ретиноевой кислоты $RAR\alpha$ и $RAR\gamma$ возникают кохлеарные и вестибулярные аномалии внутреннего уха, включая маленький слуховой пузырек, отсутствие эндолимфатического протока и abortивное образование полукружных каналов. Эти нарушения очень сходны с теми, что обнаружены у *Hoxa1*-дефицитных мышей, но более тяжёлые, указывающие на то, что передача сигналов ретиноевой кислоты может иметь несколько нижестоящих мишеней, включая и гомеобоксный ген *Hoxa1* [60]. Мутации в генах *SALL1* (*Sal-like 1*) и *EYA1* (*Eyes absent homolog 1*) обуславливают синдромы Townes—Brocks [38] и branchio-oto-renal (BOR) [8, 74]. При исследованиях внутреннего уха у пациентов с синдромом BOR обнаружено, что улитка и полукружные каналы у них недоразвиты или отсутствуют вовсе [74]. Ген *Eya1* помимо мезенхимы, где он отвечает за формирование хрящевой отической капсулы, экспрессируется и в клетках слухового пузырька мыши, которые дают кортиев орган, макулы и гребешки ВА, поэтому снижение экспрессии *Eya1* также вызывает отсутствие образования слухового и вестибулярного сенсорного эпителия [82].

В одной из предыдущих работ [3] нами было показано, что в результате дифференциальной экспрессии различных групп в основном гомеобоксных генов происходит подразделение слухового зачатка на компартменты, которые, в конечном итоге, отвечают за формирование вестибулярной или слуховой системы. Так, у *Dlx5/Dlx6* (*distal-less homeobox 5 и 6*) двойных нулевых эмбрионов мышей морфогенез всех структур, происходящих из до-

ральной части отоциста, нарушен так, что ВА не образуется вообще [59].

Область, предназначенная давать вестибулярные структуры, характеризуется экспрессией генов *Hmx3* (*H6 family homeobox 3*), *Hmx2*, *Otx1* (*orthodenticle homeobox 1*), *Otx2* и *Prx1* (*Paired-related homeobox gene 1*) и *Prx2*. Их мутации ведут к нарушениям морфогенеза ВА [12]. Так, у нулевых *Hmx2* мышей отсутствуют какие-либо различимые полукружные каналы, сохраняется лишь примордиальный вестибулярный дивертикул, с существенной потерей сенсорных макул в слитой камере примордиальных мешочков [76]. Мутации в гене *Hmx3* также вызывают тяжёлые нарушения в вестибулярной системе [27, 75]. Неполнота исчезновения вестибулярных структур указывает на то, что гены *Hmx2* и *Hmx3* обладают уникальной перекрывающейся функцией во время эмбриогенеза. Это подтверждается нарушениями у двойных *Hmx2/Hmx3*-мутантных рыбок данио [22].

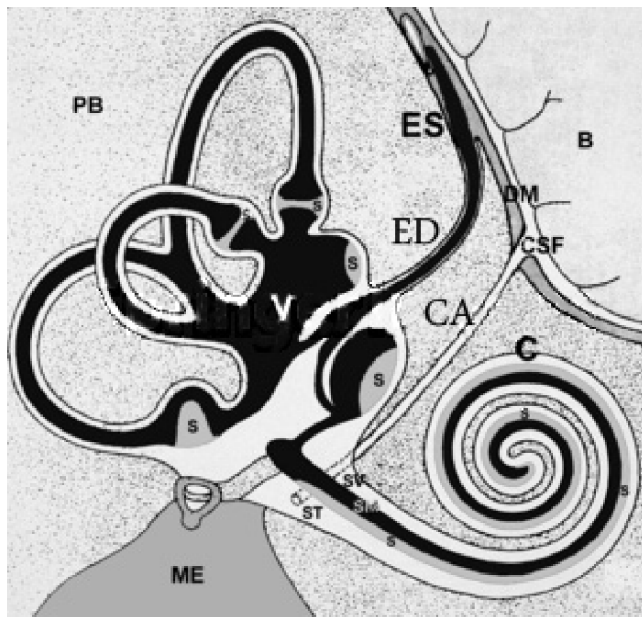
Ранняя общая область экспрессии генов *Ngn1* (*neurogenin 1*) и *Dll1* (*Delta 1*) соответствует проспективной нейральной сенсорной области, которая предназначена генерировать отические нейроны и сенсорные органы внутреннего уха. Нулевые по *Ngn1* мутантные мыши лишены ганглионарных нейронов [45]. Они обнаруживают укороченный канал улитки и почти полное отсутствие сферического мешочка ВА. Делеция гена *Ngn1* вызывает также снижение количества волосковых клеток в сенсорных участках внутреннего уха.

Формирование полукружных каналов наиболее характерно для вестибулярной системы. Например, отсутствие всех эпителиальных выпячиваний (карманов), дающих полукружные каналы, наблюдается у некоторых лишённых гена *FGF3* (*fibroblast growth factor 3*) эмбрионов [41]. Но на формирование полукружных каналов могут влиять и нарушения в окружающей мезенхиме. Так, гомеобоксные гены *Prx1* и *Prx2* преимущественно экспрессируются в периотической мезенхиме, участвуя в формировании костного лабиринта. У двойных нокаутов *Prx1/Prx2* отическая капсула маленькая и часто отсутствует латеральный полукружный канал [71]. На раз-

витие полукружных каналов и окружающее их перилимфатическое пространство влияет также ген *Gata2* [28].

Мыши, дефицитные по генам *Hmx3* и *Dlx5*, обнаруживают нарушения эпителия полукружных каналов. У наиболее тяжело поражённых индивидов формирование каналов почти полностью блокируется [11], тогда как развитие улитки не затрагивается. У мутантов *Hmx3* и *Dlx5* выпячивания, карманы для полукружных каналов, формируются, но резорбция их срединных частей неполная или задержана [47, 62]. Нарушение резорбции может быть обусловлено изменениями в экспрессии гена *BMP4* (*bone morphogenetic protein 4*). Возможно, что BMP4 регулирует клеточную гибель в этом регионе.

BMPs составляют подгруппу в сверхсемействе TGFβ (Transforming growth factor beta). Предполагается, что BMP4, -5 и -7 экспрессируются на ранних стадиях развития, участвуют в процессах формирования паттерна, ведущего к морфогенезу полукружных каналов, а BMP2, по-видимому, отвечает за продолжающийся рост полу-



Схематическое изображение различных отделов мембранозного лабиринта.

Внутренние пространства, заполненные эндолимфой, представлены чёрным цветом, а заполненные перилимфой белым. Серым цветом обозначены сенсорные участки (S) улитки, полукружных каналов и эллиптического и сферического мешочков.

В — головной мозг; С — улитка; CA — водопровод улитки (обычно не столь широк, как показано здесь); обеспечивает общение между спинномозговой жидкостью и перилимфатическим пространством улитки; CSF — спинномозговая жидкость; DM — твёрдая оболочка мозга; ED — эндолимфатический проток; ES — эндолимфатический мешок; ME — среднее ухо; PB — каменистая кость; S — сенсорный орган; SM — scala media; ST — scala tympani; SV — scala vestibuli; V — вестибулярная система; эндолимфатическое пространство улитки сообщается с таковым сферического мешочка, от которого, как и от эллиптического мешочка, отходящие короткие протоки соединяются в эндолимфатический канал (ED), который заканчивается ES под твердой оболочкой мозга (DM).

кружных каналов после их возникновения [13]. Антагонист BMP, noggin, строго ингибировал образование полукружных каналов. Он даже блокировал выпячивание определённого индивидуального канала в зависимости от расположения источника noggin [25].

Нокаутные по пяти разным генам мыши, *Nkx5.1* (NK homeobox 5.1) или *Hmx3* (*Homeobox protein Nkx-5.1*), *netrin*, *Otx-1*, *Dlx5* и *Nor-1* (*Neuron-derived orphan receptor 1*), так же как и многие другие мутанты по этим генам, демонстрируют их потенциальную роль в морфогенезе полукружных каналов [5, 27, 47, 48, 54, 62]. Локально пролиферирующая мезенхима давит на противоположные стенки каждого из канальных выпячиваний, пока стенки не сомкнутся. Netrin-1, по-видимому, является критическим фактором в процессе соединения срединных частей канальных выпячиваний, тогда как *Nkx5-1* может регулировать размер домена экспрессии *netrin-1*. Резорбция середины канального выпячивания контролируется, по-видимому, также генами *Nkx5-1* и *Dlx5*. Их взаимодействие вместе с передачей сигналов BMP, возможно, предопределяет область клеточной гибели или рекрутирования клеток этой области в эпителий формирующихся каналов. Дальнейший рост сформированных полукружных каналов регулируется орфанным ядерным рецептором *Nor-1* [54]. Дефицитные мыши *Gbx2* (*Gastrulation brain homeobox 2*) обнаруживают нормальную индукцию внутреннего уха, однако позднее в развитии ВА у них обнаруживаются аномалии [78].

Мутации, затрагивающие спецификацию сенсорных участков

Иногда морфология полукружных каналов и мешочков изменена в результате нарушения спецификации и дифференцировки в них сенсорных участков, гребешков в ампулах полукружных каналов или макул сенсорных мешочков, как это отмечалось выше у мутантов *Eya1*. Нулевые мутантные мыши *Foxg1* (*Forkhead box G1*) обнаруживают отсутствие сенсорного гребешка и волосковых клеток горизонтального полукружного канала [23]. Известно участие сигналов Notch в определении ранних границ сенсорных участков. Это подтверждается наблюдениями мутантных по локусу лиганда *Jag1* (*Jagged 1*) для рецептора Notch у мышей: *headturner* [36] и *slalom* [73]. У таких мышей некоторые гребешки вестибулярной системы маленькие или отсутствуют, паттерн волосковых клеток в органе Корти также аномален. У этих мутантов наблюдается последующее укорочение заднего и переднего полукружных каналов, связанное с отсутствием или сильным уменьшением гребней и окружающих их ампул. Оба эти фенотипа могут возникать в результате дефектов дифференциальной адгезии во время инициальной спецификации сенсорных регионов.

Два мутантных *Sox2* (*SRY* (*sex determining region Y*)-*box 2*) аллеля, *Lcc* (*light coat and circling*) и *Ysb* (*yellow submarine*) вызывают тяжёлые нарушения слуха (*Ysb*

мышь) или полную глухоту (*Lsc* мышь), а также постоянное кружение. При рождении у *Lsc* мышей ни волосковые, ни поддерживающие клетки не дифференцировались. Мутантные *Ysb*-гомозиготы, которые экспрессировали на низком уровне *Sox2* во внутреннем ухе, почти не обнаруживали волосковых клеток в ВА [37].

У мутантных мышей *Fgf3* и *yFgf3*-морфантов рыбок данио отсутствует или уменьшена продукция волосковых клеток [40]. Основным дефектом в мутантном ухе мышей *Fgf10* является неспособность формировать задний полукружный канал и его гребешок [53]. Кроме того, эти мутации вызывали деформации гребешков переднего и горизонтального каналов, а также меняли позицию оставшихся частей сенсорного эпителия в эллиптическом мешочке. Сохранившиеся волосковые клетки имели дефекты образования стереоцилий. Дефекты не обнаруживались в кортиевом органе. Эти фенотипические нарушения напоминают таковые у мышей с нулевой мутацией рецептора гена *FGFR2b*. У рыбок данио с мутациями в гене *Fgf8* (*acerebellar*, *ace*) обнаруживаются небольшие отические пузырьки, уменьшенные количества нейросенсорных клеток. Позднее это проявляется в образовании маленького отического ганглия, неправильной локализации сенсорных участков, особенно трёх гребешков и в существенной редукции количества волосковых клеток [40, 41]. Отмечается также существенное нарушение морфологии переднего и горизонтального полукружных каналов, но их гребешки распознаваемы. Кроме того, слегка уменьшены в размерах и вестибулярные мешочки, и их макулы. У мышей экспрессия гена *Fgf8* обычно наблюдается в вентромедиальной области отоциста, из которой вычлениаются отический ганглий и презумптивный сенсорный эпителий, нарушенные у соответствующих мутантов [6].

Нарушения волосковых клеток

При делеции гена *Math1* (*mouse homologue of the Drosophila gene atonal*) отсутствуют распознаваемые волосковые клетки в улитке и вестибулярных органах мутантных мышей [10]. В развивающемся внутреннем ухе мышей ген *Pou4f3* (*POU class 4 homeobox 3*) (также известен как *Brn3a*) строго экспрессируется в постмитотических предшественниках просенсорных клеток, которые детерминированы к развитию в волосковые клетки улитки и вестибулярной системы. Целенаправленные мутации этого гена у мышей вызывают отсутствие волосковых клеток в ранний постнатальный период, это сопровождается вестибулярной дисфункцией и выраженной глухотой [80]. Мутантные мыши *ddl* (*dreidel*), которые не экспрессируют функционального белка Pou4f3 [29] и поэтому обнаруживают минимальные уровни мРНК *Gfi1* (*growth factor independent 1*) в волосковых клетках улитки и преддверия и не экспрессируют ген *Lhx3* (*LIM homeobox 3*) в волосковых клетках улитки, в результате обнаруживают сходный вальсирующий фенотип с выра-

женной глухотой и вестибулярной дисфункцией. При некоторых мутациях [21] оставшийся нормальным сенсорный эпителий гребешков и макулы эллиптического мешочка способен частично компенсировать дисфункцию сферического мешочка.

Необычна мутация в гене *Srrm4* (*Ser/Arg repetitive matrix 4*), обуславливающая мутантный фенотип *Bronx waltzer* (*bv*) мышей, связанный с дефектами развития наружных волосковых клеток улитки и волосковых клеток преддверия. Этот ген отвечает за сплайсинг некоторых мРНК, а у *bv* мышей пропускаются некоторые специфические экзоны, в результате нарушается функция некоторых белков. Так, были избыточно представлены среди 44 продуктов генов, чья экспрессия была в большинстве своем редуцирована в вестибулярных пятнах у *bv* мышей белки, регулируемые генами *Rest* и *Bhc80*, но не те, что регулируются геном *Mef2d* [49].

В ВА экспрессируются многие микроРНК [19]. Избыточная экспрессия синтезированных микроРНК miR-96 или miR-182 у эмбрионов рыбок данио вызывала удвоение отоцистов, появление эктопических или увеличенных сенсорных участков и добавочных волосковых клеток, тогда как морфогенез статоакустического ганглия повреждался в меньшей степени. Напротив, нокдаун miR-183, miR-96 и miR-182, вызываемый антисмысловыми олигонуклеотидами, приводил к снижению количества волосковых клеток во внутреннем ухе, уменьшению статоакустического ганглия, дефектам полукружных каналов и аномалиям органа задней части боковой линии у рыбок данио [44].

В Интернете существует база данных мутаций, вызывающих аномалии ВА мышей (Mammalian Phenotype Browser: <http://mousedb.com/searches/Phat.cgi?id=MP:0002623>). Эти данные демонстрируют, что во многих случаях потеря слуха сопровождается аномалиями ВА. Следовательно, обычно гены, ответственные за формирование, структуру и функцию волосковых клеток в органе слуха и равновесия, действуют одинаково и мутации соответствующих генов вызывают сходные структурные и функциональные аномалии в обоих органах, которые в одном случае ведут к потере слуха, а в другом — вальсирующему поведению мышей. Помимо упомянутых выше мутаций, затрагивающих волосковые клетки, нарушения стереоцилий волосковых клеток, например белков связок стереоцилий протокадерина, кадерины 23 и гармонина, нарушают слух и вестибулярную функцию. Так, мыши *av* (*ames-waltzer*), несущие спонтанную рецессивную мутацию протокадгерина *Pcdh15*, глухи, обнаруживают поведение кружения, трясение головой и гиперактивность [7]. Функциональный дефект приводил к дезорганизации стереоцилий в улитке и сферическом мешочке, что вызывало дисфункцию волосковых клеток. Сходным образом дефекты стереоцилий, связанные с мутациями гена *espin*, ведут к глухоте и нарушению баланса у мышей *jerker* и у человека [65]. По-

дробнее подобные нарушения были рассмотрены нами ранее [4].

Однако в ВА механотрансдукция в волосковых клетках осуществляется несколько по-другому, с использованием вместо подвижной текториальной мембраны малоподвижных желеобразных масс поверх стереоцилий, и отоконий в вестибулярных мешочках. Кроме того, в вестибулярных сенсорных органах сохраняются и функционируют киноцилии на волосковых клетках. Вестибулярные нарушения, связанные с дисфункцией вестибулярных киноцилий неизвестны.

Нарушения образования отоконий (отолитов у рыб)

Отоконии являются биоминералами, образующимися только внутри эллиптического и сферического мешочков, они важны для восприятия силы тяжести и линейного ускорения [3]. Отоконии состоят из бикарбоната кальция и скрепляющего белка отоконина. В ходе эволюции позвоночных обнаруживается общая тенденция замещения ватеритовых (vaterite) и арагонитовых (aragonite) кристаллов на кристаллы кальцита [35]. У амфибий каркасным белком является отоконин-22, а у млекопитающих — отоконин-90. Он секретируется в эндолимфу поддерживающими клетками несенсорного эпителия, тогда как поддерживающие клетки сенсорного эпителия секретируют многочисленные небольшие пузырьки («глобулярные субстанции») с высокой концентрацией Ca^{2+} [70]. Мутантные мыши *headtilt* (*het*) характеризуются отсутствием отоконий и уродливыми эллиптическим и сферическим мешочками. У этих мутантов мутации затрагивают ген *Nox3* (*NADPH-оксидазы 3*). Следовательно, функция этого фермента необходима для морфогенеза отоконий [51]. *NADPH-оксидазы* обычно генерируют супероксид и другие реактивные виды кислорода (ROS). Интересно, что отоконин-90 имеет два PLA2-подобных домена (PLA2 — phospholipase A), содержащих более 20 остатков цистеина [77]. Предполагается, что белокотоконин связывает фосфолипиды мембран пузырьков с глобулярными субстанциями и подвергается конформационному изменению, запуская процесс с помощью ROS, продуцируемых при участии продукта гена *Nox3* и расположенных на плазматической мембране пузырьков. Это конформационное изменение открывает путь для закладки мест образования кристаллов кальцита из кальция, предоставляемого пузырьками, и ионами бикарбоната из эндолимфы.

Из 150 локусов у мышей, сцепленных с глухотой и/или вестибулярной дисфункцией, только три мутации *tlh* (*tilted*), *thd* (*thunderhead*) и упомянутая выше *het* специфически затрагивают развитие отоконий, не вызывая нарушения слуха, морфогенез внутреннего уха или дегенерацию стереоцилий (www.jax.org/hmr/index.html/). Эти три мутантные линии мышей и одна у рыбок данио *bks* (*backstroke*), несут мутацию в гене *Otop1* (*otopetrin 1*) [32]. Мутанты несут одиночную точковую мутацию,

приводящую к замене аминокислот [34]. При этом паттерн пространственной и временной экспрессии белка *Oc90/95* остаётся неизменным у *tlh/tlh*-мутантов [70]. Нокдаун гена *Otop1* у мышей и рыбок данио также вызывает избирательное отсутствие отоконий/отолитов, как и у соответствующих мутантов.

Otop1 и *Otop1*-подобные паралоги, *Otop2* и *Otop3*, гомологичны генам *C. elegans* и *D. Melanogaster DUF270* (*Drosophila protein of unknown function*) [34]. *Otop1* вместе с *Otop2*, *Otop3* позвоночных и другими подобными белками у других животных составляют семейство Otopetrin Domain Protein (ODP). Это белки с 10 трансмембранными участками и с неизвестной функцией. Предполагается, что *Otop1* участвует во внеклеточной биоминерализации посредством регуляции внутриклеточного Ca^{2+} , контроля хранилищ Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме, специфического ингибирования пуринергического рецептора P2Y и регуляции притока внеклеточного кальция в ответ на АТФ, АДФ и УДФ [35]. Предполагается, что белок *Otop1* действует как сенсор концентрации внеклеточного кальция в эндолимфе вблизи поддерживающих клеток и реагирует на АТФ в эндолимфе увеличением уровней внутриклеточного кальция во время минерализации отоконий. Мутации затрагивают в основном трансмембранные участки белка *Otop1* и, по-видимому, влияют на проникновение белка отопетрина в мембрану и его ориентацию в ней. Располагаясь на поверхности отоконической мембраны, он, по-видимому, участвует в зарождении на ней биоминералов, взаимодействуя с белком отоконин-90 [32].

В геномах мыши и человека инвертированная последовательность (голова—хвост) tandemно расположенных генов *Otop2-Otop3* образует кластер с субтипом *USH1G* (Ushersyndrome — USH) гена *IG*, также называемого *SANS*. Мышиный ген *Ush1g* на хромосоме 11 и его ортолог *USH1G* на 17-й хромосоме человека, будучи мутантным, вызывают фенотип *js* (*Jacksonshaker*) у мышей и синдром *USH1G* соответственно. Ген *Ush1g* остаётся тесно сцепленным с *Otop2*-родственными последовательностями в течение всей эволюции позвоночных. У грызунов ген *Ush1g* вставлен в первый интрон *Otop2*, это приводит к отсутствию трансляции специфичных для грызунов первых экзонов 1a и 1b *Otop2*. Остаётся открытым вопрос, являются ли некодирующие последовательности внутри и вокруг *Ush1g-Otop2* локуса «функциональными границами», отделяющими эти гены один от другого, или они (что вполне возможно) контролируют их сочетанную регуляцию [35].

Подобно *tlh* и *mlh* мышам мутантные по *Pmca2* / (Plasma membrane Ca^{2+} ATPase) имеют интактный эпителий сенсорных макул и покрывающие их желатинозные мембраны, но лишены отоконий в обоих мешочках [39]. В отличие от мутантов *tlh* и *mlh*, мутантные мыши *Pmca2* обнаруживают ряд аномалий структур органа Корти и выраженную глухоту.

Продолжительное воздействие медикаментозных средств, таких, как стрептомицин, приводит к образованию аномальных гигантских отоконий [69]. У рыбок данио с двойным нокаутом генов *Hmx2/Hmx3* также наблюдается появление слитых отолитов [22]. Охарактеризована рецессивная мутация у мышей *Slc26a4^{loop}* (*solute carrier protein26a4*), которая является рецессивной миссенс мутацией в гене *Slc26a4*, кодирующем белок пендрин [18]. Мутантные мыши *Slc26a4^{loop}* обнаруживают выраженную глухоту и аномальное вестибулярное поведение. Вместо многочисленных отоконий у них образуется один гигантский кальцитовый отолит в эллиптическом мешочке. В сферическом мешочке крупный отолит из карбоната кальция постепенно превращается в отолит из оксалата кальция. Эти минерализованные тела очень отличаются от отоконий дикого типа из кальцита не только составом, но и формой, а также способом воздействия на желатинозную мембрану и волосковые клетки. Интересно, что эти уникальные патологические оксалатные ушные камни образуются только в сферическом мешочке мутантов *Slc26a4^{loop}*.

Таким образом, образование гигантских минералов у мутантов *Slc26a4^{loop/loop}* ведёт к тому, что некоторые волосковые клетки лишены какого-либо груза отоконий, тогда как другие волосковые клетки испытывают избыточное давление гигантских камней. Поэтому обе популяции волосковых клеток лишены своего нативного источника стимуляции и не могут выполнять свою жизненно важную роль в вестибулярной функции и перцепции. Более того, гигантские минералы у мышей *Slc26a4^{loop/loop}* не могут более ограничиваться отоконияльными мешочками. Эктопические гигантские камни были обнаружены и в других компонентах вестибулярной системы, таких, как полукружные каналы и их гребешки.

Истощение компонентов органической и неорганической частей может приводить к разным дефектам отоконий. Например, делеция гена ионного канала *PMCA2* Ca^{2+} , ключевого игрока в установлении гомеостаза кальция в эндолимфе, ведёт к отсутствию отоконий [39]. Напротив, делеция гена отоконина-90, матричного белка отоконий млекопитающих, ведет к образованию гигантских минералов кальцита, лишённых основной органической фракции отоконий [81]. Контроль соответствующих уровней pH является критическим для сборки и стабилизации минералов. Белок пендрин может также участвовать в формировании отоконий путем поставки ионов HCO_3^- в эндолимфу, что важно для образования кристаллов кальцита (CaCO_3) отоконий [64, 67]. Предполагается, что нарушение активности белка пендрина у мутантов *Slc26a4^{loop/loop}* ведёт к разным уровням подкисления в каждом из двух мешочков. Следовательно, анатомические и гистологические различия между эллиптическим и сферическим мешочками, вместе с pH-чувствительными белками, которые дифференциально экспрессируются в их сенсорных макулах, могут быть ключом к

пониманию механизма, лежащего в основе сложной патологии. Стержневая структура гигантских кальцитовых минерализованных тел у мутантов *Slc26a4^{loop/loop}* указывает на то, что эти гигантские камни формируются из одного стержневого зародыша (nucleation core) вследствие продолжающегося роста скорее, чем в результате слияния тысяч зрелых частиц отоконий.

В целом, 12 разных генов с неизвестной функцией, вызывающие дефекты только отолитов, были описаны у рыбок данио [14, 24, 46, 56, 79]. Мутанты, лишённые отолитов в эллипсоидном мешочке с обеих сторон, теряют способность к балансу и моторной координации, они не ощущают силы тяжести и погибают во время личиночного развития.

Мутации, нарушающие гомеостаз эндолимфы

Верхушки волосковых клеток омываются эндолимфой, которая имеет высокое содержание K^+ и низкое — Na^+ , тогда как их базолатеральная поверхность омывается перилимфой с противоположным содержанием катионов. Установлено, что спинномозговая жидкость на 80% формирует перилимфу барабанной лестницы улитки посредством кохлеарного водопровода (рисунок). Экспрессия гена пендрина, обнаруживаемая в клетках наружной бороздки улитки, в переходных вестибулярных клетках и клетках эндолимфатического мешочка, участвует в обеспечении состава эндолимфатической жидкости. Вызываемые внешними раздражителями потенциалы рецепторов стереоцилий генерируются за счёт притока ионов K^+ из эндолимфы в волосковые клетки. Эти ионы K^+ затем секретируются через базолатеральную мембрану во внеклеточное пространство и перилимфу.

Несколько генов кодируют белки, которые участвуют в циркуляции ионов K^+ . Это, прежде всего, гены *Kcne1*, *Kcnq1* и *Kcnq4*, которые кодируют каналы калиевых ионов, и ген *Slc26a4*, который кодирует транспортёр анионов.

Гены *Kcne1*, *Kcnq1* и *Kcnq4* кодируют субъединицы активируемых низким электрическим напряжением калиевых каналов. Они открываются в ответ на деполяризацию волосковых клеток и облегчают избирательный отток K^+ через плазматическую мембрану. Каждый канал состоит из четырёх α - и нескольких β -субъединиц. Формирующие пору α -субъединицы достаточны для образования функциональных каналов, а β -субъединицы предопределяют уникальные свойства каналов.

Вестибулярные тёмные клетки секретируют K^+ в эндолимфу только с помощью K^+ каналов, состоящих из *Kcnq1* (α) и *Kcne1* (β) субъединиц. Нокаутные или мутантные мыши *Kcnq1* или *Kcne1* обладают классическим waltzer-подобным фенотипом с тяжёлой потерей слуха и вестибулярными симптомами [42, 43, 57]. Маргинальные клетки сосудистой стенки кортиева канала и вестибулярные тёмные клетки были неспособны секретиро-

вать ионы K^+ , что приводило к вторичной дегенерации нейроэпителия, включая волосковые клетки, и к коллапсу эндолимфатического пространства. Полукружные каналы выглядели истонченными. Сходным образом эндолимфатическое пространство спадалось у пациентов с синдромами Jervell и Lange—Nielsen и Romap—Ward, формами синдрома удлиненного QT, связанных с мутациями *KCNE1*. В то время как белок Kcnq1 является сердцевинной каналом, белок Kcne1 необходим для его доставки в плазматическую мембрану, так как вестибулярные темные клетки у нокаутных мышей *Kcne1* эктопически экспрессировали Kcnq1 в своей цитоплазме, а не как обычно — в своих апикальных мембранах.

Kcnq4 является α -субъединицей M-типа K^+ канала. каналы M-типа являются очень медленными зависимыми от напряжения K^+ -каналами. Kcnq4 обнаружен в базолатеральных частях мембраны волосковых клеток улитки [9] и преддверия [58] мышей. Получены две мышинные модели с мутантными *Kcnq4*: гомозиготные нокаутные мыши и мыши knock-in с точковой мутацией, которая имитирует доминантно негативную мутацию у людей. Они характеризуются потерей слуха, однако не выявлено вестибулярных симптомов в обеих мышинных моделях, хотя Kcnq4 строго экспрессируется в вестибулярных волосковых клетках мышей дикого типа [30]. Нокаутные по калиевому каналу мыши *Kcnj10* не генерируют внутриулитковый потенциал и обладают пониженными эндолимфатическим объемом и концентрацией K^+ .

Семейство SLC26 (solute carrier protein 26) обменников анионов включает интегральные белки с 10—12 трансмембранными доменами, которые могут транспортировать некоторые анионы. Каждый член этого семейства имеет отличительное сродство и специфичность в отношении каждого из анионов. Два члена SLC26 оказались ассоциированы с потерей слуха у людей: SLC26A4/pendrin и SLC26A5/prestin. Как было установлено, пендрин транспортирует анионы йодида, хлорида, соли муравьиной кислоты нитрата [63, 64]. Во внутреннем ухе мышей пендрин обнаруживается в апикальных частях мембран клеток, покрывающих эндолимфатические полости, это расценивается как участие его в гомеостазе эндолимфы. Нокаутные мыши *Slc26a4* / (*Pds*) обнаруживают waltzer-подобную вестибулярную дисфункцию и полную глухоту. У них наблюдается дилатация эндолимфатического протока, полукружных каналов, улитки и сферического мешочка, уменьшение отоконий в макулах и дегенерация волосковых клеток [21]. Эта дилатация, как полагают, вторична по отношению к измененным осмотическим условиям и увеличенному объему эндолимфатической жидкости. Волосковые клетки начинают дегенерировать. В преддверии отолиты и отолитовые мембраны также подвергаются деструкции [21]. Функциональные эксперименты выявили, что мыши *Pds* / постепенно

теряют внутриулитковый потенциал. Тем не менее, эндолимфатическая концентрация K^+ и экспрессия каналов Kcnq1/Kcne1 были нормальными. Следовательно, пендрин может выполнять роль по поддержанию внутриулиткового потенциала, не затрагивая секрецию K^+ . Во внутреннем ухе, как указывалось выше, пендрин функционирует как канал $Cl^- HCO_3^-$, который обеспечивает секрецию ионов HCO_3^- в эндолимфатическое пространство и одной из важнейших его ролей может быть поддержание pH в эндолимфе. Ca^{2+} каналы (Trpv5 и Trpv6) в эпителиальных клетках преддверия и улитки резорбируют ионы кальция из эндолимфы и ингибируются с помощью низкого pH эндолимфы. Эти каналы обычно поддерживают низкую концентрацию Ca^{2+} в эндолимфе. Нокаутные по пендрину мыши обнаруживают более низкий pH и более высокую концентрацию Ca^{2+} в эндолимфе, это приводит к снижению трансэпителиального потенциала в эллиптическом мешочке. Более высокий уровень Ca^{2+} в эндолимфе может ингибировать сенсорную трансдукцию и способствует дегенерации волосковых клеток. Ионный состав эндолимфы, скорее всего, является и ключевым регулятором проникновения аминогликозидных антибиотиков в волосковые клетки, как это демонстрируют мутантные по *Slc4a1b* рыбки данио.

Предполагается, что ген *Foxi1* (*winged helix/forkhead1*, известный также как *Fkh10*) индуцирует экспрессию пендрина [33]. Его мутации вызывают эндолимфатическую водянку и вследствие этого — дисморфогенез эндолимфатического протока и мешочка.

Мутации в Na-K-Cl-котранспортере Slc12a2 лежат в основе фенотипа мышей *shaker-with-syndactylism*, с поведением кружения, сходным с тем, что наблюдается у мышей *Pds*. Мутантные мыши неспособны продуцировать эндолимфу. Эндолимфатические компартменты спадаются к моменту рождения [16].

Гены *Gjb2* и *Gjb6* кодируют белки щелевых соединений connexin 26 (Cx26) и connexin 30 (Cx30), тогда как ген *Cldn14* (*claudin 14*) кодирует белок плотных соединений. Они обеспечивают взаимосвязь клеток и делают возможным быстрый транспорт широкого круга ионов и малых молекул (включая нуклеотиды, siRNAs и инозитол фосфаты) между соединенными клетками. У мутантных мышей волосковые клетки и поддерживающие их клетки начинают погибать. Кортиев канал спадается. Ретикулярная пластинка на апикальной поверхности сенсорного эпителия, которая представлена плотными соединениями между волосковыми клетками и поддерживающими их клетками, разрушается. Снижается концентрация K^+ и внутриулитковый потенциал. Следовательно, Cx26 щелевые соединения необходимы для рециклинга K^+ во внутреннем ухе. Однако при нокауте Cx26 в его преддверии экспрессия была нормальной и эти мыши не обнаруживали вестибулярных дефектов, несмотря на сообщение эндолимфатических пространств двух систем. Недав-

но было установлено, что *Gjb2*-мутации затрагивают проницаемость щелевых соединений для инозитол трифосфата скорее, чем для K^+ .

Плотные соединения большинства апикальных соединений в эпителиальных клетках служат в качестве главного ион-фильтрующего барьера. Плотные соединения состоят, по крайней мере, из трёх типов трансмембранных белков: occludin, claudins и членов семейства AMJ (junction adhesion molecule). Claudin-14 был обнаружен в плотных соединениях между волосковыми клетками и поддерживающими клетками и между соседними поддерживающими клетками. *Cldn14*-нулевые мыши имеют нормальный внутриулитковый потенциал, но глухи. Не обнаруживаются фенотипические отклонения в преддверии. Так как claudin-14 обладает более высокой проницаемостью для K^+ , чем для Na^+ , он может быть необходим для поддержания собственно ионного состава перилимфатической жидкости, окружающей базолатеральную поверхность волосковых клеток.

Мыши *Va* (*varitint-waddler*) содержат мутацию гена, кодирующего mscolin 3 (*Mcoln3*) [17]. Они глухи и имеют классический кивательный гиперкинез головы и поведение кружения, характерные для вестибулярных дефектов [68]. Белок *Mcoln3* обнаруживает сходство последовательностей с членами белков сверхсемейства TRP (transient receptor potential), включающих механорецепторные ионные каналы.

Мыши, лишённые *Erbh2*-рецепторной тирозин киназы в тёмных клетках вестибулярной системы, обнаруживают поведение кружения, связанное с вестибулярной дисфункцией и имеют истончённые полукружные каналы и пониженную продукцию эндолимфы в ампулах [15]. Улитка у таких животных, по-видимому, не затрагивается. Спонтанная мутация *jbg* (*jitterbug*), которая ведет к нарушению слуха и вестибулярной дисфункции у мышей, картирована в гене *Clic5* (*chloride intracellular channel 5*). *Clic5* принадлежит к семейству хлорных внутриклеточных каналов. Во внутреннем ухе мышей он специфически выявляется в базальной части стереоцилий волосковых клеток улитки и преддверия.

Наследственные нарушения вестибулярной функции у человека

Нарушения нормального функционирования вестибулярной системы могут возникать в любом возрасте, имея на то самые разные причины [1, 26, 70], в том числе и генетические нарушения [72].

Связанная с возрастом дегенерация отоконий встречается довольно часто, поэтому возрастает риск появления свободно плавающих частиц [31, 61]. Смещение отоконий или их оторванных частиц вне их нативной позиции может приводить к тяжёлой вестибулярной дисфункции у человека. Доброкачественные пароксизмальные позиционные головокружения (ДППГ) затрагивают свыше 9% популяции старых людей старше

65 лет [20, 50]. Предполагается генетическое предопределение ДППГ. Ген *BRV1* (*benign recurrent vertigo*) картирован в хромосоме 6p (<http://omim.org/entry/193007>). Другой локус ДППГ *BRV2* был идентифицирован на хромосоме 22q12 (<http://omim.org/entry/613106>). Разработано лечение, позволяющее перемещать частицы из полукружных каналов в преддверие лабиринта и таким образом купировать головокружения [52].

Эндолимфатический проток и мешочек обычно содержат лишь небольшие количества эндолимфы и не окружены перилимфатическим пространством (рисунк). Болезнь Меньера является вестибулярным расстройством в результате аномально большого количества эндолимфы во внутреннем ухе. Точная причина болезни Меньера не известна. Водянка эндолимфатического протока и мешочка может быть вызвана у модельных объектов генетическими нарушениями поддержания баланса эндолимфы. Предполагается, что болезнь имеет мультифакторную этиологию. Обнаруживается определённая связь болезни Меньера с областью-кандидатом на хромосомах 12p, 14 и 5. Иногда в качестве гена-кандидата болезни Меньера рассматривается ген *antiquitin* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12116217>) или *cochlin* (<http://omim.org/entry/603196>). Эта болезнь может встречаться при генетически обусловленных синдромах, таких, как синдром Пендреда и *branchio-otorenal* синдром. Она также может быть связана с анатомическими проблемами, такими, как «дисплазии Мондини», когда внутреннее ухо развивается не полностью.

Синдром зияния верхнего полукружного канала характеризуется образованием фистулы лабиринта, вследствие чего происходит истечение жидкости из внутреннего уха в полость среднего. Нарушается система гидродинамики, а затем и состояние сенсорных клеток канала. При обнаружении фистулы производится её пластика. Генетическая предрасположенность может объяснить, почему часть височной кости истончается, делается более ломкой и чувствительной к физическим травмам и медленной эрозии. Генетика этого синдрома не изучена, но среди исследованных пациентов у одного найдена мутация в гене *cochlin*.

Синдром Пендреда

В отличие от мышей *Slc26a4^{loop/loop}*, у которых поражение характеризуется образованием одиночных гигантских отоконий и нарушениями вестибулярной функции, мутации в гене человека *SLC26A4* ведут к несиндромальной форме глухоты (DFNB4) и синдромальной форме глухоты с увеличением щитовидной железы (Pendred syndrome) [66]. Для пациентов с синдромом Пендреда характерно радиологически обнаружимое специфическое увеличение вестибулярного водопровода (эндолимфатического протока и мешочка) [55]. Синдром вызывается мутациями в гене *PDS*. Ген располо-

жен на хромосоме 7q22-q31 и кодирует хлорид-иодидный транспортёр, который экспрессируется в щитовидной железе, внутреннем ухе и почках. Ген содержит 21 экзон и кодирует гликопротеин пендрин (780 аминокислот) с 11 или 12 трансмембранными доменами. Активность пендриновых каналов в группе переходных клеток эллиптического мешочка обеспечивает секрецию HCO_3^- для поддержания нормального уровня кислотности (pH 7.42) эндолимфатической жидкости. Неясно, почему мутации *SLC26A4* в гене *PDS* не вызывают серьёзных нарушений вестибулярной функции, хотя они нарушают образование эндолимфы.

Сходная ситуация несоответствия животных моделей наблюдается и для гена *otopetrin*. Установлено, что геномный контекст гена *OTOP1* у человека существенно отличается от такового у мышей и рыбок данио. У модельных животных тандем генов *Otop2-Otop3* физически образует кластер (голова—хвост) с геном *Ush1g*. Этот кластер, по-видимому, сохраняется и у человека, поскольку у человека гомологи гена *OTOP1*, гены *OTOP2* и *OTOP3*, картированы в регионах-кандидатах, ответственных за глухоту DFNA26 и синдром Ушера *USH1G* соответственно [35]. Ген *USH1G* является одним из пяти генов *USH* типа 1. У пациентов с мутациями в гене *USH1G* наблюдаются врождённая глухота, вестибулярная дисфункция и потеря зрения (пигментный ретинит), поскольку экспрессия *Otop1*, *Otop2* и *Otop3* обнаруживается и в сетчатке мыши и человека. К сожалению, пока неизвестны детали связи синдрома Ушера *USH1G* с мутациями в генах *OTOP2* и *OTOP3* и неясно, имеются ли при данном синдроме нарушения при образовании отоконий.

Итак, генетическая обусловленность нарушений вестибулярных функций у человека пока исследована недостаточно. В будущем, безусловно, будут найдены наследственные формы нарушений вестибулярной функции. В этом направлении ведутся активные поиски.

Список литературы

1. Лучихин Л.А. Вестибулярная проблема — аналитический обзор публикаций за 70 лет // Вестник оториноларингологии. — 2006. — №5. — С. 48—52.
2. Мглинец В.А. Генетика развития вестибулярной системы // Медицинская генетика (в печати).
3. Мглинец В.А. Генетика морфогенеза внутреннего уха позвоночных // Медицинская генетика — 2010. — №9 (5). — С. 3—11.
4. Мглинец В.А. Нейросенсорная глухота. 2. Генетические нарушения стереоцилий волосковых клеток // Медицинская генетика (в печати).
5. Acampora D., Merlo G.R., Paleari L. et al. Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5* // Development. — 1999. — Vol. 126. — P. 3795—3809.
6. Adamska M., Herbrand H., Adamski M. et al. FGFs control patterning of the inner ear but are not able to induce the full ear program // Mech. Dev. — 2001a. — Vol. 109. — P. 303—313.
7. Alagramam K.N., Murcia C.L., Kwon H.Y. et al. The mouse Ames waltzer hearing-loss mutant is caused by mutation of *Pcdh15*, a novel protocadherin gene // Nat. Genet. — 2001. — Vol. 27. — P. 99—102.
8. Asamura K., Abe S., Imamura Y. et al. Type IX collagen is crucial for normal hearing // Neuroscience. — 2005. — Vol. 132. — P. 493—500.
9. Beisel K.W., Rocha-Sanchez S.M., Yamoah E.N. et al. Differential expression of *KCNQ4* in inner hair cells and sensory neurons is the basis of progressive high-frequency hearing loss // J. Neurosci. — 2005. — Vol. 25 (40). — P. 9285—9293.
10. Bermingham N.A., Hassan B.A., Price S.D. et al. *Math1*: An essential gene for the generation of inner ear hair cells // Science. — 1999. — Vol. 284. — P. 1837—1841.
11. Bober E., Rinkwitz S., Herbrand H. Molecular Basis of Otic Commitment and Morphogenesis: A Role for Homeodomain-Containing transcription Factors and Signaling Molecules // Current Topics in Developmental Biology. — 2003. — Vol. 57. — P. 151—175.
12. Bok J., Chang W., Wu D.K. Patterning and morphogenesis of the vertebrate inner ear // Int. J. Dev. Biol. — 2007. — Vol. 51. — P. 521—533.
13. Chang W., Nunes F.D., De Jesus-Escobar J.M. et al. Ectopic noggin blocks sensory and nonsensory organ morphogenesis in the chicken inner ear // Dev. Biol. — 1999. — Vol. 216. — P. 369—381.
14. Colantonio J.R., Vermot J., Wu D. et al. The dyne in regulatory complex is required for ciliary motility and otolith biogenesis in the inner ear // Nature. — 2009. — Vol. 457 (7226). — P. 205—209.
15. Cowan C.A., Yokoyama N., Bianchi L.M. et al. EphB2 guides axons at the midline and is necessary for normal vestibular function // Neuron. — 2000. — Vol. 26. — P. 417—430.
16. Delpire E., Lu J., England R. et al. Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter // Nat. Genet. — 1999. — Vol. 22. — P. 192—195.
17. Di Palma F., Belyantseva I.A., Kim H.J. et al. Mutations in *Mcoln3* associated with deafness and pigmentation defects in varitint waddler (Va) mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99. — P. 14994—14999.
18. Dror A.A., Politi Y., Shahin H. et al. Calcium Oxalate Stone Formation in the Inner Ear as a Result of an *Slc26a4* Mutation // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285 (28). — P. 21724—21735.
19. Elkan-Miller T., Ulitsky I., Hertzano R. et al. Integration of Transcriptomics, Proteomics, and MicroRNA Analyses Reveals Novel MicroRNA Regulation of Targets in the Mammalian Inner Ear // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6 (4). — P. e18195.
20. Epley J.M. Positional vertigo related to semicircular canalithiasis // Otolaryngol. Head Neck Surg. — 1995. — Vol. 112. — P. 154—161.
21. Everett L.A., Belyantseva I.A., Noben-Trauth K. et al. Targeted disruption of mouse *Pds* provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome // Hum. Mol. Genet. — 2001. — Vol. 10. — P. 153—161.
21. Fasquelle L., Scott H.S., Lenoir M. et al. *Tmprss3*, a transmembrane serine protease deficient in human DFNB8/10 deafness, is critical for cochlear hair cell survival at the onset of hearing // J. Biol. Chem. — 2011. — Vol. 286 (19). — P. 17383—17397.
22. Feng Y., Xu Q. Pivotal role of *hmx2* and *hmx3* in zebrafish inner ear and lateral line development // Dev. Biol. — 2010. — Vol. 339 (2). — P. 507—518.
23. Fritzsche B., Beisel K.W. Molecular conservation and novelties in vertebrate ear development // Current Topics in Developmental Biology. — 2003. — Vol. 57. — P. 2—44.
24. Gap C., Wang G., Amack J.D., Mitchell D.R. *Odal6/Wdr69* Is Essential for Axonemal Dynein Assembly and Ciliary Motility During Zebrafish Embryogenesis // Dev. Dyn. — 2010. — Vol. 239. — P. 2190—2197.

25. Gerlach L.M., Hutson M.R., Germiller J.A. et al. Addition of the BMP antagonist, noggin, disrupts avian inner ear development // *Development*. — 2000. — Vol. 127. — P. 45–54.
26. Gurovskiy N.N., Bryanov I.I., Yegorov A.D. Changes in the vestibular function during space flight // *Acta Astronaut.* — 1975. — Vol. 2 (3–4). — P. 207–216.
27. Hadrys T., Braun T., Rinkwitz-Brandt S. et al. Nkx5.1 controls semicircular canal formation in the mouse inner ear // *Development*. — 1998. — Vol. 125. — P. 33–39.
28. Haugas M., Lillevali K., Hakanen J., Salminen M. Gata2 Is Required for the Development of Inner Ear Semicircular Ducts and the Surrounding Perilymphatic Space // *Dev. Dyn.* — 2010. — Vol. 239. — P. 2452–2469.
29. Hertzano R., Montcouquiol M., Rashi-Elkeles S. et al. Transcription profiling of inner ears from Pou4f3 (ddl/ddl) identifies Gf11 as a target of the Pou4f3 deafness gene // *Hum. Mol. Genet.* — 2004. — Vol. 13 (18). — P. 2143–2153.
30. Holt J.R., Stauffer E.A., Abraham D., Gerleroc G.S.G. Dominant-Negative Inhibition of M-Like Potassium Conductances in Hair Cells of the Mouse Inner Ear // *J. Neurosci.* — 2007. — Vol. 27 (33). — P. 8940–8951.
31. House M.G., Honrubia V. Theoretical Models for the Mechanisms of Benign Paroxysmal Positional Vertigo // *Audiol. Neurotol.* — 2003. — Vol. 8. — P. 91–99.
32. Hughes I., Binkley J., Hurle B.B. Identification of the Otopetrin Domain, a conserved domain in vertebrate otopetrins and invertebrate otopetrin-like family members // *BMC Evolutionary Biology*. — 2008. — Vol. 8. — P. 41.
33. Hulander M., Kiernan A.E., Blomqvist S.R. et al. Lack of pendrin expression leads to deafness and expansion of the endolymphatic compartment in inner ears of Foxi1 null mutant mice // *Development*. — 2003. — Vol. 130. — P. 2013–2025.
34. Hurle B., Ignatova E., Massironi S.M. et al. Non-syndromic vestibular disorder with otoconial agenesis in tilted/mergulhador mice caused by mutations in otopetrin 1 // *Hum. Mol. Genet.* — 2003. — Vol. 12 (7). — P. 777–789.
35. Hurle B., Marques-Bonet T., Antonacci F. et al. Lineage-specific evolution of the vertebrate Otopetrin gene family revealed by comparative genomic analyses // *BMC Evolutionary Biology*. — 2011. — Vol. 11. — P. 23.
36. Kiernan A.E., Ahituv N., Fuchs H. et al. The Notch ligand Jagged1 is required for inner ear sensory development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2001. — Vol. 98. — P. 3873–3878.
37. Kiernan A.E., Pelling A.L., Leung K.K. et al. Sox2 Is Required for Sensory Organ Development in the Mammalian Inner Ear // *Nature*. — 2005. — Vol. 434 (7036). — P. 1031–1035.
38. Kohlhasse J., Wischermann A., Reichenbach H. et al. Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome // *Nat Genet.* — 1998. — Vol. 18. — P. 81–83.
39. Kozel P.J., Friedman R.A., Erway L.C. et al. Balance and hearing deficits in mice with a null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2 // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273. — P. 18693–18696.
40. Kwak S.J., Phillips B.T., Heck R., Riley B.B. An expanded domain of fgf3 expression in the hindbrain of zebrafish valentino mutants results in mis-patterning of the otic vesicle // *Development*. — 2002. — Vol. 129. — P. 5279–5287.
41. Leger S., Brand M. Fgf8 and Fgf3 are required for zebrafish ear placode induction, maintenance and inner ear patterning // *Mech. Dev.* — 2002. — Vol. 119. — P. 91–108.
42. Lee M.P., Ravenel J.D., Hu R.J. et al. Targeted disruption of the Kvlqt1 gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice // *J. Clin. Invest.* — 2000. — Vol. 106. — P. 1447–1455.
43. Letts V.A., Valenzuela A., Dunbar C. et al. A new spontaneous mouse mutation in the Kcne1 gene // *Mamm. Genome*. — 2000. — Vol. 11. — P. 831–835.
44. Li H., Kloosterman W., Fekete D.M. MicroRNA-183 family members regulate sensorineural fates in the inner ear // *J. Neurosci.* — 2010. — Vol. 30 (9). — P. 3254–3263.
45. Ma Q., Anderson D.J., Fritsch B. Neurogenin1 null mutant ears develop fewer, morphologically normal hair cells in smaller sensory epithelia devoid of innervation // *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* — 2000. — Vol. 1. — P. 129–143.
46. Malicki J., Schier A.F., Solnica-Krezel L. et al. Mutations affecting development of the zebrafish ear // *Development*. — 1996. — Vol. 123. — P. 275–283.
47. Merlo G.R., Paleari L., Mantero S. et al. The Dlx5 homeobox gene is essential for vestibular morphogenesis in the mouse embryo through a BMP4-mediated pathway // *Dev. Biol.* — 2002. — Vol. 248. — P. 157–169.
48. Morsli H., Tuorto F., Choo D. et al. Otx1 and Otx2 activities are required for the normal development of the mouse inner ear // *Development*. — 1999. — Vol. 126. — P. 2335–2343.
49. Nakano Y., Jahan I., Bonde G. et al. A Mutation in the Srm4 Gene Causes Alternative Splicing Defects and Deafness in the Bronx Waltzer Mouse // *PLoS Genet.* — 2012. — Vol. 8 (10). — e1002966.
50. Oghalai J.S., Manolidis S., Barth J.L. et al. Unrecognized benign paroxysmal positional vertigo in elderly patients // *Otolaryngol. Head Neck Surg.* — 2000. — Vol. 122. — P. 630–634.
51. Paffenholz R., Bergstrom R. A., Pasutto F. et al. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase // *Genes & Dev.* — 2004. — Vol. 18. — P. 486–491.
52. Parnes L.S., Agrawal S.K., Atlas J. Diagnosis and management of benign paroxysmal positional vertigo (BPPV) // *CMAJ*. — 2003. — Vol. 169. — P. 681–693.
53. Pauley S., Wright T.J., Pirvola et al. Expression and function of FGF10 in mammalian inner ear development // *Dev. Dyn.* — 2003. — Vol. 227. — P. 203–215.
54. Ponnio T., Burton Q., Pereira F.A. The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear // *Mol. Cell. Biol.* — 2002. — Vol. 22. — P. 935–945.
55. Reardon W., Mahoney C.F., O'Trembath R. et al. Enlarged vestibular aqueduct: a radiological marker of Pendred syndrome, and mutation of the PDS gene // *Oxford J. Med.* — 2000. — Vol. 93 (2). — P. 99–104.
56. Riley B.B., Moorman S.J. Development of utricular otoliths, but not saccular otoliths, is necessary for vestibular function and survival in zebrafish // *J. Neurobiol.* — 2000. — Vol. 43. — P. 329–337.
57. Rivas A., Francis H.W. Inner ear abnormalities in a Kcnq1 (Kvlqt1) knockout mouse: a model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome // *Otol. Neurotol.* — 2005. — Vol. 26 (3). — P. 415–424.
58. Rocha-Sanchez S.M., Morris K.A., Kachar B. et al. Developmental expression of Kcnq4 in vestibular neurons and sensory epithelia // *Brain Res.* — 2007. — Vol. 1139. — P. 117–125.
59. Robledo R.F., Lufkin T. Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are required for specification of the mammalian vestibular apparatus // *Genesis*. — 2006. — Vol. 44. — P. 425–437.
60. Romand R., Sapin V., Dolle P. Spatial distributions of retinoic acid receptor gene transcripts in the prenatal mouse inner ear // *J. Comp. Neurol.* — 1998. — Vol. 393. — P. 298–308.
61. Ross M.D., Peacor D., Johnsson L.G., Allard L.F. Observations on normal and degenerating human otoconia // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* — 1976. — Vol. 85. — P. 310–326.

62. Salminen M., Meyer B.I., Bober E., Gruss P. Netrin 1 is required for semicircular canal formation in the mouse inner ear // *Development*. — 2000. — Vol. 127. — P. 13–22.
63. Scott D.A., Wang R., Kreman T.M. et al. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein // *Nat. Genet.* — 1999. — Vol. 21 (4). — P. 440–443.
64. Scott D.A., Karniski L.P. Human pendrin expressed in *Xenopus laevis* oocytes mediates chloride/formate exchange // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2000. — Vol. 278. — P. 207–211.
65. Sekerkova G., Richter C.-P., Bartles J.R. et al. Roles of the Espin Actin-Bundling Proteins in the Morphogenesis and Stabilization of Hair Cell Stereocilia Revealed in CBA/CaJ Congenic Jerker Mice // *PLoS Genet.* — 2011. — Vol. 7 (3). — e1002032.
66. Sheffield V.C., Kraiem Z., Beck J.C. et al. Pendred syndrome maps to chromosome 7q21-34 and is caused by an intrinsic defect in thyroid iodine organification // *Nat. Genet.* — 1996. — Vol. 12. — P. 424–426.
67. Soleimani M., Greeley T., Petrovic S. et al. Pendrin: an apical Cl⁻/OH⁻/HCO₃⁻ exchanger in the kidney cortex // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* — 2001. — Vol. 280. — F356–F364.
68. Steel K.P. Varitint-waddler: a double whammy for hearing // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2002. — Vol. 99. — P. 14613–14615.
69. Takumida M., Zhang D.M., Yajin K., Harada Y. Formation and fate of giant otoconia of the guinea pig following streptomycin intoxication // *Acta Otolaryngol.* — 1997. — Vol. 117. — P. 538–544.
70. Thalmann R., Ignatova E., Kachar B. et al. Development and maintenance of otoconia: Biochemical considerations // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2001. — Vol. 942. — P. 162–178.
71. ten Berge D., Brouwer A., Korving J. et al. Prx1 and Prx2 in skeletogenesis: Roles in the craniofacial region, inner ear and limbs // *Development* — 1998. — Vol. 125. — P. 3831–3842.
72. Todt I., Hennies H.C., Basta D., Ernst A. Vestibular dysfunction of patients with mutations of Connexin 26 // *NeuroReport*. — 2005. — Vol. 16 (11). — P. 1179–1181.
73. Tsai H., Hardisty R.E., Rhodes C. The mouse slalom mutant demonstrates a role for Jagged1 in neuroepithelial patterning in the organ of Corti // *Hum. Mol. Genet.* — 2001. — Vol. 10. — P. 507–512.
74. Van Camp G., Smith R. Hereditary Hearing Loss Homepage. On World Wide Web URL: <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>.
75. Wang W., Van De Water T., Lufkin T. Inner ear and maternal reproductive defects in mice lacking the Hmx3 homeobox gene // *Development*. — 1998. — Vol. 125. — P. 621–634.
76. Wang W., Chan E.K., Baron S., Van De Water T. Hmx2 homeobox gene control of murine vestibular morphogenesis // *Development*. — 2001. — Vol. 128. — P. 5017–5029.
77. Wang Y., Kowalski P.E., Thalmann I. et al. Otoconin-90, the mammalian otoconial matrix protein, contains two domains of homology to secretory phospholipase A2 // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1998. — Vol. 95. — P. 15345–15350.
78. Wassarman K.M., Lewandoski M., Campbell K. et al. Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function // *Development*. — 1997. — Vol. 124. — P. 2923–2934.
79. Whitfield T.T., Riley B.B., Chiang M.Y., Phillips B. Development of the zebrafish inner ear // *Dev. Dyn.* — 2002. — Vol. 223. — P. 427–458.
80. Xiang M., Gan L., Li D. et al. Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1997. — Vol. 94. — P. 9445–9450.
81. Zhao X., Yang H., Yamoah E. N., Lundberg Y. W. Gene targeting reveals the role of Oc90 as the essential organizer of the otoconial organic matrix // *Dev. Biol.* — 2007. — Vol. 304. — P. 508–524.
82. Zou D., Erickson C., Kim E.-H. et al. Eye1 gene dosage critically affects the development of sensory epithelia in the mammalian inner ear // *Human Mol. Genet.* — 2008. — Vol. 17 (210). — P. 3340–3356.

Genetic disorders of vestibular system

Mglinets V.A.

Research Centre for Medical Genetics,
115478, Moscow, ul. Moskvorechye, 1, Russia, e-mail: mglinetz@med-gen.ru

Some genetic disorders of vestibular apparatus in animal models are considered in this review. These disorders mainly affect the formation or the entire vestibular system, or the semicircular canals, as well as spherical sac, elliptical sac or endolymphatic sac. Disorders may also involve neural or sensory components of the vestibular apparatus. Disorders of formation and functioning of otoconia and vestibular endolymph are also considered. Some vestibular disorders in humans are discussed.

Key words: vestibular system, genetic disorders

Влияние генетических факторов человека на высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ)*

Туманов А.С.

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» МЗ РФ,
123098, Москва, ул. Гамалеи, 16, тел./факс: 8-499-190-30-63, e-mail: desep@mail.ru

Изучение генетических факторов человека, ассоциированных с эффективностью лечения ВИЧ-инфекции, является важным направлением в борьбе с ней и СПИДом. За последние два десятилетия было обнаружено много ассоциаций между различными аллельными вариантами генов человека и эффективностью антиретровирусной терапии (АРТ) ВИЧ-инфекции. Особенный интерес для исследователей представляют аллельные варианты генов, ассоциированные с тяжёлыми осложнениями, возникающими при применении АРТ. Многие из изученных ассоциаций требуют проведения подтверждающих и уточняющих исследований. В данной статье проведён обзор генетических факторов, дающий ключ к пониманию возможности повышения эффективности применения АРТ для ВИЧ-инфицированных пациентов.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, генетические факторы хозяина, высокоактивная антиретровирусная терапия

Введение

Внедрённая в медицинскую практику около 25 лет назад АРТ на первых этапах оказалась недостаточно эффективным инструментом в борьбе с ВИЧ-инфекцией и СПИДом, однако последующее появление высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) позволило существенно повысить действенность лечения ВИЧ-инфицированных лиц, увеличить продолжительность и повысить качество их жизни.

Использование ВААРТ привело к увеличению числа научных исследований по повышению эффективности её применения, что, в свою очередь, позволило обнаружить один из важнейших факторов, оказывающих влияние на эффективность применения ВААРТ в борьбе с ВИЧ-инфекцией и СПИДом, — геном человека. Поиск аллельных вариантов генов человека, ассоциированных с эффективностью ВААРТ, является на данный момент времени одним из важнейших направлений научных изысканий в сфере борьбы с ВИЧ-инфекцией и СПИДом. В данной статье это и нашло своё отражение в виде небольшого обзора по генетическим факторам человека, ассоциированным с ВААРТ.

Эффективность антиретровирусных препаратов

С каждым годом в мире проводится всё больше исследований, посвящённых влиянию особенностей генома человека на успешность применения АРТ. Особенный интерес для исследователей представляет влияние генетических факторов человека на эффективность применения разных групп антиретровирусных препаратов и возникновение при этом разнообразных осложнений у ВИЧ-инфицированных пациентов.

К таким генетическим факторам относятся метаболические ферменты. Их ярким образцом служит большая группа ферментов суперсемейства цитохромов P450 (cytochrome P450, CYP450), основной функцией которых является катализ окисления органических субстанций. Большая часть семейства CYP450 вовлечена в метаболизм и биоактивацию лекарственных препаратов, участвуя в 75% общего числа различных метаболических реакций, при этом, как правило, чем сильнее экспрессия данных ферментов, тем ниже концентрация лекарственных препаратов в клетке, и наоборот.

Применительно к АРТ объектом влияния данной группы является содержание препаратов АРТ в клетках, продуцирующих ВИЧ. У пациентов, имеющих низкую экспрессию или недостаток части метаболических ферментов, наблюдается высокая плазматическая концентрация лекарственных препаратов, которая, в свою очередь, может вызвать токсичность. Напротив, при слишком высокой активности ферментов группы CYP450 концентрация лекарственных препаратов не достигает уровня эффективности, достаточной для ингибирования вируса.

Так, установлено, что изофермент CYP2D6 метаболизирует большую часть антиретровирусных препаратов. Аллельные варианты *CYP2D6*9*, *CYP2D6*10* и *CYP2D6*17* ассоциированы с ингибированием изофермента CYP2D6, в то время как присутствие аллеля *CYP2D6*2* усиливает ферментативную активность. Аллельные варианты изоферментов CYP2C9 и CYP2C19 также связывают с инактивацией данных изоферментов или снижением их аффинности к субстрату [9, 13, 17].

* Работа выполнена при финансовой поддержке Седьмой рамочной программы Европейского союза по проекту Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network (CHAIN) №223131, а также Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашения 8148, 8154 и 8479.

Сильное влияние на активность и экспрессию семейства ферментов оказывает наличие однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах, ответственных за кодирование данных ферментов. Появление SNP в генах происходит в результате точковых мутаций (замена одного азотистого основания другим), что, как правило, приводит к изменению экспрессии и функциональности соответствующих кодируемых белков.

Многие исследователи уделяют внимание поиску однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах ферментов семейства CYP450, которые оказывают влияние на эффективность АРТ путём изменения экспрессии и активности ферментов данного семейства. В таблице представлены некоторые известные SNP в генах ферментов семейства CYP450, например уже установлено, что гаплотип *CYP2B6**6 связан с низкой экспрессией CYP2B6 белка, которая приводит к увеличению концентрации эфавиренца в цитоплазме клетки [1, 9, 13, 23, 26].

Важным фактором успешности применения АРТ является преодоление так называемой множественной лекарственной устойчивости организма, представляющей собой защитный механизм, снижающий внутриклеточную концентрацию потенциально токсичных агентов широкого спектра химических веществ (ксенобиотиков), включая лекарственные препараты.

К внутриклеточным факторам, реализующим данный механизм, относятся транспортный белок множественной лекарственной устойчивости (MDR) Р-гликопротеин (P-glycoprotein, P-gr). P-gr принадлежит к большому семейству ABC-транспортных белков, в составе которого имеется ABCB1. Кодировается P-gr у человека геном *MDR1*, который отличается заметным полиморфизмом.

Так, например, полиморфизм C3435T (замена цитозина на тимин) в 26-м экзоне гена *MDR1*, по результатам некоторых работ, ассоциирован с фармакокинетикой ингибитора протеазы (ИП) ВИЧ-1 нелфинавира. При наличии замены С на Т происходит увеличение экспрессии белка, что выражается снижением концентрации препарата в цитоплазме. Во многих работах отмечают, что данный вид полиморфизма имеет слабое неравновесное сцепление с двумя другими SNP белка P-gr — G2677T и C1236T [7, 20, 23, 25].

Так же как и Р-gr, другие транспортные белки множественной лекарственной устойчивости, в частности MRP, могут определять низкую терапевтическую концентрацию лекарственных препаратов. Например, у пациентов, получающих ВААРТ и имеющих низкую экспрессию MRP1, обнаружили более высокую внутриклеточную концентрацию ритонавира и саквинавира, чем у пациентов с высокой экспрессией MRP1 [7, 25].

Таким образом, генетическая вариабельность и функциональность полиморфизмов у ABC- и MRP-белков, а также метаболизирующих ферментов, в совокупности отражаясь на вариативности лекарственного ответа, оказывает сильное влияние на эффект применения антиретровирусных препаратов.

Реакция гиперчувствительности

Одно из тяжёлых осложнений, с которым приходится сталкиваться при применении антиретровирусных препаратов, — реакция гиперчувствительности (РГЧ), которая при определённых условиях может привести к смерти пациента. В терапевтической практике описано, по крайней мере, два вида РГЧ — к препаратам «абакавир» из группы нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ОТ) (НИОТ) и «невирапин» из группы ненуклеозидных ингибиторов ОТ (ННИОТ).

В работах многих исследователей было показано, что РГЧ к этим препаратам имеет связь с особенностями генома хозяина. Примером может служить провоспалительный цитокин — фактор некроза опухоли (TNF-α), оказывающий влияние на липидный метаболизм, коагуляцию, устойчивость к инсулину, функционирование эндотелия и активирующий ядерный транскрипционный фактор NF-κB. Оказалось, что полиморфизм 308A в гене *TNF-α* ассоциирован с гиперчувствительностью к абакавиру у представителей негроидной расы [21].

Многие исследователи находят связь РГЧ с человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA), которые кодируются группой генов человеческого комплекса гистосовместимости (МНС) и выполняют функцию распознавания чужеродных либо собственных антигенов, играющую важную роль в активации иммунного ответа.

Таблица

Генетические варианты изоферментов семейства CYP450, ассоциированных с осложнениями, возникающими при ВААРТ

Ген	SNP	Идентификационный номер SNP	Лекарственный препарат	Фармодинамика
<i>CYP2B6</i>	G516T	rs3745274	Невирапин	Реакция гиперчувствительности
			Эфавиренц	Периферическая нейропатия
	T983C	rs28399499	Невирапин	Реакция гиперчувствительности
			Эфавиренц	Периферическая нейропатия
<i>CYP3A4*1B</i> / <i>CYP3A5*1</i>			Индинавир	Гипербилирубинемия Нефролитиаз

Наличие аллеля *HLA-B*5701* тесно ассоциировано с реакцией гиперчувствительности к абакавиру и его производным среди лиц европеоидной расы; его встречаемость в европейской популяции в среднем составляет 3—8% [26]. Этот пример активно обсуждался в литературе [18, 22] и до сих пор считается наиболее удачным, т.е. имеющим максимальную прогностическую ценность, в отношении осложнений лечения ВИЧ-инфекции.

На практике, управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) с 2008 г. рекомендует проводить тестирование пациентов на *HLA-B*5701* перед назначением терапии абакавиром, что снижает риск развития РГЧ к препарату. В России данное тестирование рекомендовано с 2009 г. (Приказ Росздравнадзора от 03.12.2009).

Ещё одним примером влияния на эффект ВААРТ может служить аллельный вариант *HLA-DRB1*0101*, который, возможно, является иммуногенетическим маркером гиперчувствительности к невирапину, проявляющейся невирапинсвязанными гепатитами и сыпью у европеоидов. Кроме аллеля *HLA-DRB1*0101* с гиперчувствительностью к невирапину связывают ещё несколько аллелей: *HLA-Cw*8*, *HLA-B*14*, *HLA-Cw*4*, *HLA-B*3505* [2, 14, 23, 26, 27].

Как видно из приведённых данных, реакция гиперчувствительности имеет более сильную связь с особенностями генома хозяина, чем это представлялось ранее. Таким образом, знание о данной особенности связи РГЧ с генными факторами человека даёт возможность на практике снизить число случаев РГЧ, возникающих у ВИЧ-инфицированных индивидуумов, находящихся на АРТ.

Липодистрофия

Липодистрофия представляет собой одно из тяжёлых осложнений, возникающих у ВИЧ-инфицированных пациентов при применении антиретровирусных препаратов, включая ингибиторы протеазы, и характеризуется, в первую очередь, потерей подкожной жировой клетчатки в области лица, рук и ног. У некоторых ВИЧ-инфицированных лиц липодистрофия может протекать с сопутствующим отложением лишнего жира в области шеи и верхней части спины, что приводит к образованию двойного подбородка и горбу на спине («горб буйвола»).

Липодистрофия развивается примерно у 40% пациентов в течение года после начала лечения, если в схемы антиретровирусного лечения включены ингибиторы протеазы. Таким образом, приобретённая липодистрофия у ВИЧ-инфицированных лиц, получающих АРТ, — широко распространённое осложнение.

Большинство ВИЧ-инфицированных индивидуумов с липодистрофией могут считаться относительно здоровыми, однако нередко она сопровождается резистентностью к инсулину, гипертриглицеридемией и снижением

уровня концентрации липопротеинов высокой плотности в плазме крови.

Как и описанные до этого ранее осложнения, липодистрофия, как оказалось, тоже имеет связь с геномом человека. Так, было замечено, что полиморфизм С3954Т гена *IL-1β*, кодирующего провоспалительный цитокин — член семейства интерлейкина 1, снижает риск развития липодистрофии у ВИЧ-инфицированных пациентов, находящихся на ВААРТ и принимающих, в частности, ставудин из группы НИОТ [6]. Полиморфизм 238А гена *TNF-α* связывают с липодистрофией, нередко наблюдаемой у пациентов европеоидной расы, получающих в качестве лечения препараты группы НИОТ [21, 24]. Ещё один ген *IL-18*, ассоциированный, по мнению некоторых авторов [10], с липодистрофией, содержит несколько полиморфизмов, которые в комбинации ассоциируются с защитным эффектом против липодистрофии.

Полиморфизмы Т455С, С482Т и С3238G гена *APOC3*, кодирующего аполипопротеин плазмы крови из группы липопротеинов низкой и высокой плотности, по результатам некоторых исследований, приводят к увеличению содержания триглицеридов в крови при применении антиретровирусных препаратов из группы ИП, в частности ритонавира; это, в свою очередь, увеличивает риск липодистрофии и сердечно-сосудистых заболеваний [8].

Наличие липодистрофии у ВИЧ-инфицированных индивидуумов, находящихся на ВААРТ, связывают также с полиморфизмами генов *Fas*, *Arb2*, *Arb3*, *HFE*, *LPIN1* или *POLG* [11, 15, 19, 28].

Нейропатия

Нередко у ВИЧ-инфицированных лиц, находящихся на АРТ, наблюдаются различные осложнения со стороны нервной системы; примером может служить периферическая нейропатия. *Периферическая нейропатия* — это состояние, вызванное повреждением одного или нескольких периферических нервов, приводящее к нарушению обмена сигналами между центральной и периферической нервными системами. Симптомы периферической нейропатии развиваются постепенно и медленно прогрессируют; чаще всего, пациенты испытывают покалывание и онемение, которые сначала начинаются в кистях рук и стопах, а затем распространяются на всё тело.

Этот вид осложнений чаще всего связывают с побочным эффектом препаратов группы НИОТ, при этом многие исследования обнаруживают связь между периферической нейропатией и геномом человека.

Так, при применении ставудина и его производных у ВИЧ-инфицированных пациентов, в геноме которых имеются полиморфизмы С2890Т и А3428G гена *POLG* митохондриальной ДНК, кодирующего митохондриальную γ-ДНК-полимеразу, наблюдается риск развития периферической нейропатии [3].

Полиморфизмы G516T и C983T в гене, кодирующем метаболический изофермент CYP2B6, ассоциированы с сильным повышением риска появления периферической нейропатии у пациентов, получающих эфавиренц. Аналогичные осложнения лечения эфавиренцем связывают с наличием полиморфизма C3435T гена *MDR1* [16].

Другие осложнения ВААРТ

В сфере интересов исследователей среди осложнений, встречающихся у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих специфическое лечение, находится также гипербилирубинемия — состояние, характеризующееся увеличенным количеством в сыворотке крови желчного пигмента билирубина.

Фермент UGT1A1 трансформирует небольшие липофильные молекулы, такие, как билирубин, стероиды, гормоны, лекарственные вещества, в водорастворимую форму, пригодную для дальнейшей экскреции. Он оказывает влияние и на токсичность антиретровирусных препаратов — атазанавира, индинавира из группы ингибиторов протеаз, и на уровень билирубина в крови у ВИЧ-инфицированных пациентов. Как было обнаружено, наличие аллеля *UGT1A1**28, связанного со снижением транскрипции данного фермента, повышает риск развития гипербилирубинемии [23, 26, 27].

У индивидуумов, получающих ВААРТ, при наличии аллеля *HLA-A**68 наблюдается высокий риск астматических осложнений, в то время как у лиц, имеющих аллель *HLA-Cw**6, шанс получить астму намного ниже [12].

Другое осложнение — нейтропения — характеризуется угрозой жизни состоянием в виде быстрого снижения числа циркулирующих в крови нейтрофилов; по результатам некоторых проведённых исследований нейтропения ассоциируется с полиморфизмом A1203A (rs11568695) гена *MRP4* [4].

У такого осложнения, как дислипидемия, характеризующегося повышением содержания липидов в крови ВИЧ-инфицированных пациентов, принимающих ритонавир, многие исследователи находят связь с группой генов человека: *ABCA1*, *APOA5*, *APOC3*, *APOE* и *CETP* [5, 19].

Заключение

Как видно из данных этого краткого обзора, с каждым годом становится всё очевиднее наличие сильной связи между эффективностью применения ВААРТ у ВИЧ-инфицированных индивидуумов и особенностями генома человека, что позволяет говорить о появлении в скором времени новых методов прогнозирования, планирования, применения и повышения эффективности ВААРТ с учётом этих ассоциаций. В данном обзоре представлена лишь малая часть генетических факторов человека, оказывающих заметное влияние на проявление осложнений при проведении ВААРТ и её эффективности.

Список литературы

1. Akihiko S., Stephen A. Spector Effect of Host Genetic Variation on the Pharmacokinetics and Clinical Response of Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors // *Futur HIV Ther.* — 2008. — Vol. 2, №1. — P. 69—81.
2. Alfrevic A., Pirmohamed M. Drug induced hypersensitivity and the HLA complex // *Pharmaceuticals.* — 2011. — Vol. 4. — P. 69—90.
3. Anderson K.S. A transient kinetic approach to investigate nucleoside inhibitors of mitochondrial DNA polymerase gamma // *Methods.* — 2010. — Vol. 51, №4. — P. 392—398.
4. Anderson P.L., Lamba J., Aquilante C.L. et al. Pharmacogenetic characteristics of indinavir, zidovudine, and lamivudine therapy in HIV-infected adults: a pilot study // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* — 2006. — Vol. 42. — P. 441—449.
5. Arnedo M., Taffe P., Sahli R. et al. Contribution of 20 single nucleotide polymorphisms of 13 genes to dyslipidemia associated with antiretroviral therapy // *Pharmacogenet. Genomics.* — 2007. — Vol. 17, №9. — P. 755—764.
6. Asensi V., Rego C., Montes A.H., Collazos J. et al. IL-1beta (+3954C/T) polymorphism could protect human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients on highly active antiretroviral treatment (HAART) against lipodystrophic syndrome // *Genet. Med.* — 2008. — Vol. 10, №3. — P. 215—223.
7. Bierman W.F., Scheffer G.L., Schoonderwoerd A. et al. Protease inhibitors atazanavir, lopinavir and ritonavir are potent blockers, but poor substrates, of ABC transporters in a broad panel of ABC transporter-overexpressing cell lines // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2010. — Vol. 65, №8. — P. 1672—1680.
8. Bonnet E., Bernard J., Fauvel J. et al. Association of APOC3 polymorphisms with both dyslipidemia and lipodystrophy in HAART-receiving patients // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* — 2008. — Vol. 24, №2. — P. 169—171.
9. Brown K.C., Hosseinipour M.C., Hoskins J.M. et al. Exploration of CYP450 and drug transporter genotypes and correlations with nevirapine exposure in Malawians // *Pharmacogenomics.* — 2012. — Vol. 13, №1. — P. 113—121.
10. Castelar L., Silva M.M., Castelli E.C. et al. Interleukin-18 and interferon-gamma polymorphisms in Brazilian human immunodeficiency virus-1-infected patients presenting with lipodystrophy syndrome // *Tissue Antigens.* — 2010. — Vol. 76, №2. — P. 126—130.
11. Chiappini F., Teicher E., Saffroy R. et al. Relationship between polymerase gamma (POLG) polymorphisms and antiretroviral therapy-induced lipodystrophy in HIV-1 infected patients: a case-control study // *Curr. HIV Res.* — 2009. — Vol. 7, №2. — P. 244—253.
12. Foster S.B., Lu M., Thompson B., Rich K.C., Matukas L.M., Mason R., Winchester R., MacDonald K.S., Shearer W.T. Association between HLA inheritance and asthma medication use in HIV positive children // *Aids.* — 2010. — Vol. 24, №13. — P. 2133—2135.
13. Heil S.G., van der Ende M.E., Schenk P.W. et al. Associations between ABCB1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2D6, and CYP3A5 alleles in relation to efavirenz and nevirapine pharmacokinetics in HIV-infected individuals // *Ther. Drug Monit.* — 2012. — Vol. 34, №2. — P. 153—159.
14. Huang X., Ling H., Mao W., Ding X. et al. Human leukocyte antigen profile in HIV-1 infected individuals and AIDS patients from Chongqing, China // *Microbiol. Immunol.* — 2009. — Vol. 53, №9. — P. 512—523.
15. Kallianpur A.R., Hulan T., Canter J.A. et al. Hemochromatosis (HFE) gene mutations and peripheral neuropathy during antiretroviral therapy // *AIDS.* — 2006. — Vol. 20. — P. 1503—1513.

16. Kallianpur A.R., Hulan T. Pharmacogenetics of nucleoside reverse-transcriptase inhibitor-associated peripheral neuropathy // *Pharmacogenomics*. — 2009. — Vol. 10. — P. 623–637.
17. Kirby B.J., Collier A.C., Kharasch E.D. et al. Complex drug interactions of HIV protease inhibitors 2: in vivo induction and in vitro to in vivo correlation of induction of cytochrome P450 1A2, 2B6, and 2C9 by ritonavir or nelfinavir // *Drug Metab. Dispos.* — 2011. — Vol. 39, №12. — P. 2329–2337.
18. Mallal S., Phillips E., Carosi G. et al. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir // *N. Engl. J. Med.* — 2008. — Vol. 358, №6. — P. 568–579.
19. Marzocchi A., Schwarz J., Di Giambenedetto S. et al. The effect of polymorphisms in candidate genes on the long-term risk of lipodystrophy and dyslipidemia in HIV-infected white patients starting antiretroviral therapy // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. — 2011. — Vol. 27, №12. — P. 1299–1309.
20. Masebe T.M., Bessong P.O., Nwobegahay J. et al. Prevalence of MDR1 C3435T and CYP2B6 G516T polymorphisms among HIV-1 infected South African patients // *Dis. Markers*. — 2012. — Vol. 32, №1. — P. 43–50.
21. Nolan D., Moore C., Castley A. et al. Tumour necrosis factor- α gene-238G/A promoter polymorphism associated with a more rapid onset of lipodystrophy // *AIDS*. — 2003. — Vol. 17. — P. 121–123.
22. Rizzardini G, Zucchi P. Abacavir and lamivudine for the treatment of human immunodeficiency virus // *Expert. Opin. Pharmacother.* — 2011. — Vol. 12, №13. — P. 2129–2138.
23. Sanchez H.V., Gutierrez R.F. Toxicogenetics of antiretroviral treatment (II): neurotoxicity, hepatotoxicity, lactic acidosis, kidney damage, and other adverse effects of antiretroviral drugs // *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* — 2008. — Vol. 26, №6. — P. 24–33.
24. Silva M.M., Simoes R.T., Castelli E.C. et al. TNF microsatellite alleles may confer protection against the development of lipodystrophy syndrome in Brazilian HIV patients // *Int. J. Immunogenet.* — 2010. — Vol. 37, №5. — P. 379–385.
25. Tarr P.E., Telenti A. Toxicogenetics of antiretroviral therapy: genetic factors that contribute to metabolic complications // *Antivir. Ther.* — 2007. — Vol. 12, №7. — P. 999–1013.
26. Tozzi V. Pharmacogenetics of antiretrovirals // *Antiviral Res.* — 2010. — Vol. 85, №1. — P. 190–200.
27. Wang L., McLeod H.L. et al. Genomics and Drug Response // *N. Engl. J. Med.* — 2011. — Vol. 364. — P. 1144–1153.
28. Zanone P.B., Riva A., Nasi M. et al. Genetic polymorphisms differently influencing the emergence of atrophy and fat accumulation in HIV-related lipodystrophy // *AIDS*. — 2008. — Vol. 22, №14. — P. 1769–1778.

The influence of human genetic factors on HAART

Tumanov A.S.

The D.I. Ivanovsky Institute of Virology of The Ministry of Health of The Russian Federation; 123098, Russia, Moscow, Gamaleya str., 16; fax/phone: 8-499-1903063, e-mail: desep@mail.ru

The review discusses role of human genetic factors in efficiency and complications of highly active antiretrovirus therapy (HAART). Genetic polymorphism of cytochrom P450 and multidrug resistance systems (specifically, CYP2B6 and MDR1/MRP1/P-gp, respectively) affects intracellular concentration of numerous antiretroviral drugs (AD) that may explain differences in clinical efficacy of HAART. Genetic background might also impact in rate of miscellaneous complications in patients receiving HAART. Thus hypersensitivity to reverse transcriptase inhibitors has been shown to be dependent on the presence of TNF alpha cytokine gene variant 308A or some alleles of HLA class I (HLA-B*5701, *HLA-B*3505*, *HLA-B*14*, *HLA-Cw*4*, *HLA-Cw*8*) or class II (HLA-DRB1*0101) loci. Protection from lipodystrophia that represents serious complication of HAART depends on presence of particular alleles of polymorphic cytokine genes IL-1, IL-18 and TNF beta. Vice versa, susceptibility to enhanced triglyceride level following HAART is associated with polymorphic alleles of APOC3, *Arb2*, *Arb3*, *HFE*, *LPIN1* and *POLG* loci whereas increased risk of neuropathy is associated with genetic variants G516T and C983T of CYP2B6 gene. Various complications like hyperbilirubinemia, neutropenia and asthma were found to be associated with UGT1A1*28 that controls small lipophilic molecules, A1203A (rs11568695) of *MRP4* and *HLA-A*68*, respectively. Data clearly demonstrates the need in personalization through genetic profiling in HAART to increase its efficiency and decrease the rate of complications.

Key words: HIV-1, human genetic factors, Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART)

Частота встречаемости гамет с анеуплоидией у мужчин с нарушением репродуктивной функции и патозооспермией

Гордеева Е.Г., Сорокина Т.М., Шилейко Л.В., Остроумова Т.В.,
Борзова О.С., Магомедова Х.Д., Кузина Н.Ю., Баркова О.В., Курило Л.Ф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук.
Москва, 115478, ул. Москворечье, 1. Факс: +7(499)324-07-02; e-mail: gordeyevae@gmail.com

Методом двух- и трёхцветной FISH проведена оценка частоты анеуплоидии по хромосомам 13, 18, 21, X и Y в сперматозоидах у мужчин с астенотератозооспермией (АТ) и олигоастенотератозооспермией различной тяжести (ОАТ I—III). У большинства обследованных мужчин направлятельными диагнозами являлись бесплодие или привычное невынашивание беременности у супруги; в некоторых случаях в анамнезе было отмечено наличие хромосомной патологии у эмбриона/плода. Наши результаты свидетельствуют о том, что повышенная частота мейотического нерасхождения хромосом может сопровождаться умеренной или тяжёлой формой олигоастенотератозооспермии у мужчин с нарушением репродуктивной функции. В среднем среди пациентов с ОАТ I—III частота встречаемости сперматозоидов с дисомией по хромосомам 13, 18, 21, и с XX, XY или YY дисомией достигает 0,28, 0,13, 0,59, 0,1, 0,64 и 0,16% соответственно.

Ключевые слова: нерасхождение хромосом, анеуплоидия гамет, нарушения сперматогенеза

Введение

В ходе сперматогенеза у человека естественным образом происходит формирование числовых и структурных хромосомных аномалий (ХА). В своей работе с использованием метода FISH M. Guttenbach с соавторами показали, что у здоровых фертильных мужчин могут быть обнаружены гаметы с хромосомным дисбалансом [16]. По оценке С. Templado с соавторами, у здоровых фертильных мужчин в среднем частота встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией по хромосомам всего ряда в совокупности составляет 4,5% [31].

Частота встречаемости гамет с анеуплоидией по аутосомам и гоносомам может варьировать от 0,03 до 0,75% у здоровых фертильных мужчин с нормозооспермией [2]. Наиболее высокие значения частот встречаемости зрелых мужских половых клеток (ПК) с анеуплоидией характерны для дисомии по хромосоме 21 [28] и для вариантов дисомии по половым хромосомам [29, 30]. Прежде всего, это связано с особенностями структуры хромосом и наличием предрасположенности к мейотическому нерасхождению акроцентрических хромосом из групп D, G и половых X- и Y-хромосом.

У мужчин при патозооспермии в ходе сперматогенеза могут наблюдаться аномалии мейотического деления ПК, цитокинеза и анафазного расхождения хромосом в I и II мейозе. В ранних работах по исследованию закономерностей сперматогенеза у человека и у некоторых видов млекопитающих было отмечено, что аномальное течение мейотического деления ПК является одной из причин грубых нарушений в развитии гамет и причиной формирования сперматозоидов с атипичной морфологией [3]. К настоящему моменту найдены подтверждения предположения, что в ряде случаев развитие олиго-

зооспермии у пациентов с бесплодием обусловлено аномалиями мейотической рекомбинации, которые сопровождаются признаками частичного блока сперматогенеза на стадиях профазы I мейоза и повышенной частотой мейотического нерасхождения хромосом [25].

Среди мужчин с нарушениями сперматогенеза, тератозооспермией, олигозооспермией в сочетанной или изолированных формах частота встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией может значительно превосходить частоту встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией в группе здоровых фертильных мужчин с нормозооспермией [27]. В современных работах показано, что при некоторых формах патозооспермии частота встречаемости сперматозоидов с дисомией или с диплоидным хромосомным набором может достигать 1,5—62%, что предопределяет высокий риск по невынашиванию беременности или рождению ребёнка с хромосомной патологией [18].

Целью настоящей работы стала оценка частот встречаемости сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором и с анеуплоидией по хромосомам 13, 18, 21, X и Y у мужчин с различными формами патозооспермии.

Материалы и методы

Выборка пациентов

Мужчины, проходящие клиничко-лабораторное обследование с целью планирования деторождения или по поводу бесплодия в браке, составили группы обследуемых, всего 55 пациентов в возрасте от 25 до 54 лет (в среднем 36 ± 7 лет). Согласно принятому протоколу об-

следования мужчин с нарушением репродуктивной функции, проводили спермиологический анализ (СА) и анализ кариотипа [4]. У всех мужчин установлен нормальный мужской кариотип 46,XY, в одном случае выявлено наличие индуцированных ионизирующим излучением ХА (табл. 1).

Согласно заключению по СА, пациенты разделены на 2 группы:

- 1-я группа — мужчины (27 чел.) с олигоастенотератозооспермией различной тяжести (с лёгкой формой — ОАТ I, с умеренной формой — ОАТ II, и с тяжёлой формой — ОАТ III);

- 2-я группа — мужчины (28 чел.) с астенотератозооспермией (АТ).

Выбор пациентов для исследования происходил случайным образом, в связи с чем 2 группы составили муж-

чины с наиболее часто встречающимися сочетанными формами патозооспермии, с АТ и ОАТ. Выраженных форм тератозооспермии с преобладанием одного типа аномалий морфологии ПК или с мономорфной атипией ни в одном случае выявлено не было.

Из обратившихся мужчин с отягощённым акушерским анамнезом у супруги, со случаями ХА у эмбриона, плода или новорождённого условно выделена 3-я группа обследованных (8 чел.), данные анамнеза представлены в табл. 1. У 53 пациентов направительным диагнозом было ПНБ у супруги неясной этиологии, первичное или вторичное бесплодие (Б-I, Б-II). У двух пациентов в анамнезе их жён отмечен единственный случай спонтанного аборта на ранних сроках беременности. У шести пациентов из 2-й группы в анамнезе отмечены неудачные попытки ЭКО/ИКСИ.

Частота встречаемости сперматозоидов с дисомией по хромосомам 13, 18, 21, X и Y (%) у мужчин из 3-й группы

Таблица 1

№ п/п	Направительный диагноз пациента, заключение по СА, возраст и другие сведения	Данные репродуктивного анамнеза	Частота встречаемости ПК с дисомией по хромосомам, %						Диплоидные ПК, %
			13	18	21	XX	XY	YY	
1	ПНБ, АТ, 41 год	Две замершие беременности, кариотип плода — 69,XXX; 69,XXY, пара имеет общего здорового ребёнка	0,08	0,3	0,26	0,17	0,08	0,3	0,67
2	АТ, 30 лет, частичная делеция в субрегионе AZFc (del sY1192)	1 случай замершей беременности, рождение ребёнка с ХА, кариотип — 45,X[6]/49,YYYYY[19] (GTG-окрашивание) nuc ish (DXZ1x1, DYZ3x4)[97]/(DXZ1x1, DYZ3x3)[23]/(DXZ1x1, DYZ3x2)[12]/(DXZ1x1, DYZ3x1)[2]/(DXZ1x1)[36], частичная делеция в субрегионе AZFc (del sY1192) у пробанда и ребёнка	0,1	0,04	0	0,21	0,13	0,08	0,4
3	ПНБ, АТ, 42 года, наличие хромосомного варианта у супруги — 46,XX,9qh+	8 выкидышей, при последнем отмечена анэмбриония, кариотип плода — 46,XX	0,16	0,05	0,26	0,05	0,29	0,05	0,24
4	Б-I, АТ, 29 лет	Замершая беременность, кариотип плода — 47,XXX	0,22	0,04	0,17	0	0,11	0	0,12
5	Б-II, АТ, 41 год	Рождение ребёнка с синдромом Дауна, кариотип — 47,XX,+21	0,15	0,07	0,42	0	0,58	0,11	3,19
6	Б-II, АТ, 35 лет	Прерванная беременность, кариотип плода — 47,+21	0,11	0,12	0,68	0,25	0,04	0,08	0,17
7	Б-I, АТ, 41 год, В 1996 г. мужчина проходил курс химиотерапии и лучевой терапии по поводу лимфогранулематоза. У мужчины обнаружены аберрации хромосом, кариотип — 46,XY,6%, частота разрывов хроматид — 0,12 на 1 клетку (6 ХА, 2 одиночных фрагмента, 2 парных фрагмента, транслокация 44,XY,t(14;?),-16,-20, дупликация 18 — 46,XY,dup18(q21;q23))	3 безуспешные попытки проведения ЭКО, при ПГД в последнем цикле ЭКО у трёх эмбрионов обнаружены ХА: 1-й эмбрион — тетрасомия 13, трисомия ХХУ; 2-й эмбрион — трисомия 13, трисомия ХХУ; 3-й эмбрион — трисомия 13, трисомия 21	0,07	0,06	0,33	0,06	0,09	0	0,24
8	ПНБ, АТ, 46 лет	1-й эмбрион — трисомия 18; 2-й эмбрион — трисомия 16	0,24	0,06	0,34	0,03	0,11	0,08	0,15

В задачи настоящей работы не входило выяснение причин развития патозооспермии у пациентов, но отметим, что и в 1-й, и 2-й группах в трёх случаях выявлены делеции в субрегионах AZF локуса Y-хромосомы.

В качестве контрольной группы обследовано 11 мужчин — доноров спермы в возрасте 25—45 лет. Референсные значения частот встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией для здоровых мужчин с нормозооспермией и нормальным кариотипом 46,XY получены ранее [2].

Методы исследования

Препараты сперматозоидов получали сразу после спермиологического анализа, который выполняли по стандартной методике (WHO, 1999) [34]. Образцы эякулята после инкубации 30 мин при 37°C, после центрифугирования 280 g 10 мин отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.2). Осадок ресуспендировали и фиксировали стандартным способом с тремя сменами фиксатора. Пробу раскапывали на охлаждённые предметные стекла. Деконденсацию хроматина головки сперматозоидов проводили при инкубации препарата 2—5 мин в растворе дитиотреитола (5 mM DTT, pH 8.0).

Для каждого пациента проводили анализ по пяти хромосомам методом двух- и трёхцветной FISH. Для двухцветной FISH использовали смесь локуспецифичных ДНК-зондов на хромосомы 13 и 21: LSI 13, локус гена ретинобластомы RB-1, 13q14, Spectrum Green, LSI 21, локусы D21S259, D21S341, D21S342, 21q22.13-q22.2, Spectrum Orange. Трёхцветную FISH проводили со смесью ДНК-зондов, специфичных к α -сателлитным последовательностям центромерного и прицентромерного гетерохроматина хромосом 18, X и Y: CEP 18, локус D18Z1, 18p11.1-q11.1, Spectrum Aqua, CEP X, локус DXZ1, Xp11.1-q11.1, Spectrum Green, CEP Y, локус DYZ3, Yp11.1-q11.1, Spectrum Orange. Денатурацию, гибридизацию и постгибридизационную отмывку препаратов проводили по протоколу фирмы-производителя (Abbott Molecular Vysis Inc., U.S.A).

Анализ сигналов выполняли на флуоресцентном микроскопе Zeiss Axio Imager.A2 (Carl Zeiss, Jena, Germany), оснащённом набором фильтров для детекции флуоресценции красителей DAPI, AQUA, FITC, Spectrum Orange. Применяли критерии цитогенетического анализа ПК, разработанные Williams с соавторами [39]. Диплоидными считали клетки с двумя сигналами на каждую гомологичную хромосому, т.е. ПК считали диплоидными при наборе сигналов 13-13-21-21 или 18-18-X-X, 18-18-X-Y и 18-18-Y-Y. В ходе работы были обнаружены сперматозоиды, имеющие тетраплоидные и триплоидные хромосомные наборы, которые в анализе данных не учтены.

На каждом препарате анализировали не менее 2000 сперматозоидов. Репрезентативность выборки определена нами, согласно статистическому обоснованию величины выборки при исследовании редких собы-

тий, предложенному Н.А. Плохинским [5]. При концентрации сперматозоидов менее 1 млн/мл анализировали все обнаруженные на препарате зрелые ПК, 100—2000 или более ПК. При анализе данных частоты нуллисомий не учитывали.

Статистический анализ проводили с использованием критерия Пирсона для проверки гипотезы о связи двух переменных и критерия Манна—Уитни для сравнения частот анеуплоидий в программе БИОСТАТ [1]. Значение $p < 0,01$ выбрано как статистически значимое.

Результаты

В ходе работы проанализировано 270 894 сперматозоида. Средние по группам значения частот сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором, с дисомией по хромосомам 13 и 21 представлены в табл. 2. Частоты сперматозоидов с дисомией по хромосомам 13 и 21 в 1-й группе имеют статистически значимые отличия от референсных значений ($p < 0,01$). Частоты сперматозоидов с дисомией по хромосомам 13 и 21 во 2-й группе не имеют статистически значимых отличий от референсных значений ($p = 0,14$, $p = 0,25$). Частоты сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором в 1-й и 2-й группе не имеют статистически значимых отличий от референсных значений ($p = 0,02$, $p = 0,98$).

Средние по группам значения частот сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором, с дисомией по хромосоме 18, а также с XX-, XY- или YY-дисомией представлены в табл. 3. Частоты сперматозоидов с дисомией по хромосоме 18 в 1-й группе имеют статистически значимые отличия от референсных значений ($p < 0,01$). Частоты сперматозоидов с дисомией по хромосоме 18 во 2-й группе не имеют статистически значимых отличий от референсных значений ($p = 0,03$). Частоты сперматозоидов с XX- и XY-дисомией в 1-й группе имеют статистически значимые отличия от референсных значений ($p < 0,01$). Частоты сперматозоидов с YY-дисомией в 1-й группе не имеют статистически значимых отличий от референсных значений ($p = 0,02$). Частоты сперматозоидов с XX-, XY- или YY-дисомией во 2-й группе не имеют статистически значимых отличий от референсных значений ($p = 0,55$, $p = 0,06$, $p = 0,3$). Частоты сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором в 1-й группе имеют статистически значимые отличия от референсных значений ($p < 0,01$). Частоты сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором во 2-й группе не имеют статистически значимых отличий от референсных значений ($p = 0,34$). Распределение X- и Y-несущих сперматозоидов в 1-й, 2-й и контрольной группах соответствовало ожидаемому соотношению 1:1.

Мы наблюдали различия по частоте встречаемости ПК с дисомией по тем или иным хромосомам во всех группах пациентов. Так, частоты сперматозоидов с дисомией по X- и Y-хромосомам суммарно (XX+XY+YY-дисомия) в 1-й, 2-й и в контрольной

группах имеют статистически значимые отличия от значений частот дисомии по хромосоме 18 ($p<0,01$) (табл. 3). Частоты сперматозоидов с дисомией по хромосоме 21 в 1-й, 2-й и контрольной группах имеют статистически значимые отличия от значений частот дисомии по хромосоме 13 ($p<0,01$) (табл. 2).

Отметим также, что в 1-й и 2-й группах среди пациентов мы наблюдали широкий разброс значений (R) частот сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором и с анеуплоидией по каждой из хромосом 13, 21, X или Y (табл. 2, 3).

Для 3-й группы нами представлены индивидуальные значения частот встречаемости сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором и с дисомией по хромосомам 13, 18, 21, X и Y (табл. 1).

Обсуждение

Частота встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией при различных формах патозооспермии

Согласно полученным результатам, в среднем частота встречаемости сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором и с анеуплоидией по хромосомам 13, 18, 21, X и Y среди мужчин с нарушением репродуктивной функции и патозооспермией превосходит частоту встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией среди фертильных мужчин с нормозооспермией и нормальным мужским кариотипом 46,XY. В зависимости от сте-

пени нарушения сперматогенеза или формы патозооспермии частота встречаемости анеуплоидных гамет может превосходить референсные значения в 1,5–3 раза или более. Наши результаты согласуются с результатами большинства работ по исследованию хромосомного набора гамет с использованием мультицветной FISH у мужчин с бесплодием [27, 30]. Например, в работе Ch. Ushijima с соавторами представлены результаты по анализу частот встречаемости сперматозоидов с дисомией 13, 18, 21, XX, YY, XY у восьми мужчин с бесплодием и ОАТ I–II. В этой работе для каждого пациента на препарате анализировали не менее 5000 ПК [32]. В нашей работе и работе Ch. Ushijima с соавторами использованы ДНК-зонды одного производителя. Частоты вариантов дисомии в обследуемой и контрольной группах составили 0,13 и 0,09%, 0,12 и 0,13%, 0,24 и 0,19%, 0,16 и 0,12%, 0,21 и 0,12%, 0,23 и 0,14% соответственно. Средняя частота встречаемости сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором в группе мужчин с ОАТ I–II составила 0,29%, а в контрольной группе — 0,16%. В нашей работе в группе мужчин с ОАТ I–III приблизительно в 2 раза частоты встречаемости дисомии по хромосомам 13, 21 и XY дисомии превосходят значения, полученные Ch. Ushijima (табл. 2, 3). Мы полагаем, что это может быть связано с различиями в требованиях, предъявляемых к здоровью мужчин, участвующих в исследовании, или с принятыми в работе критериями цитогенетического анализа ПК.

Таблица 2

Средняя по группам частота встречаемости сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором и с анеуплоидией по хромосомам 13 и 21 (%) у мужчин с нормозооспермией, АТ и ОАТ I–III

	Хромосома 13		Хромосома 21		Диплоидные клетки
	Нуллисомия	Дисомия	Нуллисомия	Дисомия	
Группа контроля: нормозооспермия (11 пациентов)					
m±SE	0,13±0,03	0,11±0,04	0,22±0,07	0,20±0,08	0,40±0,18
R	0,09—0,21	0,07—0,21	0,09—0,33	0,1—0,38	0,17—0,72
Группа 1: олигоастенотератозооспермия различной тяжести (27 пациентов)					
m±SE	0,44±0,37	0,28±0,20*	0,70±0,74	0,59±0,50*	0,79±0,54
R	0,03—1,78	0—0,77	0,13—4,09	0,07—1,96	0,19—2,03
Тяжёлая форма олигоастенотератозооспермии (5 пациентов)					
m±SE	0,89±0,53	0,54±0,21*	1,42±1,53	1,38±0,66*	1,07±0,66*
R	0,41—1,78	0,21—0,77	0,14—4,09	0,38—1,96	0,45—1,94
Умеренная форма олигоастенотератозооспермии (14 пациентов)					
m±SE	0,41±0,24	0,28±0,15*	0,58±0,33	0,48±0,19*	0,80±0,55*
R	0,09—0,87	0,09—0,68	0,13—1,19	0,29—0,83	0,36—2,03
Лёгкая форма олигоастенотератозооспермии (8 пациентов)					
m±SE	0,20±0,17	0,11±0,08	0,45±0,18	0,30±0,22	0,39±0,18
R	0,03—0,57	0—0,25	0,23—0,67	0,07—0,77	0,19—0,64
Группа 2: астенотератозооспермия (29 пациентов)					
m±SE	0,27±0,18	0,16±0,10	0,37±0,29	0,32±0,25	0,57±0,65
R	0—0,77	0—0,48	0,12—1,59	0—1	0—3,18
Примечание. * — статистически значимые отличия (p<0,01); R — разброс значений					

Большинство исследователей придерживалось строгих критериев, разработанных В.В. Williams с соавторами [33]. Однако, несмотря на их соблюдение, при общей тенденции к увеличению доли ПК с хромосомным дисбалансом при патозооспермии наблюдался широкий разброс значений частот сперматозоидов с анеуплоидией у различных авторов как при АТ и ОАТ, так и при нормозооспермии [2]. В некоторых работах с использованием строгих критериев Williams при статистическом анализе результатов FISH получено свидетельство отсутствия связи между изменением уровня анеуплоидий в сперматозоидах и ухудшениями показателей СА [17].

Повышение в 2—3 раза частоты встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией наблюдали при изолированных и сочетанных формах тератозооспермии со специфическими мономорфными атипиями [18]. Высокий уровень анеуплоидных и/или полиплоидных гамет наблюдали при следующих патологических фенотипах сперматозоидов:

- в некоторых случаях при синдроме округлых головок, при глобулозооспермии [11, 19, 21];
- при большом количестве удлинённых головок сперматозоидов (в 30—100% зрелых ПК) среди эякулированных клеток сперматогенного ряда в сочетании с изолированной тератозооспермией у пациентов [7, 24];

- при большом количестве макроголовок (в 19—64% зрелых ПК), при сочетанной или изолированной тератозооспермии [6, 8, 14, 37].

Согласно проведённым нами наблюдениям, частота встречаемости сперматозоидов с вариантами анеуплоидии по хромосомам 13, 18, 21, X и Y выше в несколько раз у пациентов с тяжёлыми формами нарушения сперматогенеза при концентрации сперматозоидов ниже 10 млн/мл (ОАТ II—III).

Важно отметить, что у мужчин с ОАТ II—III частота встречаемости гамет с дисомией XY, дисомией по хромосоме 21 и частота встречаемости ПК с диплоидным хромосомным набором в среднем в 2 или 3 раза выше, чем среди здоровых мужчин (табл. 1, 2). Это подтверждает наличие предрасположенности к мейотическому нерасхождению хромосом 21, X- и Y-хромосом, а также указывает на то, что при ОАТ II—III высокая частота мейотического нерасхождения хромосом может быть обусловлена аномалиями внутритестикулярного микроокружения сперматогенных клеток, которые зачастую могут быть обнаружены при тяжёлых формах патозооспермии [22].

В ходе работы мы также отметили, что нередко у мужчин при ОАТ II—III высокий уровень анеуплоидии по половым хромосомам, хромосоме 21 и высокий уро-

Таблица 3

Средняя по группам частота встречаемости сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором и с анеуплоидией по хромосомам 18, X, Y (%) у мужчин с нормозооспермией, АТ и ОАТ I—III

	Хромосома 18		Половые хромосомы				X-несущие ПК	Y-несущие ПК	Дипло- идные клетки
	Нулли- сомия	Дисомия	Нулли- сомия	Дисомия					
				XX	XY	YY			
Группа контроля: нормозооспермия (11 пациентов)									
m±SE	0,09±0,01	0,05±0,02	0,29±0,08	0,04±0,02	0,17±0,11	0,06±0,02	50,07±0,58	49,17±0,50	0,34±0,21
R	0,06—0,11	0,02—0,09	0,17—0,45	0—0,07	0,05—0,47	0,02—0,09	49,34—51,34	48,57—49,99	0,06—0,76
Группа 1: олигоастенотератозооспермия различной тяжести (27 пациентов)									
m±SE	0,27±0,28	0,13±0,10*	1,15±1,27	0,1±0,07*	0,64±0,63*	0,16±0,14	48,65±4,29	48,29±4,95	0,83±0,62*
R	0,03—1,33	0,04—0,41	0,18—6,96	0—0,33	0,04—3,07	0,03—0,52	42,02—64,70	35,18—56,63	0,14—2,79
Тяжёлая форма олигоастенотератозооспермии (5 пациентов)									
m±SE	0,48±0,54	0,18±0,14*	2,39±2,59	0,15±0,13*	1,20±1,12*	0,29±0,15*	50,19±8,29	44,10±8,12	0,86±0,62*
R	0,04—1,33	0,08—0,41	0,50—6,96	0—0,33	0,10—3,07	0,17—0,51	45,24—64,70	35,18—50,84	0,41—1,94
Умеренная форма олигоастенотератозооспермии (14 пациентов)									
m±SE	0,22±0,18	0,16±0,10*	1,02±0,60	0,12±0,04*	0,64±0,44*	0,14±0,09	49,05±2,76	47,84±3,06	1,05±0,67*
R	0,03—0,75	0,04—0,42	0,26—2,54	0,05—0,19	0,04—1,74	0—0,29	43,66—52,87	40,77—52,48	0,14—2,75
Лёгкая форма олигоастенотератозооспермии (8 пациентов)									
m±SE	0,15±0,08	0,07±0,06	0,60±0,28	0,04±0,05	0,30±0,23	0,11±0,17	46,99±3,13	51,68±3,15	0,42±0,23
R	0,03—0,25	0—0,20	0,18—0,94	0—0,16	0,09—0,85	0—0,52	42,02—51,06	46,93—56,63	0,19—0,80
Группа 2: астенотератозооспермия (29 пациентов)									
m±SE	0,22±0,17	0,11±0,09	0,50±0,22	0,07±0,06	0,31±0,25	0,09±0,08	48,77±2,46	49,55±2,52	0,64±0,80
R	0—0,70	0—0,40	0,21—1,11	0—0,21	0,04—1,05	0—0,30	43,24—52,56	46,51—55,57	0,09—3,28
Примечание. * — статистически значимые отличия (p<0,01); R — разброс значений									

вень сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором находились в сочетании между собой.

Согласно нашим результатам, частота ХУ-дисомии при ОАТ III в среднем составляет $1,20 \pm 1,12\%$. У B.G. Younes с соавторами получены схожие результаты: среди мужчин с ОАТ I—III частота встречаемости дисомии по половым хромосомам варьирует от 0,90 до 12,87% [36]. Поэтому, по мнению специалистов, мужчин с тяжёлой формой ОАТ и/или мужчин-кандидатов на проведение процедур ЭКО/ИКСИ можно считать принадлежащими к группе риска по передаче потомству дополнительного хромосомного материала или сверхчисленных хромосом.

Частота встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией у мужчин с хромосомной патологией у потомства

Несмотря на общепризнанный факт, что в большинстве случаев трисомии по аутосомам (~90%) дополнительная хромосома имеет материнское происхождение, нельзя не признать наличие вклада анеуплоидии мужских гамет в структуру причин хромосомной патологии эмбриона/плода. Одна из наиболее часто встречающихся трисомий (1:600 новорождённых) — трисомия по хромосоме 21 (синдром Дауна) — в 5—10% случаев является результатом мейотического нерасхождения хромосом в гаметогенезе у мужчин [35]. Свидетельства наличия отцовского вклада в происхождение трисомии по хромосоме 21 получены в работе J. Blanco с соавторами [9]. У двух мужчин — отцов детей с синдромом Дауна — кариотип — 47,+21pat, частота встречаемости сперматозоидов с дисомией по хромосоме 21 составила 0,75% и 0,78%. В последнем случае повышенная частота дисомии по хромосоме 21 сопровождалась повышенной частотой дисомии по половым хромосомам — 0,69% и повышенной частотой встречаемости диплоидного хромосомного набора — 1,13%.

В нашей работе в ходе выполнения FISH-анализа частот встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией у мужчин с хромосомной патологией у потомства выявлено двое мужчин с повышенными частотами сперматозоидов с некоторыми вариантами ХА (табл. 1). У мужчины — с отметкой в анамнезе у супруги о беременности плодом с кариотипом 47,+21 — частота дисомии по хромосоме 21 составила 0,68%, тогда как частоты дисомии по 13, 18, X- и Y-хромосомам не превышали референсных значений. У пациента — отца ребёнка с синдромом Дауна — мы наблюдали повышенные частоты встречаемости сперматозоидов с дисомией по хромосоме 21 — 0,42%, с ХУ-дисомией — 0,58% и с диплоидным хромосомным набором — 3,19%.

Заключение

С развитием и внедрением в медицинскую практику методов ВРТ проблема зачатия и рождения здорового ребёнка становится решаемой для многих супружеских пар с бесплодием. Однако использование при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО) спермы мужчин с умеренной или тяжёлой формой олигозооспермии (ОАТ II—III) и при некоторых других формах нарушения спер-

матогенеза может быть сопряжено с генетическим риском, в том числе с риском рождения ребёнка с ХА [15]. Предположения о наличии высокого риска передачи потомству ХА при ЭКО и использовании спермы мужчин с большой долей сперматозоидов с хромосомным дисбалансом являются вполне обоснованными, поскольку при проведении процедур ВРТ естественного отбора сперматозоидов не происходит [13]. Более того, в научной литературе представлены сообщения, свидетельствующие о повышенной частоте встречаемости сперматозоидов с хромосомным набором 24,XY (1,39%) в сперме у мужчин в случаях рождения детей с анеуплоидией по половым хромосомам после проведения ЭКО/ИКСИ [20]. Высокая частота мейотического нерасхождения хромосом у мужчин с патозооспермией, по мнению некоторых специалистов, также негативно влияет на способность сперматозоидов к оплодотворению и на эффективность имплантации blastocysts [23, 26].

FISH-анализ частот встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией может быть рекомендован для мужчин с выраженной формой тератозооспермии, например с глобулозооспермией, и тяжёлыми формами олигозооспермии, а также для мужчин-кандидатов на проведение процедур ЭКО/ИКСИ как метод, позволяющий провести оценку вероятности формирования при оплодотворении *in vitro* зиготы со специфическим хромосомным дисбалансом [12]. Он может быть рекомендован также в случаях привычного невынашивания беременности у супруги при повторных неудачных попытках проведения ЭКО/ИКСИ [10].

Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 1998. — С. 459.
2. Гордеева Е.Г., Шилейко Л.В., Панкратова О.С., Курило Л.Ф. Частота анеуплоидий в гаметах у фертильных мужчин // Генетика. — 2011. — Т. 47, №5. — С. 1—7.
3. Данилова Л.В. Полиморфизм сперматозоидов и атипичный сперматогенез // Сперматогенез и его регуляция / Данилова Л.В. (ред.), Габер Е.С., Данилова Л.В., Князева Е.Ф., Костомарова А.А., Наук В.А., Петросьян Ж.Л., Райцина С.С., Ротт Н.Н. (авт.). — М.: Наука, 1983. — С. 98—140.
4. Курило Л.Ф. Схема комплексного медико-генетического обследования пациентов с мужским бесплодием неясного генеза // Тез. докл. рос. научно-практ. конф. «Медико-генетическое консультирование в профилактике наследственных болезней», МЗ РФ, МНОМТ, МГНЦ РАМН, Москва, XI/1997. — С. 154—155.
5. Плохинский Н.А. (ред.) Биометрические методы. — М.: МГУ, 1975. — С. 90—91.
6. Achard V., Paulmyer-Lacroix O., Mercier G. et al. Reproductive failure in patients with various percentages of macronuclear spermatozoa: high level of aneuploid and polyploid spermatozoa // J. Androl. — 2007. — Vol. 28, №4. — P. 600—606.
7. Benzacken B., Gavelle F.M., Martin-Pont B. et al. Familial sperm polyploidy induced by genetic spermatogenesis failure: case report // Hum. Reprod. — 2001. — Vol. 16. — P. 2646—2651.
8. Bernardini L., Borini A., Preti S. et al. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men // Hum. Reprod. — 1998. — Vol. 13, №12. — P. 3406—3413.

9. Blanco J., Gabau E., Gomes D. et al. Chromosome 21 disomy in spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with a high prevalence of Down Syndrome: increased incidence in cases of paternal origin // *Am. J. Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 63. — P. 1067–1072.
10. Calogero A.E., Burrello N., De Palma A. et al. Sperm aneuploidy in infertile men // *Reprod. Biomed. Online.* — 2003. — Vol. 6, №3. — P. 310–317.
11. Carrell D.T., Emery B.R., Liu L. Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection // *Fertil. Steril.* — 1999. — Vol. 71. — P. 511–516.
12. Carrell D. The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises // *J. Androl.* — 2007. — P. 1–32.
13. Chandley A.C., Hargreave T.B. Genetic anomaly and ICSI // *Hum. Reprod.* — 1996. — Vol. 11. — P. 930–932.
14. Devillard F., Metzler-Guillemain C., Pelletier R. et al. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases // *Hum. Reprod.* — 2002. — Vol. 17. — P. 1292–1298.
15. Devroey P., Van Steirteghem A. A review of ten years experience of ICSI // *Hum. Reprod. Update.* — 2004. — Vol. 10. — P. 19–28.
16. Guttenbach M., Schakowski R., Schmid M. Incidence of chromosome 3, 7, 10, 11, 17 and X disomy in mature human sperm nuclei as determined by nonradioactive in situ hybridization // *Hum. Genet.* — 1994. — Vol. 1. — P. 7–12.
17. Guttenbach M., Martinez-Exposito M.-J., Michelmann H.W. et al. Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men // *Hum. Reprod.* — 1997. — Vol. 12, №3. — P. 468–473.
18. Machev N., Gosset P., Viville S. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia // *Cytogenet. Genome Res.* — 2005. — Vol. 111. — P. 352–357.
19. Martin R.H., Greene C., Rademaker A.W. Sperm chromosome aneuploidy analysis in a man with globozoospermia // *Fertil. Steril.* — 2003b. — Vol. 79. — P. 1662–1664.
20. Moosani N., Chernos J., Lowry R.B. et al. A 47,XXY fetus resulting from ICSI in a man with an elevated frequency of 24,XY spermatozoa // *Hum. Reprod.* — 1999. — Vol. 14, №4. — P. 1137–1138.
21. Morel F., Douet-Guilbert N., Moerman A. et al. Chromosome aneuploidy in the spermatozoa of two men with globozoospermia // *Mol. Hum. Reprod.* — 2004. — Vol. 10, №11. — P. 835–838.
22. Mroz K., Hassold T.J., Hunt P.A. Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors // *Hum. Reprod.* — 1998. — Vol. 14. — P. 1151–1156.
23. Nicopoullos J.D., Gilling-Smith C., Almeida P.A. et al. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? // *Hum. Reprod.* — 2008. — Vol. 23. — P. 240–250.
24. Prisant N., Escalier D., Soufir J.-C. et al. Ultrastructural nuclear defects and increased chromosome aneuploidies in spermatozoa with elongated heads // *Hum. Reprod.* — 2007. — Vol. 22, №4. — P. 1052–1059.
25. Rives N., Saint-Clair A., Mazurier S., Sibert L., Simeon N., Joly G., Mace B. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males // *Hum. Genet.* — 1999. — Vol. 105, №3. — P. 266–272.
26. Rubio C., Gil-Salom M., Simon C. et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome // *Hum. Reprod.* — 2001. — Vol. 16. — P. 2084–2092.
27. Sarrate Z., Vidal F., Blanco J. Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance // *Fertil. Steril.* — 2010. — Vol. 93, №6. — P. 1892–1902.
28. Soares S.R., Templado C., Blanco J. et al. Numerical chromosome abnormalities in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 of paternal origin: generalized tendency to meiotic non-disjunction // *Hum. Genet.* — 2001a. — Vol. 108. — P. 134–139.
29. Spriggs E.L., Rademaker A.W., Martin R.H. Aneuploidy in human sperm: results of two- and three-color fluorescence in situ hybridization using centromeric probes for chromosomes, 1, 12, 15, 18, X and Y // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1995. — Vol. 71. — P. 47–53.
30. Spriggs E.L., Rademaker A.W., Martin R.H. Aneuploidy in human sperm: the use of multicolor FISH to test various theories of nondisjunction // *Am. J. Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 58. — P. 356–362.
31. Templado C., Vidal F., Estop A. Aneuploidy in human spermatozoa // *Cytogenet. Genome Res.* — 2011. — Vol. 133. — P. 91–99.
32. Ushijima Ch., Kumasako Y., Kihale P.E. et al. Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridization // *Hum. Reprod.* — 2000. — Vol. 15, №5. — P. 1107–1111.
33. Williams B.J., Ballenger C.A., Malter H.E. Non-disjunction in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes // *Hum. Mol. Genet.* — 1993. — Vol. 2. — P. 1929–1936.
34. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. — Cambridge: Cambr. Univ. Press, 1999. — 143 p.
35. Yoon P.W., Freeman S.B., Sherman S.L. et al. Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of the chromosomal error: a population based study // *Am. J. Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 58. — P. 628–633.
36. Younes B.G., Hazzouri K.M., Chaaban M.J. et al. High frequency of sex chromosomal disomy in spermatozoa of Lebanese infertile men // *J. Androl.* — 2011. — Vol. 32, №5. — P. 518–523.
37. Yurov Y.B., Saias M.J., Vorsanova S.G. et al. Rapid chromosomal analysis of germ-line cells by FISH: an investigation of an infertile male with large-headed spermatozoa // *Mol. Hum. Reprod.* — 1996. — Vol. 2. — P. 665–668.

The frequency of aneuploidy in sperm of infertile men with pathozoospermia

Gordeeva E.G., Sorokina T.M., Shileiko L.V., Ostroumova T.V., Borzova O.S., Magomedova H.D., Kuzina N.Y., Barkova O.V., Kurilo L.F.

Research Center for Medical Genetics of Russian Academy of Medical Sciences (RAMS), Russian Federation, Moscow, 115478, Moskvorechie, 1; fax: +7(495)324-07-02; e-mail: gordeyevae@gmail.com

FISH-analysis of sperm aneuploidy for chromosomes 13, 18, 21, X and Y was carried out for men with asthenoteratozoospermia and for men with various severity of oligoasthenoteratozoospermia. Among the majority of examined men and their wives infertility or habitual noncarrying of pregnancy were directional diagnoses. It was shown that high frequency of meiotic non-disjunction of chromosomes is attended to mild and moderate oligoasthenoteratozoospermia among men with infertility. The mean frequencies of spermatozoa with disomy for chromosomes 13, 18, 21, and XX, XY, YY disomy among patients with OAT I-III were 0,28%, 0,13%, 0,59%, 0,1%, 0,64% and 0,16%, respectively.

Key words: chromosome non-disjunction, gamete aneuploidy, spermatogenic disturbances

Полиморфизм *C677T* гена *MTHFR* и риск формирования несиндромальных орофациальных расщелин*

Мещерякова Т.И.¹, Маркова С.И.¹, Жилина С.С.¹, Гончаков Г.В.¹,
Гончакова С.Г.¹, Абрамов А.А.¹, Петрин А.Н.^{1,2}, Мутовин Г.Р.¹

¹ — Научно-практический центр медицинской помощи детям с врождёнными пороками развития челюстно-лицевой области и врождёнными заболеваниями нервной системы Департамента здравоохранения г.Москвы, 119620, Москва, ул. Авиаторов, д.38, факс (499) 730-98-27. E-mail: Ivanovna-76@mail.ru

² — ГБОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздравсоцразвития России, 127473, Москва, ул. Делегатская, д.20, стр. 1

В настоящее время имеются противоречивые данные относительно роли полиморфизма гена метилентетрагидрофолат-редуктазы (*MTHFR*) в формировании риска рождения детей с расщелинами губы и/или нёба (РГН). Представлены данные анализа полиморфизма *C677T* гена *MTHFR* у 102 детей с несиндромальными РГН.

Ключевые слова: врождённые расщелины губы и/или нёба, полиморфизм, метилентетрагидрофолатредуктаза (*MTHFR*)

Введение

Врождённые расщелины губы и/или нёба (ВРГН) относятся к самым распространённым врождённым дефектам у детей. Средняя частота несиндромальных ВРГН составляет от 0,41 до 1,2 случаев на 1000 новорождённых по субъектам РФ и существенно не отличается от данных регистра EUROCAT (0,39—1,39) [1].

В большинстве случаев ВРГН являются мультифакторальными заболеваниями с разным соотношением доли генетических и внешнесредовых факторов. Доказано негативное влияние во время беременности физических, химических факторов, неполноценного и несбалансированного питания, гормональных нарушений, ядов, ряда лекарственных веществ и биологических агентов (вирусы, бактерии и их токсины, простейшие) и др. В последние годы большое внимание уделяют анализу полиморфных вариантов ряда генов как факторов генетической предрасположенности в развитии данной патологии. В разных популяциях получены достоверные ассоциации полиморфизма генов: *IRF6*, *MDR1*, *MTHFR*, *ADH1A*, *ADH1B*, *ADH1C*, *MSX1*, *NAT2A*, *CYP1A1*, *PVRL1* — с риском развития ВРГН [11, 13, 14]. Однако для популяций, проживающих на территории России, эти данные получены на относительно небольших выборках пациентов и подчас носят противоречивый характер [2]. В частности, до сих пор неясно, действительно ли полиморфизм *C677T* в гене *5,10 MTHFR* может ассоциироваться с повышенным риском рождения детей с ВРГН.

Известно, что фермент *MTHFR* играет важную роль в метаболизме фолиевой кислоты. Ген, кодирующий этот фермент (локализован в 1p36.3), состоит из 2200 пар нуклеотидов и содержит 11 экзонов. Полимор-

физм гена *C677T* характеризуется заменой аланина на валин, что сопряжено со снижением активности фермента *MTHFR* и приводит к развитию умеренной гипергомоцистеинемии [8, 9].

Производные фолиевой кислоты и продукты метаболизма фолатов принимают участие в процессах эмбриогенеза и могут нарушать метилирование ДНК и вызывать геномную нестабильность [7, 16]. Известно, что около половины населения в мире являются гетерозиготными носителями полиморфизма *C677T* гена *MTHFR* [6]. Частота гомозигот *677TT* заметно варьирует в разных этнических группах и колеблется от 1% (среди чернокожих Африканского континента и Америки) до 20—35% (среди жителей Италии, Испании и Мексики) [10]. В разных регионах Российской Федерации вариативность частот гомозигот *677TT* находится в пределах 4,6—13% [3].

Целью данной работы было изучение влияния полиморфизма *C677T* гена *MTHFR* на риск возникновения несиндромальных ВРГН.

Объект и методы исследования

Проведено исследование 102 детей с несиндромальными расщелинами губы и/или нёба и их матерей. Группа контроля состояла из 57 здоровых детей и их матерей. Во всех случаях при заборе биологического материала получено письменное информированное согласие на исследование. ДНК для анализа выделена из слюны стандартным методом. Анализ проведён методом аллельспецифической ПЦР с последующим электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле с подтверждением изменений двухсторонним секвенированием на анализаторе ABI Prism 3130 xl (AppliedBioSystems).

* Работа выполнена при финансировании гранта 8/3-656н-9 от 31.12.2009 года, а также при частичном финансировании гранта РФФИ №12-04-00122.

Частота аллелей и гаплотипов полиморфизма *C677T* гена *MTHFR* в исследуемых группах

Группа	Количество человек (хромосом)	Гаплотип			Аллель	
		СС (норма)	СТ	ТТ	С	Т
Дети с ВРГН	102 (204)	42 (41%)	48 (47%)	12 (12%)	132 (64,7%)	72 (35,3%)
Матери детей с ВРГН	101 (202)	39 (39%)	53 (52%)	9 (9%)	131 (64,8%)	71 (35,2%)
Здоровые дети	57 (114)	23 (41%)	27 (47%)	7 (12%)	73 (64,0%)	41 (36,0%)
Матери здоровых детей	57 (114)	15 (26%)	36 (63%)	6 (11%)	66 (57,9%)	48 (42,1%)

Также были проведены исследования данного полиморфизма методом Real Time PCR с использованием набора AppliedBioSystems для определения полиморфизма *C677T* гена *MTHFR*.

Анализ гаплотипов исследуемого полиморфизма показал соответствие распределению Харди—Вайнберга ожидаемых и наблюдаемых частот аллелей и генотипов.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования полиморфизма *C677T* гена *MTHFR* представлены в таблице.

Для оценки взаимосвязи аллелей *T* и *C* с ВРГН проведено сравнение частот в двух группах: детей (здоровых и больных), а также среди матерей детей с ВРГН и матерей здоровых детей. Сравнительный анализ не выявил достоверных различий ни в первой ($\chi^2=0,02$; $p\leq 0,05$), ни во второй группах ($\chi^2=1,95$; $p\leq 0,05$). Таким образом, полученные нами результаты исследования полиморфизма *C677T* гена *MTHFR* не выявили ассоциации между аллелем *T* и развитием несиндромальных расщелин губы и/или нёба. Аналогичные результаты были получены при обследовании популяций Венесуэлы, Китая и США [5, 15, 18]. В то же время исследования некоторых популяций Индии показали, что гомозиготные носители полиморфизма *677TT* гена *MTHFR* имеют повышенный риск развития ВРГН у потомства, а гетерозиготы *C677T*, напротив, имеют незначительный риск по данной патологии [4]. Эти же авторы в своём исследовании отметили, что определённые комбинации гаплотипов *820GG* гена *IRF6* и *C677T* гена *MTHFR* значительно увеличивают риск рождения детей с ВРГН [4]. В Норвегии у детей, матери которых были носителями полиморфизма *C677T* гена *MTHFR*, отмечен низкий риск формирования ВРГН [12]. В Нидерландах изучалось взаимодействие полиморфизма *C677T* гена *MTHFR* с использованием фолиевой кислоты женщинами на ранних сроках беременности. Данное исследование показало, что в группе матерей, не принимавших препараты фолиевой кислоты во время беременности и имеющих гаплотип *677TT* или *1298CC* гена *MTHFR*, риск появления потомства с ВРГН увеличивался [17].

Таким образом, наше исследование позволило установить частоту полиморфизма *C677T* гена *MTHFR* в группе детей с ВРГН и их матерей. Полученные нами результаты не подтверждают влияния полиморфизма

C677T гена *MTHFR* на повышение риска формирования несиндромальных ВРГН.

В дальнейшем представляет интерес включить в исследование наиболее значимые точковые мутации других генов фолатного цикла, а также увеличить выборку как больных, так и здоровых.

Список литературы

1. Демикова Н.С., Кобринский Б.А. Эпидемиологический мониторинг врождённых пороков развития в Российской Федерации. — М.: Пресс-Арт, 2011. — 236 с.
2. Назаренко М.С., Коваль М.М., Минайчева Л.И., Назаренко Л.П. Анализ ассоциаций полиморфного варианта *1298A>C* гена *5,10-метилентетрагидрофолат редуктазы (MTHFR)* с риском врождённых пороков сердца и челюстно-лицевых аномалий // Медицинская генетика. — 2011. — Т. 10, №12. — С. 39—40.
3. Панкова Е.Е., Зинченко Л.В., Матулевич С.А., Голубцов В.И. Полиморфизм *C677T* гена *MTHFR* как фактор риска врождённой патологии у потомства // Кубан. науч. мед. Вестн. — 2009. — №6. — С. 144—147.
4. Ali A., Singh S.K., Raman R. *MTHFR 677TT* alone and *IRF6 820GG* together with *MTHFR 677CT*, but not *MTHFR A1298C*, are risks for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in an Indian population // Genet. Test. Mol. Biomarkers. — 2009. — №13 (3). — P. 355—360.
5. Blanton S.H., Henry R.R., Quiping Yuan, Mulliken J.B. et al. Folate pathway and nonsyndromic cleft lip and palate // Birth Defects Research (Part A): Clinical and Molecular Teratology. — 2011. — Vol. 91, 1. — P. 50—60.
6. Candito M., Rivet R., Herbeth B. et al. Nutritional and genetic determinants of vitamin B and homocysteine metabolisms in neural tube defects: a multicenter case-control study // Am. J. Med. Genet. A. — 2008. — Vol. 146A (9). — P. 1128—1133.
7. Friso P., Girelli D., Trabetti E. et al. The *MTHFR 1298A>C* polymorphism and genomic DNA methylation in human lymphocytes // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. — 2005. — Vol. 14. — №4. — P. 938—943.
8. Frosst P., Blom H.J., Milos R. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase // Nat. Genet. — 1995. — Vol. 10. — P. 111—113.
9. Goyette P., Sumner J.S., Milos R. et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification // Nat. Genet. — 1994. — Vol. 7. — P. 195—200.
10. Gueant-Rodriguez R.M., Gueant J.L., Debard R. et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase *677T* and *1298C* alleles and folate status: A comparative study in Mexican, West African, and European populations // Am. J. Clin. Nutr. — 2006. — Vol. 83. — P. 701—707.

11. Jugessur A., Min Shi, Gjessing H.K. et al. Fetal genetic risk of isolated cleft lip only (CLO) versus isolated cleft lip and palate (CLP): A sub-phenotype analysis using two population-based studies of orofacial clefts in Scandinavia // *Birth Defects Research (Part A): Clinical and Molecular Teratology*. — 2011. — Vol. 91(2). — P. 85–92.
12. Jugessur A., Wilcox A.J., Lie R.T. et al. Exploring the Effects of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants *C677T* and *A1298C* on the Risk of Orofacial Clefts in 261 Norwegian Case-Parent Triads // *Am. J. Epidemiol.* — 2003. — Vol. 157. — P. 1083–1091.
13. Lourenco da Silva A., Arilho Ribeiro L., Cooper M. et al. Transmission analysis of candidate genes for nonsyndromic oral clefts in Brazilian parent-child triads with recurrence // *Genetics and Molecular Biology*. — 2006. — Vol. 29 (3). — P. 439–442.
14. Murthy J., Bhaskar L.V.K.S. Current concepts in genetics of nonsyndromic clefts // *Indian Journal of Plastic Surgery*. — 2009. — Vol. 42, 1. — P. 68–81.
15. Soezen M.A., Tolarova M.M., Spritz R.A. The common *MTHFR C677T* and *A1298C* variants are not associated with the risk of non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela // *J. Genet. Genomics*. — 2009. — Vol. 36 (5). — P. 283–288.
16. Tamura T., Picciano M.F. Folate and human reproduction // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2006. — Vol. 83. — №5. — P. 993–1016.
17. Van Rooij I.A.L.M., Vermeij-Keers C., Kluijtmans L.A.J. et al. Does the Interaction between Maternal Folate Intake and the Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms Affect the Risk of Cleft Lip with or without Cleft Palate? // *Am. J. Epidemiol.* — 2003. — Vol. 157. — P. 583–591.
18. Wan W.D., Wang L.J., Zhou X.P., Zhou D.L., Zhang Q.G. et al. Relationship between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) and genetic polymorphisms of *MTHFR C677T* and *A1298C* // — 2006. — Vol. 22 (1). — P. 8–11.

***MTHFR C677T* gene polymorphism and the risk of nonsyndromic orofacial cleft**

Meshcheryakova T.I.¹, Markova S.I.¹, Zhylina, S.S.¹, Gonchakov G.V.¹, Gonchakova S.G.¹, Abramov A.A.¹, Petrin A.N.^{1,2}, Mutovin G.R.¹

¹ — Scientific and Practical Center of medical care for children,

119620, Moscow, Aviatorov, 38, fax (499) 730-98-27. E-mail: Ivanovna-76@mail.ru

² — Moscow State Medico-Stomatological University,

127473, Moscow, Delegatskaya, 20, bld. 1

Currently, there are conflicting data regarding the role of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (*MTHFR*) in the formation of the risk of having children with cleft lip and/or palate (CL/P). The paper presents the analysis of the gene *MTHFR C677T* polymorphism in 102 children with nonsyndromic CL/P.

Key words: cleft lip and/or palate, polymorphism, methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*)

Ассоциация генов *TP53* и *MDM2* с риском развития рака молочной железы у русских женщин Московского региона

Бурденный А.М.¹, Казубская Т.П.², Брага Э.А.³, Носиков В.В.^{1,3}, Логинов В.И.³

¹ — ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва; e-mail: burdennyu@gmail.com; nosikov@sky.chph.ras.ru

² — ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Каширское ш., д.23

³ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, Москва, 115478, ул. Москворечье, д. 1; e-mail: ebraga@mail.ru; loginov7@genetika.ru

Исследована ассоциация полиморфных маркёров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* с риском развития рака молочной железы (РМЖ) у женщин московского региона. Показана ассоциация генотипа *Arg/Pro* полиморфного маркёра *Arg72Pro* гена *TP53* как с развитием РМЖ (OR=2,15, CI95%=1,24–3,73), так и с цистогистологическим подтипом инфильтративно-протоковым РМЖ. В случае сочетанного генотипа *Pro/Pro* + *T/G* генов *TP53* и *MDM2* обнаружена высокодостоверная ассоциация с риском развития РМЖ и его наиболее часто встречающейся формой — инфильтративно-протоковым раком.

Ключевые слова: полиморфные маркёры, ген *TP53*, ген *MDM2*, рак молочной железы (РМЖ), инфильтративно-протоковый рак молочной железы (ипРМЖ), инфильтративно-дольковый рак молочной железы (идРМЖ)

Введение

РМЖ занимает лидирующие позиции по заболеваемости злокачественными новообразованиями среди женщин, у каждой 12-й имеется риск заболеть РМЖ в течение жизни, смертность при этом составляет до 40% [7]. Генетическая предрасположенность, обусловленная наследственно передающимися нарушениями в ряде генов, например в генах *BRCA1* и *BRCA2*, проявляется лишь в 5–8% случаев развития РМЖ [4]. Изучению этиологии, генетических факторов, молекулярных механизмов и поиска оптимального лечения sporadического РМЖ посвящено большое количество работ [6, 8, 17, 19, 21], однако до сих пор проблема остаётся до конца не решённой [3]. Злокачественное изменение клеток и прогрессия опухолевого роста, клинически проявляющаяся инвазией, регионарным и отдалённым метастазированием, связаны с нарушениями нормального функционирования генома [1, 9, 14]. Молекулярный патогенез РМЖ, как и многих онкологических заболеваний, включает множество генетических и эпигенетических событий, ведущих к активации онкогенов и инактивации генов опухолевой супрессии, лежащих в основе опухолевой трансформации [5]. Одним из таких генов является ген *TP53*, кодирующий белок p53, вовлечённый в регуляцию механизмов распознавания и проведения сигналов внутри клетки, репарацию генома, регуляцию клеточного деления и клеточной смерти, координацию метаболических процессов, регуляцию взаимодействий между клетками [2]. Контролирующая функция p53 заключается в предотвращении отклонений и связанных с ними патологий, а недостаточность этого белка ведёт к неизбежному развитию серьёзных заболеваний, в том числе и РМЖ.

В гене *TP53* обнаружено более 30 полиморфных маркёров, из которых наиболее функционально значимым является однонуклеотидный полиморфизм в кодоне 72 эк-

зона 4 (*Arg72Pro*). Это связано с тем, что аминокислотный остаток в положении 72 входит в состав домена, связывающегося с ДНК. В ряде работ было показано, что варианты с остатками Arg и Pro в положении 72 обладают разной способностью индуцировать апоптоз и защищать от опухолевого перерождения клеток. Так, вариант белка Arg72, соответствующий эволюционно более молодому аллелю, более эффективен в индукции апоптоза, активнее транспортируется в митохондрии, способствует раскрытию митохондриальных пор и лучше защищает клетки от опухолевого перерождения [10, 24]. В то же время носители аллеля Pro72 живут дольше после манифестации заболевания и отличаются большей устойчивостью к стрессам и пониженной скоростью старения [15, 20]. Совсем недавно было также установлено, что ген *TP53* участвует в альтернативном механизме регуляции генов опухолевой супрессии, среди которых важную роль играет ген *RASSF1A* [22].

Также особый интерес представляет ген *MDM2*, кодирующий ядерный белок Mdm2 (murine double minute-2 protein), который, связываясь с p53, способствует его деградации [2]. Полиморфный маркёр *T309G* гена *MDM2* расположен в промоторной области, и наличие остатка G в положении 309 обуславливает более высокое сродство к фактору транскрипции SP1. Поэтому носители аллеля G имеют более высокий уровень экспрессии гена *MDM2*, что, в свою очередь, приводит к более быстрой деградации белка p53 [11]. Также показано, что генотип *TG* ассоциирован с более ранней манифестацией онкологического процесса [25, 26], и пониженной выживаемостью при РМЖ [13].

Целью настоящей работы было исследование распределения частот генотипов полиморфных маркёров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* и их комбинаций у больных с различными гистологическими типами РМЖ у женщин Московского региона и онкологически здоровых.

Материалы и методы

Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности. Получено разрешение этического комитета НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина, РАМН (Москва). В исследование вошли 140 больных РМЖ, в возрасте 53 ± 17 лет, не получавших до забора крови лучевую или химиотерапию. В качестве контроля использовали сопоставимую по возрасту выборку онкологически здоровых лиц ($n=100$) Московского региона. Диагноз и гистологическая форма РМЖ устанавливались на основании гистологического исследования в НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Выборка больных представлена 35 больными с инфильтративно-дольковым (идРМЖ) и 105 больными с инфильтративно-протоковым РМЖ (ипРМЖ). Материалом для исследования служила геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови с помощью протеиназы К с последующей фенольно-хлороформной экстракцией и осаждением этанолом. Идентификация аллелей полиморфных маркёров генов проводилась путём анализа ПЦР-ПДРФ. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в табл. 1. ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 60 мМ Трис-НCl, pH 8,9, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 25 мМ KCl, 0,1%-ный Тритон X-100; 0,25 мМ каждого dNTP; 1–10 нг ДНК; 25 пМ каждого праймера; 0,5 ед. Taq-полимеразы («СибЭнзим»); MgCl₂ в концентрации 2,0 мМ. Амплификацию проводили по следующей программе: 94°C, 1 мин 30 с; 35 циклов 92°C, 15 с; 60°C, 20 с; 72°C, 15 с; 72°C, 1 мин 30 с, на амплификаторе Терцик (Россия).

Далее амплифицированный фрагмент ДНК гена *MDM2* подвергали обработке рестриктазой *MspA1I* («СибЭнзим») в термостате при 37°C в течение 16 ч, амплифицированный фрагмент ДНК гена *TP53* подвергали обработке рестриктазой *BstH1I* («СибЭнзим») в термостате при 65°C в течение 16 ч.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 6.0. При сравнении частот генотипов использовался стандартный критерий χ^2 Пирсона. Для всех изученных полиморфных вариантов генов в выборках пациентов распределение генотипов соответствовало ожидаемому при равновесии Харди—Вайнберга. Комплексную оценку взаимосвязей между исследуемыми генами проводили с использованием логистической регрессии, определяя отношение шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом (CI) при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Распределение частот генотипов полиморфных маркёров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* в контрольной группе и группе больных РМЖ представлено в табл. 2. Показана ассоциация генотипа *Pro/Pro* гена *TP53* с РМЖ. Так, частота данного генотипа в группе больных оказалась в 1,2 раза выше по сравнению с группой контроля, в то же время частота генотипа *Arg/Arg* снижена в 3,4 раза ($\chi^2=22,95$). Установлено, что частота предрасполагающего генотипа *TG* гена *MDM2* в группе больных с РМЖ не отличалась от таковой в контрольной группе. Полученные нами данные согласуются с данными, полученными в других исследованиях [18].

При изучении распределения частот генотипов полиморфного маркёра *Arg72Pro* гена *TP53* при идРМЖ и ипРМЖ получены достоверные различия частот генотипов *Arg/Pro* и *Pro/Pro* гена *TP53* и в группе больных и в контроле (табл. 2). Полученные нами данные согласуются с данными других авторов [18, 23].

При изучении частот распределения генотипов полиморфных маркёров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* у больных РМЖ с различными патогенетическими характеристиками злокачественного процесса, такими, как лимфогенное и гематогенное метастазирование, стадия, размер и степень дифференцировки опухоли, ассоциации не найдены.

При изучении влияния возрастного фактора нами были установлены значимые различия в распределении частот генотипов полиморфных маркёров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* у больных РМЖ. Так, частота генотипа *Pro/Pro* гена *TP53* в группе больных РМЖ младшего и среднего возраста (моложе 53 лет) составила 47% ($\chi^2=24,47$, $p=5 \cdot 10^{-6}$; OR=2,09, CI 95%=1,01–4,36), статистически значимо превышая этот показатель в контроле (29%). Таким образом, полиморфный маркёр *Arg72Pro* гена *TP53* ассоциирован с развитием РМЖ. Следует отметить, что частота распределения генотипа *TG* гена *MDM2* в той же возрастной группе больных не превышала таковую в группе контроля. Наши результаты согласуются с данными ряда зарубежных авторов [12, 16].

Значительный интерес представляют также результаты, полученные при изучении распределения частот сочетанных генотипов изученных полиморфных маркёров. Так, частота генотипа *Pro/Pro* + *TG* генов *TP53* и *MDM2* в группе больных РМЖ составила 12,9% (OR=9,19, CI 95%=1,11–75,81, $p=0,05$), статистически значимо

Последовательность праймеров
для проведения амплификации полиморфных маркёров генов *TP53* и *MDM2*

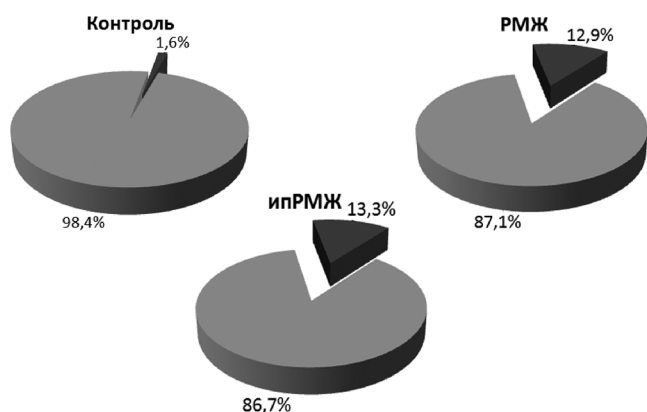
Таблица 1

Маркёр	Последовательность праймеров
<i>Arg72Pro</i> rs2279744	F: CGCGGGAGTTTCAGGGTAAAG
	R: GCAGTTTCGGAACGTGTCTG
<i>T309G</i> rs1042522	F: AGGAGCTGCTGGTGCAGGGGCCGCG
	R: TAAGGACAAGGGTTGGGCTGGGGACCTGGA

Распределение частот генотипов полиморфных маркёров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* среди больных раком молочной железы, его гистологических типов и здоровых индивидов

Рак молочной железы							
Ген	Генотип	PMЖ, n=140	Контроль, n=100	χ^2	p	OR	
						Знач.	CI _{95%}
MDM2	T/T	0,943	0,970	0,98	0,61	0,51	0,13—1,97
	T/G	0,057	0,030			1,96	0,51—7,58
TP53	Arg/Arg	0,114	0,370	22,95	1,0E-5	0,22	0,11—0,43
	Arg/Pro	0,443	0,270			2,15	1,24—3,74
	Pro/Pro	0,443	0,360			1,41	0,83—2,39
Инфильтративно-дольковый рак молочной железы							
Ген	Генотип	PMЖ, n=35	Контроль, n=100	χ^2	p	OR	
						Знач.	CI _{95%}
MDM2	T/T	0,943	0,970	0,54	0,77	0,51	0,08—3,19
	T/G	0,057	0,030			1,96	0,31—12,24
TP53	Arg/Arg	0,086	0,370	10,21	0,006	0,16	0,05—0,56
	Arg/Pro	0,429	0,270			2,03	0,91—4,52
	Pro/Pro	0,486	0,360			1,68	0,77—3,66
Инфильтративно-протоковый рак молочной железы							
Ген	Генотип	PMЖ, n=105	Контроль, n=100	χ^2	p	OR	
						Знач.	CI _{95%}
MDM2	T/T	0,924	0,970	2,15	0,34	0,38	0,10—1,46
	T/G	0,076	0,030			2,67	0,69—10,35
TP53	Arg/Arg	0,124	0,370	17,81	0,0001	0,24	0,12—0,49
	Arg/Pro	0,448	0,270			2,19	1,22—3,93
	Pro/Pro	0,429	0,360			1,33	0,76—2,34

превышая этот показатель в контрольной группе (1,6%). Следует также отметить, что при рассмотрении сочетания генотипов изученных полиморфных маркёров генов *TP53* и *MDM2* в гистологических подтипах РМЖ, было отмечено увеличение частоты встречаемости генотипа *Pro/Pro* + *TG* в группе больных ипРМЖ в 8 раз (OR=9,54, CI 95%=1,11–82,26, p=0,05) (рисунок).



■ *TP53(Pro/Pro)/MDM2(T/G)* ■ *TP53(Arg/Arg + Arg/Pro)/MDM2(T/T)*
Распределение частот сочетанных генотипов генов *TP53* и *MDM2* в контрольной группе и в группе больных РМЖ и ипРМЖ

Заключение

В настоящей работе изучено распределение частот генотипов полиморфных маркёров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* при РМЖ. Обнаружена повышенная частота генотипов *Arg/Pro* и *Pro/Pro* гена *TP53* у больных РМЖ и его гистологическими подтипами (идРМЖ и ипРМЖ), что может свидетельствовать о том, что носительство predisposing аллеля *Pro* генов *TP53* играет важную роль в формировании РМЖ.

Также для генотипа *Pro/Pro* полиморфного маркёра гена *TP53* показана ассоциация с развитием РМЖ у пациентов в возрасте моложе 53 лет.

В нашей работе для сочетанного генотипа *Pro/Pro* + *TG* генов *TP53* и *MDM2* была показана достоверная ассоциация с риском развития РМЖ и его гистологического подтипа — ипРМЖ у женщин Московского региона.

Выявленные особенности могли бы быть использованы при разработке современных методов прогнозирования, профилактики и лечения РМЖ, а также для формирования групп риска пациентов Московского региона.

Список литературы

1. Блохин Д.Ю. «Постгеномный взгляд» на проблемы онкогенеза // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. — 2009. — Т. 2, №3. — С. 277—282.
2. Желтухин А.О., Чумаков П.М. Повседневные и индуцируемые функции гена p53 // Успехи биоорганической химии. — 2010. — Т. 50. — С. 447—516.
3. Жуков Н.В., Тюляндин С.А., Болотина Л.В., Бяхов М.Ю., Злокачественные опухоли // Journal of malignant tumours. — 2012. — Vol. 2, №2. — P. 168.
4. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. — 2010. — Т. 11, №4. — С. 258—266.
5. Кулигина Е.Ш. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы // Практическая онкология. — 2010. — Т. 11, №4. — P. 203—216.
6. Силков А.Н., Горева Е.П., Жовмер А.С., Киреев Ф.Д., Максимов В.Н., Пилипенко И.В., Малиновская Е.А., Бабышкина Н.Н., Литвяков Н.В., Сеников С.В., Козлов В.А. Полиморфизм генов ИЛ-18 и ИЛ-1 β у больных раком молочной железы // Российский журнал иммунологии. — 2009. — Т. 3, №12. — С. 259—266.
7. Чиссова В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность). — М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2012. — 260 с.
8. Alvarez R.H., Valero V., Hortobagyi G.N. Emerging Targeted Therapies for Breast Cancer // Journal of clinical oncology. — 2010. — Vol. 28, №20. — P. 3366—3379.
9. Ayoub N., Lucas C., Kaddoumi A. Genomics and pharmacogenomics of breast cancer: current knowledge and trends // Asian Pac. J. Cancer Prev. — 2011. — Vol. 12, №5. — P. 1127—1140.
10. Bonafe M., Salvio S., Barbi C., Trapassi C., Tocco F., Storci G., Invidia L., Vannini I., Rossi M., Marzi E., Mishto M., Capri M., Olivieri F., Antonicelli R., Memo M., Uberti D., Nacmias B., Sorbi S., Monti D., Franceschi C. The different apoptotic potential of the p53 codon 72 alleles increases with age and modulates in vivo ischaemia-induced cell death // Cell Death Differ. — 2004. — Vol. 11, №9. — P. 962—973.
11. Bond G.L., Hirshfield K.M., Kirchhoff T., Alexe G., Bond E.E., Robins H., Bartel F., Taubert H., Wuerl P., Hait W., Toppmeyer D., Offit K., Levine A.J. MDM2 *T309G* accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner // Cancer Res. — 2006. — Vol. 66, №10. — P. 5104—5110.
12. Faghani M., Ghasemi F.M., Nikhbakht M., Salehi M. TP53 PIN3 polymorphism associated with breast cancer risk in Iranian women // Indian J. Cancer. — 2011. — Vol. 48, №3. — P. 298—302.
13. Leeuwen F.E., Van't Veer L.J., Pharoah P.D.P., Easton D.F., Shah M., Humphreys M., Doerk T., Reincke S.A., Fagerholm R., Blomqvist C., Nevanlinna H. Combined effects of single nucleotide polymorphisms TP53 R72P and MDM2 *T309G*, and p53 expression on survival of breast cancer patients // Breast Cancer Res. — 2009. — Vol. 11, №6. — R89.
14. Meindl A., Ditsch N., Kast K., Rhiem K., Schmutzler R.K. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts // Dtsch. Arztebl. Int. — 2011. — Vol. 108 №19. — P. 323—330.
15. Orsted D.D., Bojesen S.E., Tybjaerg-Hansen A., Nordestgaard B.G. Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population // J. Exp. Med. — 2007. — Vol. 204, №6. — P. 1295—1301.
16. Petenkaya A., Bozkurt B., Akilli-Ozturk O., Kaya H.S., Gur-Dedeoglu B., Yulug I.G. Lack of association between the MDM2-*T309G* polymorphism and breast cancer risk // Anticancer Res. — 2006. — Vol. 26, №6C. — P. 4975—4977.
17. Peterson C. Drug therapy of cancer // Eur. J. Clin. Pharmacol. — 2011. — Vol. 67, №5. — P. 437—447.
18. Proestling K., Hebar A., Pruckner N., Marton E., Vinatzer U., Schreiber M. The Pro Allele of the p53 Codon 72 Polymorphism Is Associated with Decreased Intratumoral Expression of BAX and p21, and Increased Breast Cancer Risk // PLoS One. — 2012. — Vol. 7, №10. — e47325.
19. Reinholz M.M., Bruzek A.K., Visscher D.W., Lingle W.L., Schroeder M.J., Perez E.A., Jenkins R.B. Breast cancer and aneuploidy 17: implications for carcinogenesis and therapeutic response // Lancet Oncol. — 2009. — Vol. 10, №3. — P. 267—277.
20. Rodier F., Campisi J., Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression // Nucleic Acids Res. — 2007. — Vol. 35, №22. — P. 7475—7484.
21. Tenhagen M., van Diest P.J., Ivanova I.A., van der Wall E., van der Groep P. Fibroblast growth factor receptors in breast cancer: expression, downstream effects, and possible drug targets // Endocr. Relat. Cancer. — 2012. — Vol. 19, №4. — P. 115—129.
22. Tian Y., Hou Y., Zhou X., Cheng H., Zhou R. Tumor Suppressor RASSF1A Promoter: p53 Binding and Methylation // PLoS ONE — 2011. — Vol. 6, №2. — e17017.
23. Tommiska J., Eerola H., Heinonen M., Salonen L., Kaare M., Tallila J., Ristimäki A., von Smitten K., Aittomäki K., Heikila P., Blomqvist C., Nevanlinna H. MDM2 *T309G* accelerates breast and ovarian carcinogenesis in BRCA1 and BRCA2 carriers of Jewish-Ashkenazi descent // Clin. Cancer Res. — 2005. — Vol. 11, №14. — P. 5098—5103.
24. van Heemst D., Mooijart S.P., Beekman M., Schreuder J., de Craen A.J., Brandt B.W., Slagboom P.E., Westendorp R.G. Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality // Exp. Gerontol. — 2005. — Vol. 40, №1—2. — P. 11—15.
25. Whibley C., Pharoah P.D., Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications // Nat. Rev. Cancer. — 2009. — Vol. 9, №2. — P. 95—107.
26. Yarden R.I., Friedman E., Metsuyanin S., Olender T., Ben-Asher E., Papa M.Z. MDM2 *T309G* accelerates breast and ovarian carcinogenesis in BRCA1 and BRCA2 carriers of Jewish-Ashkenazi descent // Breast Cancer Res. Treat. — 2008. — Vol. 111, №3. — P. 497—504.

Association of polymorphic markers of *TP53* and *MDM2* genes with breast cancer in females of Moscow region

Burdenny A.M.¹, Kazubskaya T.P.², Braga E.A.³, Nosikov V.V.^{1,3}, Loginov V.I.³

¹ — Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Russia, Moscow; e-mail: burdenny@gmail.com

² — Blokhin Russian Oncological Research Center of Russian Academy of Medical Sciences, Russia, Moscow

³ — National Research Center of Russian Federation «GosNII genetika»; e-mail: loginov7@genetika.ru

An association of polymorphic markers *Arg72Pro* of *TP53* gene and *T309G* of *MDM2* gene with risk of breast cancer in females of Moscow region has been studied. We found an association of *Pro/Pro* genotype of polymorphic marker *Arg72Pro* with breast cancer development (OR=1.41, p=10⁻⁵) and with ductal and lobular breast cancer development (OR=1.33, p=0.0001, OR=1.68, p=0.006, respectively). In case of combined susceptible genotype *Pro/Pro* + *TG* of *TP53* and *MDM2* genes we have found highly reliable association with breast cancer and its most frequent subtype — ductal breast carcinoma (p=0.05; p=0.05, respectively).

Key words: polymorphic marker, *TP53* and *MDM2* genes, breast cancer (BC), ductal breast carcinoma (DBC), lobular breast carcinoma (LBC)

SEMA6B — кандидат на роль гена супрессора опухолевого роста в критическом хромосомном районе 19p13.3

Кузнецова Е.Б.^{1,2}, Пудова Е.А.³, Танас А.С.^{1,2}, Залетаев Д.В.^{1,2}, Стрельников В.В.^{1,2}

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр»

Российской академии медицинских наук, Москва, 115478, ул. Москворечье, д. 1, факс: (495) 324-07-02, e-mail: vstrel@list.ru

² — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения

Российской Федерации, Москва, 119992, ул. Трубецкая, д. 8, факс: (495) 622-96-35, e-mail: vstrel@list.ru

³ — Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»

Роспотребнадзора, Москва, 111123, ул. Новогиреевская, д. 3-а, тел: (495) 672-11-58 факс: (495) 304-22-09, e-mail: el_pudov@mail.ru

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о крайне высокой частоте потери гетерозиготности на коротком плече хромосомы 19 — в хромосомном сегменте 19p13.3 — при различных видах злокачественных новообразований: при раке ободочной кишки, шейки матки, молочной железы, при миелоидном лейкозе. Данные о высокой частоте потери гетерозиготности 19p13.3 заставляют предположить наличие в этом сегменте одного или нескольких генов-супрессоров опухолевого роста. Ранее нами было выявлено аномальное метилирование 5'-области гена *SEMA6B*, расположенного в критическом районе, в образцах рака молочной железы (РМЖ). Проведённый в настоящем исследовании анализ молекулярной патологии *SEMA6B* выявил и другие особенности, характерные для гена супрессора опухолевого роста: частота потери гетерозиготности *SEMA6B* при РМЖ составила 50%; у одной из пациенток с РМЖ выявлена мутация в эволюционно консервативном участке гена.

Ключевые слова: рак молочной железы, супрессоры опухолевого роста, хромосомный район 19p13.3, семафорин, *SEMA6B*, метилирование ДНК, потеря гетерозиготности, мутации

Введение

Изучение аллельного дисбаланса хромосомных участков позволило обнаружить в геномах злокачественных новообразований локусы с изменениями копийности, характерными для определённых типов опухолей. Целе-направленное исследование этих локусов привело к выявлению целого ряда генов, вовлечённых в канцерогенез: *AKT2*, *ERBB2*, *MYC*, *MYCL1*, *MYCN*, *REL* и др. [8, 15]. По некоторым оценкам, поиск генов, вовлечённых в канцерогенез, в областях аллельного дисбаланса более эффективен, чем отбор для анализа генов с определёнными функциями [16]. Тем не менее, существуют хромосомные сегменты, в которых, несмотря на высокую частоту наблюдаемого в опухолях аллельного дисбаланса, до сих пор не выявлены ключевые гены, вовлечённые в канцерогенез. В их числе — дистальный сегмент короткого плеча 19-й хромосомы, 19p13.3. Это C,G-богатый участок ДНК, содержащий значительное количество генов [12]. Потеря гетерозиготности по 19p13.3 была показана при различных видах злокачественных новообразований, в частности при РМЖ, при раке ободочной кишки, шейки матки, при миелоидном лейкозе [10, 18, 19], причём для частот аллельных делеций этого локуса при РМЖ были неоднократно показаны весьма высокие значения: от 21 до 47% [6, 11, 20]. Что примечательно, хромосомный сегмент 19p13.3 содержит ген *LKB1*, мутации в котором приводят к развитию синдрома Пейтца—Егерса [14]. Это редкое заболе-

вание наследуется по аутосомно-доминантному типу и характеризуется пигментными пятнами на коже и слизистых, полипами желудочно-кишечного тракта и повышенным риском развития новообразований, в частности РМЖ. Однако в работах, посвящённых исследованию этого гена при спорадических опухолях молочной железы и при синдроме Пейтца—Егерса, потери гетерозиготности в гене *LKB1* были выявлены только у больных с синдромом Пейтца—Егерса [5]. У пациентов со спорадическими формами рака делеций этого гена обнаружено не было, хотя отмечались делеции в локусе 19p13.3 по другим маркерам. Можно предполагать, что повреждения гена *LKB1* приводят к развитию наследственного синдрома Пейтца—Егерса, однако в патогенезе спорадических форм РМЖ играют незначительную роль. Между тем, высокие частоты потерь гетерозиготности по ряду микросателлитных маркеров в локусе 19p13.3 и недавно продемонстрированная ассоциация частоты этих потерь со степенью злокачественности опухолей молочной железы заставляют предположить наличие в этой области одного или нескольких генов-супрессоров опухолевого роста помимо уже известного *LKB1* [20]. Проведённые нами исследования позволяют предложить на роль такого кандидата ген *SEMA6B*.

Аномальное метилирование 5'-области гена *SEMA6B* было выявлено нами ранее в образцах РМЖ при скрининге дифференциального метилирования геномов методом метилчувствительного фенгипринтинга [1, 2,

17]. В настоящей работе суммированы результаты изучения аномального метилирования, потери гетерозиготности и скрининга мутаций в гене *SEMA6B* при РМЖ.

Материалы и методы

Исследование проведено на материале тканей опухолей и венозной крови, полученных от 100 больных РМЖ. Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. Выделение РНК проводили методом кислофенольной экстракции с использованием набора «РИБО-золь-А» (ИнтерЛабсервис, Москва). Для синтеза кДНК образцы РНК обрабатывали ДНКазой (Fermentas, Литва) и проводили обратную транскрипцию с использованием набора Реверта-Л (ИнтерЛабсервис, Москва) по протоколу фирмы-производителя.

Скрининг мутаций в кодирующей части гена *SEMA6B* проводили путём прямого секвенирования перекрывающихся фрагментов кДНК, предварительно амплифицированных методом ПЦР. Температурная схема ПЦР включала в себя предварительную денатурацию при 95°C в течение 5 мин; 33 цикла денатурации/отжига/синтеза при 95°C — 40 с, $T_{отж}$ (таблица) — 40 с, 72°C — 40 с соответственно; финальную элонгацию при 72°C — 10 мин. В состав реакционной смеси входили следующие реагенты: 2,5 мкл 10х буфера для ПЦР (50 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, pH 8.4), по 200 мкМ каждого dNTP, по 10 пкМ праймеров, 1 е.а. Taq-полимеразы, $MgCl_2$ в количестве, определённом экспериментальным путём для каждой пары праймеров (таблица). В реакционную смесь добавляли 0,1–0,2 мкг кДНК; объём смеси доводили деионизованной водой до 25 мкл. Для подтверждения герминаль-

ного характера мутации p.H221R, выявленной в опухоли одной из пациенток, проведено секвенирование геномной ДНК из лимфоцитов периферической крови с использованием праймеров *SEMA6B*-ex8F: ctg gtg ggg aga ttt gat gaa и *SEMA6B*-ex8R: cct ctg cgg tct cat ctc ttg (длина продукта ПЦР — 242 п.н.).

ПЦР варибельной области микросателлитного СА-повтора, прилежащего к гену *SEMA6B*, проводили с праймерами *SEMA6B*-CA1 F: cag agg gtg ttg agg gag tta и *SEMA6B*-CA1 R: gga ggg agg gat ggt gac aac, — по приведённой выше схеме при $T_{отж} = 66^\circ\text{C}$ и конечной концентрации $MgCl_2$ в реакционной смеси, равной 4 мМ.

Результаты

Для генов супрессоров опухолевого роста характерна их инактивация в опухолевых клетках посредством делеций, мутаций и/или аномального метилирования ДНК. Одним из способов определения аллельного состояния геномных локусов, используемых для выявления соматических делеций, является сравнительный анализ аллелей микросателлитных маркёров в нормальной и опухолевой тканях пациента. Нами проведено исследование аллельного состояния области расположения гена *SEMA6B*. В качестве маркёра выбран ближайший к гену полиморфный микросателлитный повтор, расположенный на расстоянии около 15 т.п.н. дистальнее *SEMA6B* (рис. 1).

Этот микросателлитный маркёр представляет собой непрерывный динуклеотидный СА-повтор с консенсусной последовательностью (CA)₂₀. Характеристики повтора ранее не исследовались, однако высокая протяжённость и отсутствие нуклеотидных замен позволи-

Таблица

Праймеры для секвенирования участков кДНК *SEMA6B*

Исследуемый фрагмент	Последовательность (5'→3')	$T_{отж}$, °C	$MgCl_2$, мМ	Размер продукта, н.п.
<i>SEMA6B</i> — ex1-2	F: tca gac agg aaa atg ggc tcg R: ccc cag tag cag cag cag aag	62	4	199
<i>SEMA6B</i> — ex2-3	F: gtc acc tcc tcc tgt cgc ctg R: tcg ctg gat gtt gag gtc gtc	66	2	237
<i>SEMA6B</i> — ex3-5	F: cta tcc cgt gtt tgt ggg cag R: tcc tgt ttg ccc ttc atc cga	62	3	237
<i>SEMA6B</i> — ex5-7	F: atc taa ccc cag cga cat aaa R: cgt cag aga aga ggg caa cat	62	4	245
<i>SEMA6B</i> — ex7-9	F: tcg gag aca aca tca gcg gta R: taa act cca tcg caa tct ccc	58	3	267
<i>SEMA6B</i> — ex9-10	F: cct tac ttt gtc cat gcg gtg R: ggg tac aga gca gtt gag ccg	60	4	201
<i>SEMA6B</i> — ex10	F: cag ttt ggg tgg tga gtg gcат R: ccc aaa ggc aga gga tga gga	67	2	507
<i>SEMA6B</i> — ex11	F: gca cgc act tgt ccg aga tgg R: cct cat ccg ggc act tga ctc	66	3	218
<i>SEMA6B</i> — ex12	F: cct tta cgt tcg tcc tga cca R: tcc tct cac cct cca tct acc	64	4	223

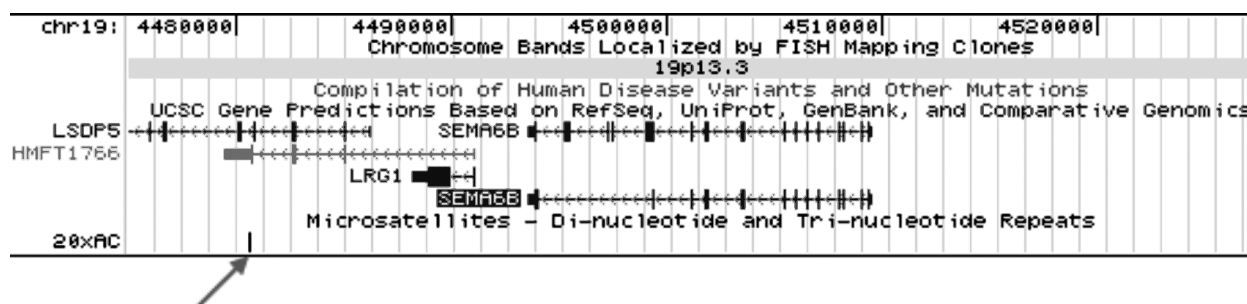


Рис. 1. Расположение микросателлитного СА-повтора (указан стрелкой), использованного для изучения аллельного состояния области расположения гена *SEMA6B*

ли нам предполагать высокий уровень его информативности как маркера. Вывод о наличии или отсутствии аллельного дисбаланса делался на основе разделения исследуемых аллелей в полиакриламидном геле (рис. 2).

Доля образцов ДНК из лимфоцитов периферической крови пациенток с РМЖ, показавших гетерозиготное (информативное) состояние исследуемого СА-повтора, составила 35% (35/100). Частота аллельного дисбаланса в соответствующих образцах опухолей по результатам микросателлитного анализа составила 50% (17/35). Полученное значение достаточно высоко и позволяет расценивать аллельный дисбаланс в области гена *SEMA6B* как маркер опухолевого процесса в молочной железе. Ранее для хромосомного сегмента 19p13.3 уже был показан высокий уровень аллельных делеций, составивший от 21 до 47% в зависимости от расположения исследуемого локуса [20], однако прицельного исследования характера аллельной копияности области гена *SEMA6B* прежде не проводилось.

Возможными событиями, приводящими к инактивации супрессоров опухолевого роста при спорадических формах рака, являются соматические мутации. В поисках такого рода мутаций нами проведено секвенирова-

ние экзонов гена *SEMA6B* в материале кДНК, полученном из 30 образцов РМЖ.

В одном из опухолевых образцов выявлена миссенс-мутация в экзоне 8 *SEMA6B* (рис. 3). Замена в 867-м нуклеотиде кДНК приводит к изменению аминокислотной последовательности белка: к замене гистидина на аргинин (p.H221R). В образце кДНК указанная мутация выявлена в гомозиготном состоянии. Исследование ДНК из лимфоцитов периферической крови той же пациентки показало герминальный характер мутации (мутация в гетерозиготном состоянии). Наличие мутации подтверждено рестрикционным анализом с использованием эндонуклеазы рестрикции *FatI* с сайтом узнавания CATG. При секвенировании кДНК других образцов РМЖ данная мутация не обнаружена. Информация о соответствующей нуклеотидной замене в базе данных полиморфизмов генома человека dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) отсутствует. Каталог соматических мутаций в злокачественных опухолях (COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) по состоянию на февраль 2013 г. содержит информацию о секвенировании гена *SEMA6B* в 304 образцах РМЖ, выявившем единственную мутацию, p.L191R.

Обсуждение

Ген *SEMA6B* кодирует семафорин 6В, относящийся к семейству семафоринов — белков, характеризующихся наличием консервативного SEMA-домена. Семейство насчитывает 7 классов белков, включающих как секреторные, так и трансмембранные формы, которые, по-видимому, задействованы в развитии центральной и периферической нервной системы. Первоначально считалось (по аналогии с первыми изученными представителями семейства), что функции семафоринов в нервной системе сводятся к регуляции направленного роста аксонов, однако далеко не для всех представителей семафоринов удалось доказать столь узкую специализацию [13]; функции же многих, в том числе SEMA6B, до сих пор не охарактеризованы. Возможно, это связано с недооценкой роли в развитии нервной системы глиальных клеток, которые составляют до 90% клеток нервной системы человека и экспрессируют те же типы семафоринов, что и нейроны. В процессе развития клетки глиии прохо-

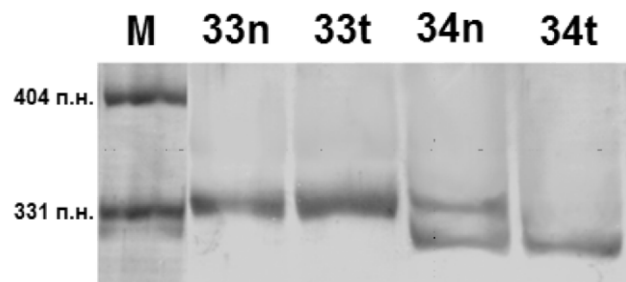


Рис. 2. Результаты микросателлитного анализа аллельных потерь гена *SEMA6B*:

М — маркер молекулярного веса; 33, 34 — номера парных образцов РМЖ (t-опухоль, n-норма). Образец 33 гомозиготен (неинформативен) по анализируемому микросателлитному маркеру. В четвертой дорожке (34n) четко видны два аллеля, в пятой дорожке с образцом опухолевой ткани той же пациентки (34t) отсутствует более тяжелый аллель, следовательно, для данной пары образцов можно сделать заключение об аллельном дисбалансе.

дят стадии дифференцировки из мультипотентных предшественников, мигрируют на значительные расстояния и создают условия для направленной миграции и выживания нейронов. Кроме того, недавние исследования показывают, что молекулы направленного роста аксонов («axon guidance molecules») повсеместно экспрессируются в тканях человеческого организма, при этом их функции за пределами нервной системы по большей части не изучены. Тем не менее, в последнее время накапливаются свидетельства их вовлечения во многие патологические процессы, особенно в процессы канцерогенеза [9].

Важнейшим механизмом инактивации генов супрессоров опухолевого роста в клетках злокачественных новообразований является метилирование их регуляторных областей. Ранее нами было выявлено аномальное метилирование 5'-области гена *SEMA6B* в образцах РМЖ [1] и определена частота этого события, составившая 38% [2]. В свете показанного нами дифференциального метилирования *SEMA6B* при РМЖ необходимо упомянуть, что гиперметилирование промотора другого представителя семейства семафоринов, *SEMA3B*, было описано при немелкоклеточном раке лёгкого [9], причём эксперименты по реактивации *SEMA3B* в клетках РМЖ показали, что он обладает свойствами гена-супрессора опухолевого роста с проапоптотическим действием. Участие в апоптозе, клеточной пролиферации и миграции, а также в определении метастатического потенциала опухоли уже показано для целого ряда представителей семейства семафоринов [3, 4, 7].

В настоящей работе продолжен анализ возможных путей инактивации гена *SEMA6B* при РМЖ, исследованы состояние зиготности и сохранность нуклеотидной последовательности гена в образцах РМЖ. Полученные данные о высокой частоте аллельного дисбаланса гена *SEMA6B* при РМЖ подкрепляют высказанное нами предположение о его возможной роли в онкогенезе. Полученные результаты, в сочетании с данными литературы, свидетельствуют о том, что *SEMA6B* — один из возможных генов-кандидатов на роль супрессора опухолевого роста в хромосомном сегменте 19p13.3.

Список литературы

1. Кузнецова Е.Б., Дрозд О.В., Бабенко О.В., Землякова В.В., Немцова М.В., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Идентификация генов, вовлеченных в канцерогенез, методом метилчувствительного ПЦР-фингерпринтинга // Медицинская генетика. — 2004. — Т. 3, №12. — С. 563—568.
2. Кузнецова Е.Б., Кекеева Т.В., Ларин С.С., Землякова В.В., Бабенко О.В., Немцова М.В., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Новые маркёры метилирования и экспрессии генов при раке молочной железы // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 41, №4. — С. 624—633.
3. Basile J.R., Holmbeck K., Bugge T.H., Gutkind J.S. MT1-MMP Controls Tumor-induced Angiogenesis through the Re-

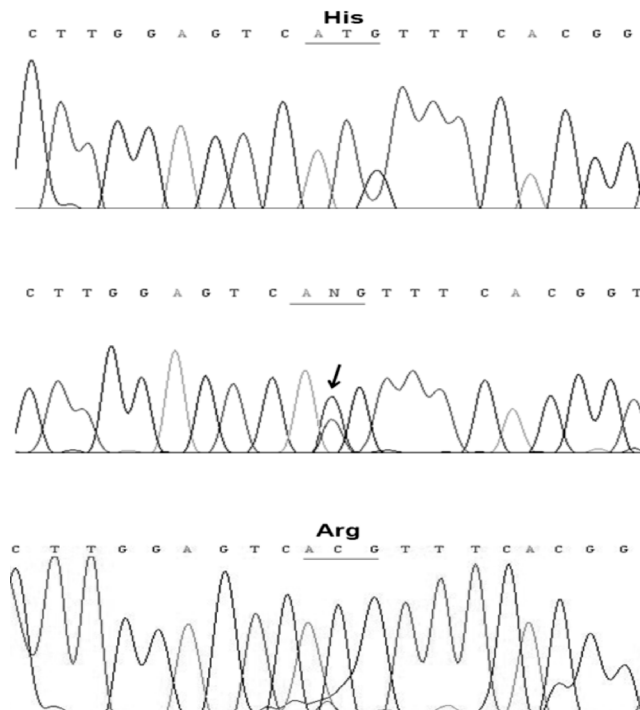


Рис. 3. Результаты секвенирования фрагмента восьмого экзона гена *SEMA6B*.

Вверху — пример нормальной последовательности.

В центре — сиквенс образца ДНК из лимфоцитов пациентки РМЖ с мутацией p.H221R, стрелкой отмечена позиция мутации, обнаруженной в гетерозиготном состоянии.

Внизу — сиквенс образца ДНК из опухоли молочной железы той же пациентки, мутация p.H221R в гомозиготном состоянии.

Высокая степень консервативности, характерная для аминокислотного остатка гистидина в позиции 221 белка *SEMA6B* среди позвоночных (млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб) позволяет предполагать, что обнаруженная нами мутация p.H221R может влиять на функциональную активность белка *SEMA6B*.

lease of Semaphorin 4D // J. Biol. Chem. — 2007. — Vol. 282. — P. 6899—6905.

4. Christensen C., Ambartsumian N., Gilestro G. et al. Proteolytic Processing Converts the Repelling Signal Sema3E into an Inducer of Invasive Growth and Lung Metastasis // Cancer Res. — 2005. — Vol. 65. — P. 6167—6177.

5. Connolly D.C., Katabuchi H., Cliby W.A. Cho K.R. Somatic Mutations in the STK11/LKB1 Gene Are Uncommon in Rare Gynecological Tumor Types Associated with Peutz-Jegher's Syndrome // Am. J. Pathol. — 2000. — Vol. 156. — P. 339.

6. Forster L.F., Defres S., Goudie D.R., Baty D.U., Carey F.A. An investigation of the Peutz-Jeghers gene (LKB1) in sporadic breast and colon cancers // J. Clin. Pathol. — 2000. — Vol. 53. — P. 791—793.

7. Futamura M., Kamino H., Miyamoto Y. et al. Possible Role of Semaphorin 3F, a Candidate Tumor Suppressor Gene at 3p21.3, in p53-Regulated Tumor Angiogenesis Suppression // Cancer Res. — 2007. — Vol. 67. — P. 1451—1460.

8. Futreal P.A., Coin L., Marshall M. et al. A census of human cancer genes // Nat. Rev. Cancer. — 2004. — Vol. 4(3). — P. 177—183.

9. Kuroki T., Trapasso F., Yendamuri S. et al. Allelic Loss on Chromosome 3p21.3 and Promoter Hypermethylation of Semaphorin 3B in Non-Small Cell Lung Cancer // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 3352–3355.
10. Lee J.Y., Dong S.M., Kim H.S. et al. Distinct Region of Chromosome 19p13.3 Associated with the Sporadic Form of Adenoma Malignum of the Uterine Cervix // *Cancer Res.* — 1998. — Vol. 58. — P. 1140–1143.
11. Oesterreich S., Allred D.C., Mohsin S.K. et al. High rates of loss of heterozygosity on chromosome 19p13 in human breast cancer // *Br. J. Cancer.* — 2001. — Vol. 84(4). — P. 493–498.
12. Puttagunta R., Gordon L.A., Meyer G.E. et al. Comparative Maps of Human 19p13.3 and Mouse Chromosome 10 Allow Identification of Sequences at Evolutionary Breakpoints // *Genome Res.* — 2000. — Vol. 10. — P. 1369–1380.
13. Qu X., Wei H., Zhai Y. et al. Identification, Characterization, and Functional Study of the Two Novel Human Members of the Semaphorin Gene Family // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 35574–35585.
14. Resta N., Simone C., Marenzi C., Montera M., Gentile M., et al. STK11 Mutations in Peutz-Jeghers Syndrome and Sporadic Colon Cancer // *Cancer Res.* — 1998. — Vol. 58. — P. 4799–4801.
15. Santarius T., Shipley J., Brewer D., Stratton M.R., Cooper C.S. A census of amplified and overexpressed human cancer genes // *Nat. Rev. Cancer.* — 2010. — Vol. 10(1). — P. 59–64.
16. Stratton M.R. Exploring the Genomes of Cancer Cells: Progress and Promise // *Science.* — 2011. — Vol. 331. — P. 1553–1558.
17. Tanas A.S., Shkarupov V.V., Kuznetsova E.B., Zaletayev D.V., Strelnikov V.V. Novel tools for unbiased DNA differential methylation screening // *Epigenomics.* — 2010. — Vol. 2, №2. — P. 325–333.
18. Taniwaki B.M., Nishida K., Takashima T., Nakagawa H. et al. Nonrandom Chromosomal Rearrangements of 14q32.3 and 19p13.3 and Preferential Deletion of 1p in 21 Patients With Multiple Myeloma and Plasma Cell Leukemia // *Blood.* — 1994. — Vol. 84, №7. — P. 2283–2290.
19. Wang Z.-J., Churchman M., Campbell I.G. et al. Allele loss and mutation screen at the Peutz-Jeghers (LKB1) locus (19p13.3) in sporadic ovarian tumours // *Br. J. Cancer.* — 1999. — Vol. 80(1/2). — P. 70–72.
20. Yang T.L., Su Y.R., Huang C.S., Yu J.C., Lo Y.L., Wu P.E., Shen C.Y. High-resolution 19p13.2–13.3 allelotyping of breast carcinomas demonstrates frequent loss of heterozygosity // *Genes Chromosomes Cancer.* — 2004. — Vol. 41(3). — P. 250–256.

***SEMA6B* is a candidate tumor suppressor gene in the critical chromosome region 19p13.3**

Kuznetsova E.B.^{1,2}, Pudova E.A.³, Tanas A.S.^{1,2}, Zaletayev D.V.^{1,2}, Strelnikov V.V.^{1,2}

¹ — Research Centre for Medical Genetics,

1, Moskvorechie St., Moscow, 115478, fax: (495) 324-07-02, e-mail: vstrel@list.ru

² — I.M. Sechenov 1st MSU, Russian Health Ministry,

8, Trubetskaya St., Moscow, 119991, fax: (495) 622-96-35, e-mail: vstrel@list.ru

³ — Central Research Institute of Epidemiology, Russian Inspectorate for Protection of Consumer Rights and Human Welfare

3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Tel: +7495 672 11 58 fax: +7495 304 2209

Numerous studies indicate an extremely high rate of loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 19, in the chromosomal segment 19p13.3, for different types of neoplasia: colon, cervical, breast cancers, myeloid leukemia. High rates of 19p13.3 loss of heterozygosity suggest that it contains one or more tumor suppressor genes. Our study of molecular pathology of the *SEMA6B* gene located in a critical area in breast cancer samples reveals features characteristic of the tumor suppressor gene. The frequency of abnormal methylation of the 5' region of the gene and the rate of loss of heterozygosity in breast cancer samples equal correspondingly 38% and 50%. A germinal mutation in an evolutionarily conserved region of the *SEMA6B* gene was detected in one of the breast cancer patients.

Key words: breast cancer, tumor suppressors, chromosome segment 19p13.3, semaphorin, *SEMA6B*, DNA methylation, loss of heterozygosity, mutations

Мезомелическая дисплазия с преаксиальной полидактилией Вернера, обусловленная мутацией в регуляторном элементе ZRS гена *SHH*

Федотов В.П.¹, Галеева Н.М.², Поляков А.В.²

¹ — Медико-генетическая консультация, Областная клиническая больница, Воронеж

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр»

Российской академии медицинских наук, Москва, 115478, ул. Москворечье, д.1; e-mail: dnalab@med-gen.ru

Мезомелическая дисплазия Вернера — редкое аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся сочетанием гипоплазии/аплазии большеберцовых костей с преаксиальной полидактилией и/или трёхфаланговым большим пальцем кистей. Молекулярно-генетической причиной заболевания, по данным литературы, являются мутации в положении 404 регуляторного элемента (ZRS) гена *SHH*, находящемся в гене *LMBR1*. В настоящей работе впервые в отечественной литературе приводится семейное наблюдение мезомелической дисплазии Вернера с молекулярно-генетической верификацией диагноза. У пациента с данным заболеванием впервые выявлена точковая замена в положении 403 регуляторного элемента ZRS гена *SHH*. По результатам исследования, можно предположить, что замены не только в положении 404 ZRS, но, возможно, и в окружающей области данного нуклеотида, помимо преаксиальной полидактилии и трёхфалангового большого пальца, приводят к поражению костей голени и мезомелической дисплазией Вернера.

Ключевые слова: мезомелическая дисплазия Вернера, преаксиальная полидактилия, трёхфаланговый большой палец, ZRS, *SHH*

Введение

Врождённые аномалии развития конечностей — многочисленная группа генетически гетерогенных нарушений, широко распространённых повсеместно. Среди них аномалии развития пальцев кистей и стоп представлены как разнообразными нарушениями формы (брахидактилии — 9 типов, клинодактилия), так и редукцией их числа (олигодактилии), а также сверхкомплектными пальцами (полидактилии). Известны как изолированные генетические формы преаксиальных и постаксиальных полидактилий с аутосомно-доминантным типом наследования, так и синдромальные (более 48 форм).

Одной из редких форм врождённых аномалий развития конечностей является мезомелическая дисплазия Вернера (MIM 188770), которая характеризуется сочетанием гипоплазии/аплазии большеберцовых костей с преаксиальной полидактилией и трёхфаланговым большим пальцем кистей. Первое клиническое наблюдение данного заболевания представлено в 1915 г. немецким акушером-гинекологом Р. Werner, который описал 20-летнюю беременную женщину с резким укорочением голени из-за аплазии большеберцовых костей, с шестипальными кистями рук и удвоенными трёхфаланговыми большими пальцами, с семью и восемью пальцами на стопах.

На сегодняшний день в OMIM для данного заболевания приводятся только клинические описания нескольких спорадических случаев без молекулярно-генетической верификации. Однако в 2010 г. была опубликована работа, в которой впервые обнаружены две мута-

ции у двух неродственных пациентов с диагнозом *мезомелическая дисплазия Вернера*. В своём сообщении авторы представили данные об обнаружении двух точковых замен G>A и G>C в позиции 404 регуляторного элемента ZRS гена *SHH* [11].

ZRS (zone of polarizing activity regulatory sequence) — регуляторный элемент, отвечающий за инициацию и пространственную ориентацию экспрессии гена *SHH* в зоне поляризации активности ZPA (zone of polarizing activity) развития конечностей. ZRS находится на расстоянии 1 млн п.н. от гена *SHH* в интроне 5 гена *LMBR1* и содержит 800 пар оснований, консервативных у многих организмов (от рыб до млекопитающих) [5].

В мировой литературе мутации в регуляторном элементе гена *SHH* описаны при преаксиальной полидактилии второго типа, синдактилии четвёртого типа, трёхфаланговом большом пальце первого типа, трёхфаланговом большом пальце в сочетании с синдактилией.

В данной работе впервые в отечественной литературе приводится семейное наблюдение мезомелической дисплазии Вернера с молекулярно-генетической верификацией.

Материалы и методы

У пробанда с множественными аномалиями конечностей (полидактилия кистей рук и стоп, гипоплазия обеих большеберцовых костей, дисплазия тазобедренных суставов, внутренняя косолапость) были проведены клиничко-генеалогическое, рентгенологическое исследо-

вания, включая мультисрезовую компьютерную томографию нижних конечностей.

Для молекулярно-генетического исследования использовали образцы геномной ДНК пробанда, выделение которой из лейкоцитов периферической крови выполняли с помощью набора реактивов DNA Prer100 фирмы DLatom™ по протоколу производителя. Амплификацию фрагментов ДНК проводили методом ПЦР на программируемом термоциклере MC2 фирмы «ДНК-технология» (Россия) в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 0,1–1,0 мкг геномной ДНК; 0,25 мкМ каждого оригинального олигопраймера; по 200 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата; 1,0 единица активности ДНК-полимеразы Biotaq («Био-мастер»); буфер для ПЦР (67 мМ Tris-HCl; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,01% Twin-20; pH 8,8); 20–30 мкл минерального масла; концентрация MgCl₂ 3 мМ, температура отжига праймеров 62°C, длина фрагментов 1 и 2 — 200 и 300 п.н. соответственно.

- последовательность прямого праймера 1: 5'-CCTCTGGCCAGTGTTTAAATG-3';
- последовательность обратного праймера 1: 5'-GGGGGAAAAAGTCATCTGGT-3';
- последовательность прямого праймера 2: 5'-GGTGAAGCGAAGAGTTCTG-3';
- последовательность обратного праймера 2: 5'-CAATTGGGGGATTGTAGAGG-3'.

Последовательность праймеров заимствована из работы М. Farooq с соавторами [4], синтез выполнен в ЗАО «SYNTOL».

Методом прямого автоматического секвенирования были исследованы последовательности предварительно амплифицированных фрагментов ДНК, содержащих последовательность регуляторного элемента ZRS гена *SHH*.

Анализ результатов секвенирования проводился с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Результаты

У пробанда наблюдается шестипалая правая кисть, изодактилия пальцев, агенезия тенара, семипалая левая кисть с изодактилией всех пальцев (трёхфаланговые), лучевые и локтевые кости одинаковой длины. Наблюдается полидактилия стоп (семипалые с обеих сторон). Обе большеберцовые кости резко и асимметрично укорочены и утолщены даже в сравнении с бедренными костями. Обе малоберцовые кости значительно изогнуты, «саблевидной» формы приближаются к нормальной длине. У пробанда отсутствуют надколенники и оба проксимальных сустава между мало- и большеберцовыми костями. Проксимальные отделы малоберцовых костей расположены вне коленных суставов на уровне нижней трети диафизов бедренных костей, суставные поверхности, эпифизы бедренных костей резко деформированы. У пробанда наблюдаются варусные деформации голеностопных суставов, вертикальное положение таранных костей. При рентгенографическом исследовании тазобедренных суставов выявлена дисплазия тазобедренных суставов, вальгусная деформация обеих бедренных костей (рис. 1).

В семье пробанда аналогичные аномалии развития конечностей отмечаются у матери (45 лет) также инвалида детства: патологически низкий рост, непропорциональный за счёт резкого укорочения и деформации обеих голеней. Обе кисти пятипалые с трёхфаланговыми первыми пальцами, отсутствием больших пальцев и аплазией мышц тенаров из-за отсутствия противопоставления больших пальцев остальным. Обе стопы шестипалые. Других родственников с подобными аномалиями в семье нет (рис. 2).



Рис. 1. Пациент с мезомелической дисплазией Вернера

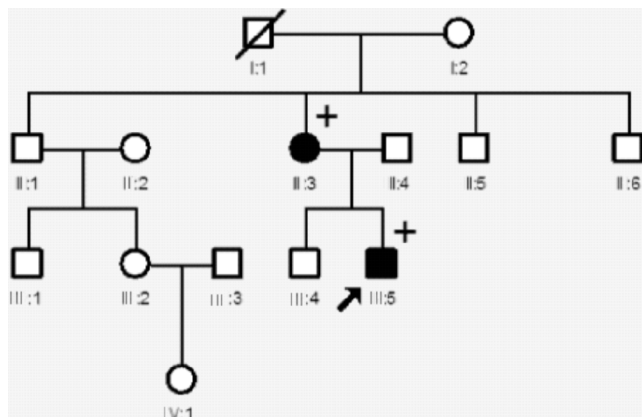


Рис. 2. Родословная семьи с мезомелической дисплазией Вернера

При исследовании ДНК пробанда в гетерозиготном состоянии выявлена точечная замена T>G в позиции 403 регуляторного элемента ZRS гена *SHH*, находящегося в гене *LMBR1*: CATAAAAGTGACCTTGTAC (T>G) GTATTTTATGACCAGATGACTTT (рис. 3). Название мутации присвоено по аналогии с работой М. Farooq с соавторами [4]. При исследовании ДНК 150 здоровых индивидов данная замена обнаружена не была.

Обсуждение

На сегодняшний день описано около 30 мутаций в регуляторном элементе ZRS гена *SHH*, находящемся в гене *LMBR1*. Точечные мутации в гетерозиготном состоянии выявлены у больных с полидактилией и у больных с полидактилией в сочетании с трёхфаланговым большим пальцем. Описан пациент с заменой в ZRS в гомозиготном состоянии, фенотип которого не отличался от фенотипа его родственников, являющихся гетерозиготными носителями данной мутации [9]. Дупликации регуляторного элемента гена *SHH* встречаются при комбинированном фенотипе аномалий пальцев кистей и стоп [10], при полисиндактилии рук (type Naas) и при синдактилии четвёртого типа в сочетании с гипоплазией большой берцовой кости [12]. Также в семье с преаксиальной полидактилией второго типа в регуляторном элементе ZRS описана инсерция 13 букв [7].

При мезомелической дисплазии Вернера на сегодняшний день в четырёх неродственных семьях выявлены две точечные замены G>A и G>C в позиции 404 регуляторного элемента гена *SHH* [3, 11]. Первоначально мутация 404G>A была описана у больного с преаксиальной полидактилией [8]. Однако D. Wiczorek с соавторами считают, что диагноз преаксиальная полидактилия в данном случае был поставлен ошибочно, так как у больного имело место поражение большой берцовой кости. Интересно отметить, что у пациентов с одинаковой мутацией и даже у пациентов из одной семьи может на-

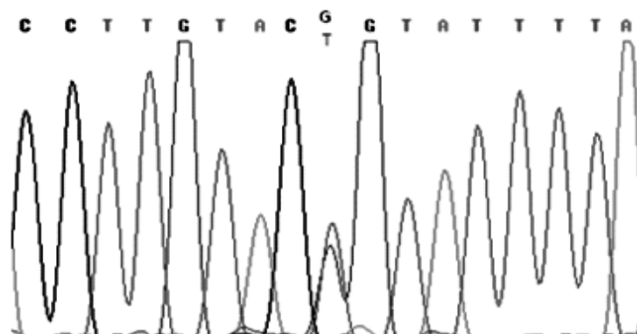


Рис. 3. Фрагмент результатов автоматического секвенирования регуляторного элемента ZRS гена *SHH*

блюдаться разная степень поражения костей голени. Так в одной семье у пациентов в первом поколении отмечается лишь двусторонняя преаксиальная полидактилия рук, во втором — преаксиальная полидактилия рук в сочетании с резким укорочением голени, в третьем — синдактилия рук в сочетании с аплазией большой и малой берцовой кости [11].

В нашем случае у пациента с мезомелической дисплазией Вернера была выявлена замена T>G в консервативной позиции 403 регуляторного элемента ZRS гена *SHH*, находящегося в гене *LMBR1*. Другие точечные замены в этой области (в положениях 105, 295, 297, 305, 329, 334, 463, 619, 621, 739) были выявлены у больных с преаксиальной полидактилией или у больных с преаксиальной полидактилией в сочетании с трёхфаланговым большим пальцем без поражения костей голени [1, 2, 4—6, 8, 9]. Таким образом, до настоящего времени существовало предположение, что молекулярно-генетической причиной мезомелической дисплазии Вернера является именно замена в положении 404 ZRS [11]. По результатам данного исследования, можно предположить, что замены не только в положении 404 ZRS, но возможно и в окружающей области данного нуклеотида, помимо преаксиальной полидактилии и трёхфалангового большого пальца, приводят к поражению костей голени и мезомелической дисплазией Вернера.

Список литературы

1. Albuissou J., Isidor B., Giraud M., Pichon O. et al. Identification of two novel mutations in Shh long-range regulator associated with familial pre-axial polydactyly // Clin. Genet. — 2011. — №79. — P. 371—377.
2. Al-Qattan M., Abdulkareem I., Haidan Y. and Balwi M. A Novel Mutation in the SHH Long-Range Regulator (ZRS) Is Associated With Preaxial Polydactyly, Triphalangeal Thumb, and Severe Radial Ray Deficiency // American Journal Of Medical Genetics. — 2012. — Part A. — P. 1—6.

3. Cho T.J., Baek G.H., Lee H.R., Moon H.J., Yoo W.J., Choi I.H. Tibial hemimelia-polydactyly-five-fingered hand syndrome associated with a 404 G>A mutation in a distant sonic hedgehog cis-regulator (ZRS): a case report // J. Pediatr. Orthop. B. — 2012.
4. Farooq M., Troelsen J., Boyd M., Eiberg H. et al. Preaxial polydactyly/triphalangeal thumb is associated with changed transcription factor-binding affinity in a family with a novel point mutation in the long-range cis-regulatory element ZRS // European Journal of Human Genetics. — 2010. — 18. — P. 733–736.
5. Furniss D., Lettice L., Taylor I., Critchley P., Giele H. et al. A variant in the sonic hedgehog regulatory sequence (ZRS) is associated with triphalangeal thumb and deregulates expression in the developing limb // Human Molecular Genetics. — 2008. — Vol. 17, №16. — P. 2417–2423.
6. Gurnett C., Bowcock A., Dietz F., Morcuende J. et al. Two Novel Point Mutations in the Long-Range SHH Enhancer in Three Families With Triphalangeal Thumb and Preaxial Polydactyly // American Journal of Medical Genetics. — 2007. — Part A. 143. — P. 27–32.
7. Laurell T., Mee J., Wenger A., Grigelioniene G. A Novel 13 Base Pair Insertion in the Sonic Hedgehog ZRS Limb Enhancer (ZRS/LMBR1) Causes Preaxial Polydactyly with Triphalangeal Thumb // Human Mutation. — 2012. — Vol. 00, №0. — P. 1–4.
8. Lettice L., Heaney S., Purdie L., Li L., Beer P. et al. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly // Human Molecular Genetics. — 2003. — Vol. 12, №14.
9. Semerci C., Demirkan F., Ozdemir M., Biskin E. et al. Homozygous feature of isolated triphalangeal thumb-preaxial polydactyly linked to 7q36: no phenotypic difference between homozygotes and heterozygotes // Clin. Genet. — 2009. — №76. — P. 85–90.
10. Sun M., Ma F., Zeng X., Liu Q., Zhao X. et al. Triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome and syndactyly type IV are caused by genomic duplications involving the long range, limb specific SHH enhancer // J. Med. Genet. — 2008. — №45. — P. 589–595.
11. Wiczorek D., Pawlik B., Li Y., Akarsu N. et al. A Specific Mutation in the Distant Sonic Hedgehog (SHH) Cis-Regulator (ZRS) Causes Werner Mesomelic Syndrome (WMS) While Complete ZRS Duplications Underlie Haas Type Polysyndactyly and Preaxial Polydactyly (PPD) With or Without Triphalangeal Thumb // Human Mutation. — 2010. — Vol. 31, №1. — P. 81–89.
12. Wu L., Liang D., Niikawa N., Ma F., Sun M. et al. A ZRS Duplication Causes Syndactyly Type IV With Tibial Hypoplasia // American Journal Of Medical Genetics. — 2009. — Part A. — P. 816–818.

Werner mesomelic syndrome with preaxial polydactyly, induced by mutation in zone of polarizing activity regulatory sequence (ZRS) of gene *SHH*

Fedotov V.P.¹, Galeeva N.M.², Polyakov A.V.²

¹ — Regional Clinical Hospital, Genetic counseling, Voronezh, Russian Federation

² — Research Centre for Medical Genetics, 115478, Moscow, ul. Moskvorechye, 1, Russian Federation; e-mail: dnalab@med-gen.ru

Werner mesomelic syndrome is an autosomal dominant disorder characterized by hypo- or aplasia of the tibiae in addition to the preaxial polydactyly (PPD) and/or triphalangeal thumb. To date molecular-genetic cause of disease is mutations at position 404 of the zone of polarizing activity regulatory sequence (ZRS), a long-range limb-specific enhancer of the sonic hedgehog (*SHH*) gene, which situated in *LMBR1* gene. This article reports about first family with Werner mesomelic syndrome with molecular confirmation in Russia. New mutation in patient at position 403 within the ZRS region was detected. These data suggest that transitions not only at position 404 within the ZRS region lead to a more severe clinical phenotype with the affection of tibial development.

Key words: Werner mesomelic syndrome, preaxial polydactyly, triphalangeal thumb, ZRS, *SHH* gene