

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

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

КУЧИНСКАС В. (Kucinskas V.)
академик Литовской АН, д.б.н., профессор
ЛИМБОРСКАЯ С.А.
д.б.н., профессор
МАЦЕК М. (Macek M. Jr.)
доктор медицины и педиатрии (MD),
доктор философии по медицине и молекуляр-
ной генетике (PhD), профессор
МИХАЙЛОВА Л.К.
д.м.н., профессор
НАЗАРЕНКО Л.П.
д.м.н., профессор
НОВИКОВ П.В.
д.м.н., профессор
НОСИКОВ В.В.
д.б.н., профессор
РОГАЕВ Е.И.
д.б.н., профессор
РУБЦОВ Н.Б.
д.б.н., профессор
СВЕРДЛОВ Е.Д.
академик РАН, д.б.н., профессор
СЕРЕДЕНИН С.Б.
академик РАН, д.м.н., профессор
СМИРНОВ В.Н.
академик РАН, д.м.н., профессор
СТЕПАНОВ В.А.
д.б.н., профессор
ХУСНУТДИНОВА Э.К.
д.б.н., профессор
ЧЕХОНИН В.П.
академик РАН, д.б.н., профессор
ЧУЧАЛИН А.Г.
академик РАН, д.м.н., профессор

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

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

Вниманию авторов и читателей:
Рукописи и иллюстрации не возвращаются. При
перепечатке материалов согласование с редак-
цией журнала «Медицинская генетика» обязатель-
но. За содержание рекламных публикаций ответст-
венность несет рекламодатель.

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

Тираж 200 экз.

Медицинская ГЕНЕТИКА

Ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал

2014 г. Том 13. №9 (147)

СОДЕРЖАНИЕ

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

- Апанович Н.В., Апанович П.В., Карпухин А.В.**
Молекулярно-генетические характеристики
в комбинации с флуоресцентной гибридизацией *in situ*
и маркёры почечно-клеточной карциномы.....3
- Никитина В.А., Жанатаев А.К., Чаушева А.И., Куцев С.И.**
Применение метода гель-электрофореза отдельных клеток
в комбинации с флуоресцентной гибридизацией *in situ*
для прицельной оценки ДНК-повреждений.....11

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Тюрин А.В., Хусаинова Р.И., Хуснутдинова Н.Н.,
Давлетшин Р.А., Хуснутдинова Э.К.**
Поиск ассоциаций полиморфных вариантов
гена рецептора витамина D (*VDR*)
с остеоартритом и дисплазией соединительной ткани18
- Бабушкина Н.П., Кучер А.Н., Буйкин С.В., Голубенко М.В.,
Макеева О.А., Шипулин В.М., Пузырев В.П.**
Роль полиморфных вариантов
генов ядерного и митохондриального геномов в детерминации
эндофенотипов ишемической болезни сердца28
- Хидиятова И.И., Азнабаев М.Т., Хидиятова И.М.,
Авхадеева С.Р., Джемилева Л.У., Зинченко Р.А., Хуснутдинова Э.К.**
Анализ гена коннексина 50 (*GJA8*)
у больных с наследственной врождённой катарактой
из Республики Башкортостан37
- Джамбетова П.М., Сычева Л.П., Абилов С.К., Солтаева А.М.-Х.**
Комплексное исследование влияния нефтезагрязнения
на генетическое здоровье детей42

ИНФОРМАЦИЯ

- Правила оформления статей
в журнале «Медицинская генетика».....47

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

Executive editor
IZHEVSKAYA V.L.

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

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

Medical GENETICS

Monthly reviewed scientific and practical journal

2014. Volume 13. №9 (147)

Content

REVIEWS

Apanovich N.V., Apanovich P.V., Karpukhin A.V.

The molecular-genetic features and markers
of renal cell carcinoma 3

Nikitina V.A., Zhanataev A.K., Chausheva A.I., Kucev S.I.

Combination of methods of gel-electrophoresis for individual cells (comet assay)
and fluorescence hybridization *in situ* (FISH)
for evaluation of DNA damage..... 11

ARTICLES

**Tyurin A.V., Khusainova R.I., Khusnutdinova N.N.,
Davletshin R.A., Khusnutdinova E.K.**

Search for associations of polymorphisms
in the vitamin D receptor gene (*VDR*)
with osteoarthritis and connective tissue dysplasia 18

**Babushkina N.P., Kucher A.N., Buikin S.V.,
Golubenkov M.V., Makeeva O.A., Shipulin V.M., Puzyrev V.P.**

Role of polymorphic variants of the genes
of nuclear and mitochondrial genomes in determining
ischemic heart disease endophenotypes..... 28

**Khidiyatova I.I., Aznabaev M.T., Khidiyatova I.M.,
Avkhadeeva S.R., Dzhemileva L.U., Zinchenko R.A., Khusnutdinova E.K.**

The analysis of the *GJA8* gene
in patients with hereditary congenital cataract
from Bashkortostan Republic 37

Dzhambetova P.M., Sycheva L.P., Abilev S.K., Soltaeva A.M.-H.

Comprehensive study of the impact of oil pollution
on the genetic health of children 42

INFORMATION

Guidelines for Authors 47

Молекулярно-генетические характеристики и маркёры почечно-клеточной карциномы

Апанович Н.В., Апанович П.В., Карпухин А.В.

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

В России по темпам прироста почечно-клеточный рак (ПКР) занимает одно из первых мест. Примерно у трети больных к моменту постановки диагноза выявляются отдалённые метастазы, и у 30—40% возникает рецидив болезни. Наиболее распространённым и агрессивным среди гистологических типов рака этой локализации является светлоклеточный рак почки (скПКР), составляющий 70—80% всех случаев. Как правило, заболевание выявляют случайно при плановом обследовании. Актуально выявление скПКР на ранней стадии, когда условия для его лечения наиболее благоприятны. Это обуславливает необходимость разработки новых, более надёжных, быстрых и доступных для пациентов методов ранней диагностики скПКР и прогностических маркёров. Выявление и изучение генов, тесно связанных с развитием скПКР, может внести существенный вклад в понимание процессов, происходящих в опухоли, и персонализацию его лечения. В данном обзоре рассмотрены молекулярно-генетические характеристики наиболее частых гистологических типов рака почки, описаны основные известные генетические и экспрессионные маркёры, а также современные подходы к выявлению новых транскрипционных маркёров.

Ключевые слова: рак почки, молекулярная генетика, диагностические и прогностические маркёры

Введение

Рак почки (РП) занимает 3-е место по заболеваемости среди злокачественных новообразований мочеполовой системы после опухолей предстательной железы и мочевого пузыря. Ежегодно в мире выявляют более 200 тыс. новых случаев ПКР. В России в 2011 г. выявлено 19 116 больных со злокачественными новообразованиями почки. В 2010 г. от ПКР умерли 8526 чел. По темпам прироста онкологической заболеваемости в России ПКР устойчиво занимает одно из первых мест (40,85%). Стандартизированные показатели заболеваемости и смертности населения от РП в России составили 8,78 и 3,68 на 100 тыс. населения соответственно [4].

Увеличение заболеваемости некоторые авторы связывают с расширением возможностей современных методов обследования, которые позволяют выявить ранние, бессимптомные формы рака. Однако у 10—30% пациентов с впервые выявленным раком определяются отдалённые метастазы. Почти у 50% больных с локализованным раком в течение первого года после операции появляются отдалённые метастазы [2].

При наличии небольшого локализованного очага рака в почке можно обойтись хирургическим вмешательством, при этом в 95% случаев можно ожидать 5—10-летнюю выживаемость. Однако, если у пациента поздняя стадия РП, при которой первичная опухоль распространилась на другие органы, смертность составляет почти 80% в течение 24 мес. [32].

Примерно у трети пациентов после резекции почки или нефрэктомии возникает рецидив заболевания и наступает смерть от этой болезни. Точное определение риска рецидива после нефрэктомии является существенным вопросом для пациентов и врачей. Это позволило бы персонализировать последующее лечение [1].

В настоящей работе рассмотрены данные по анализу генетических (мутации и однонуклеотидные полиморфизмы) и экспрессионных маркёров, направленных на диагностику и стратификацию пациентов при скПКР.

Гистологические типы рака почки.

Наследственные формы

РП — это не одно заболевание; скорее, это ряд гистологически и генетически различных видов рака, каждый из которых имеет разное клиническое течение и разный ответ на терапию [1]. В настоящее время выделяют четыре основных гистологических варианта ПКР: светлоклеточный (скПКР), 1-й и 2-й типы папиллярного и хромофобный.

Наиболее частым и агрессивным из гистологических подтипов является скПКР, на его долю приходится 70—80% от всех типов почечно-клеточного рака. Светлоклеточный РП развивается из эпителия проксимальных канальцев. Благодаря наличию гликогена в опухоли при окраске гематоксилин-эозином клетки приобретают светлую окраску. Характер роста скПКР преимущественно солидный или кистозный, а также может быть трабекулярным, тубулярным и частично папиллярным. Для скПКР характерно богатое кровоснабжение опухоли.

Папиллярный рак почки составляет 10—15% от всех типов ПКР, он чаще бывает мультифокальным и двусторонним. В 8 раз чаще встречается у мужчин, чем у женщин. Папиллярный РП классифицируется на 2 подтипа. Первый тип состоит преимущественно из базофильных клеток, в то время как второй тип содержит в основном эозинофильные клетки.

Хромобобный рак составляет 3–5% от всех типов ПКР. Клетки окрашиваются преимущественно хромо- фобно, а содержащиеся в цитоплазме гранулы — эози- нофильно. Таким образом, цитоплазматическое окра- шивание зависит от количества типичных для хромо- фобного ПКР везикул — большое количество гранул приводит к хромофобному цвету цитоплазмы [51].

Менее 1% составляет рак собирательных трубочек (Беллини). Медуллярный РП считается подтипом кар- циномы собирательных трубочек. Менее 3% ПКР ха- рактеризуются как неизвестные по гистологическим особенностям, и они называются неклассифицирован- ными или недифференцированными.

Среди доброкачественных опухолей почки чаще все- го встречаются аденома, онкоцитомы и ангиомиолипома почки [51].

При исследовании наследственных форм РП был выявлены некоторые гены, важные для этого заболева- ния. Существует набор различных видов семейного рака почки.

Синдром фон Хиппель-Линдау (VHL) — наследствен- ное заболевание, характеризующееся чрезмерным рос- том капилляров и возникновением доброкачественных и злокачественных новообразований во многих органах. По фенотипическим проявлениям синдром VHL подразделяется на 2 типа:

- Тип 1: ангиомы (сосудистые опухоли) сетчатки, ге- мангиобластомы центральной нервной системы (ЦНС) и новообразования почек (ПКР);
- Тип 2А: ангиомы сетчатки, гемангиобластомы ЦНС, феохромоцитомы;
- Тип 2В: гемангиобластомы ЦНС, ангиомы сетчатки, феохромоцитомы, ПКР, доброкачественные и злокаче- ственные опухоли поджелудочной железы, а также кисты;
- Тип 2С: только феохромоцитомы.

При синдроме VHL почечно-клеточная карцинома у 35–40% пациентов возникает в более молодом возра- сте и часто бывает двусторонней (75%) или мультифо- кальной (87%). Как правило, ПКР возникает при син- дrome VHL, протекающем по типу 1 или 2В. При син- дrome VHL гистологический тип ПКР — светлоклеточ- ный [34].

Врождённая транслокация хромосомы 3p — у многих пациентов с наследственной формой РП обнаруживает- ся даже при рутинном цитогенетическом исследовании. Подобные пациенты выделяются в отдельную группу, так как у них ген *VHL* сохраняет интактную структуру и не наблюдается «внепочечных» проявлений синдрома VHL [34].

Наследственная папиллярная карцинома почки (HPRC) — семейная форма типа 1 папиллярного ПКР, вызывается герминальными мутациями онкогена *MET*. В 5–13% спо- радического папиллярного ПКР обнаруживаются сомати- ческие мутации гена *MET*. *MET* — онкоген, вовлечённый в процессы, регулирующие подвижность, пролиферацию, ангиогенез и выживаемость клеток [17].

Наследственный лейомиоматоз и почечно-клеточная карцинома (HLRCC). При этом заболевании возникают герминальные мутации гена, кодирующего фермент цикла Кребса фумарат гидратазу (*FH*). Пациенты с на- следственным лейомиоматозом и ПКР имеют склон- ность к развитию кожных лейомиом, а также РП, кото- рый чаще всего представлен папиллярными карцинома- ми 2-го типа.

Синдром Берта—Хогга—Дьюба (BHD). Обусловлен герминальными мутациями в гене фолликулина (*FLCN*). Для этого синдрома характерно развитие фиб- рофолликулом, кист в лёгких и повышенный риск воз- никновения РП. Микроскопически ПКР при синдроме BHD — чаще всего гибрид хромофобного типа с онко- цитомой или хромофобный РП [17].

Наследственная параганглиома. При этом заболева- нии находят герминальные мутации в субъединице В ге- на сукцинатдегидрогеназы, (*SDHB*). Заболевание прояв- ляется развитием параганглиом и феохромоцитом, а также хромофобного ПКР или онкоцитомами [17].

Клинические наблюдения показывают, что встреча- ются и другие семейные опухоли почки, и эта тема явля- ется областью повышенного внимания генетиков. Ме- нее значительное увеличение риска развития РП отме- чается у пациентов с туберозным склерозом и синдро- мом Коудена.

Молекулярные основы развития светлоклеточного рака почки

Инактивация гена *VHL* является ключевым событи- ем как для спорадических случаев (более 90% случаев), так и при наследственной форме скПКР [17]. При скПКР инактивация второго аллеля *VHL* обусловлена крупными делециями, гиперметилированием промото- рной области или точковыми мутациями. Ген *VHL* явля- ется геном-супрессором опухолевого роста, контроли- рующим уровень транскрипционных факторов HIFs: HIF-1 α , HIF-2 α . Продукт гена *VHL* (pVHL) входит в со- став E3 убиквитин-лигазного комплекса, который в условиях нормальной оксигенации способствует при- соединению убиквитина к гидроксированным транс- крипционным факторам HIFs, способствуя их разруше- нию по протеасомному пути. В условиях гипоксии ком- плекс VHL не связывается с негидроксированными транскрипционными факторами HIFs, приводя к их на- коплению в клетках. Накопление HIFs происходит и при отсутствии pVHL в клетках. При перемещении HIF- α в ядро он образует активный транскрипционный комплекс с HIF- β , который, в свою очередь, вызывает гиперэкспрессию ряда генов, связанных с гипоксией, например фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF*), тромбоцитарного фактора роста β (*PDGF β*), трансфор- мирующего фактора роста (*TGF α*)), рецептора эпидер- мального фактора роста 1-го типа (*EGFR*). Таким обра- зом, мутации в гене *VHL* приводят к потере соответству-

ющего белка, нарушению деградации и накоплению факторов, стимулирующих ангиогенез, пролиферацию клеток и усиление роста опухолей [10].

Протеинкиназа В (АКТ) и мишень рапамицина млекопитающих (mTOR) играют центральную роль в онкогенных процессах, включающих клеточную пролиферацию, выживание и ангиогенез. В результате связывания факторов роста VEGF и PDGF с их тирозинкиназными рецепторами на поверхности клетки (VEGFR, PDGFR, KIT) и каскадной стимуляции сигнального пути PI3K (фосфоинозитид-3-киназа) - АКТ - mTOR происходит активация белка mTOR; mTOR является внутриклеточной серин/треонин киназой, которая входит в состав двух различных комплексов: TORC1 и TORC2. Комплекс TORC1 фосфорилирует ключевые регуляторы трансляции mPDK — 4EBP1 и S6K1-киназы, которые, в свою очередь, служат стимулом для синтеза множества белковых продуктов, регулирующих клеточный цикл (циклин D1, cMYC), ангиогенез (HIF1,2a) и потребление клеткой аминокислот. Рапамицин и его аналоги подавляют активность только комплекса mTORC1, не оказывая влияния на mTORC2. Комплекс TORC2 контролирует клеточную полярность и пространственный рост. Активность mTOR регулируется различными факторами роста, наличием молекул питательных веществ и АКТ, который, в свою очередь, также активируется mTOR [10, 19]. Альтернативным путём активации mTOR служит цепь внутриклеточной передачи сигнала RAS/MAPK. Дезактивация mTOR наблюдается при мутациях или гипоекспрессии гена опухолевого супрессора PTEN, который блокирует передачу сигнала между PI3K и АКТ, а также в результате образования комплекса TSC1/TSC2 (комплексы туберозного склероза) [10].

Прогностические маркёры при раке почки

Прогностические системы и номограммы

В настоящее время в прогностических целях используются наборы клинических характеристик. Для повышения точности прогноза и классифицирования пациентов к группам риска путём объединения ранее известных прогностических факторов были разработаны несколько алгоритмов, называемых *номограммами*. Наиболее часто используемыми прогностическими моделями в локализованном ПКР являются UISS (University of California Los Angeles Integrated Staging System), которые включают в себя как клинические, так и патологические параметры, а также оценку SSIGN (клиническая стадия Майо, размер, стадия развития и некроз). Точность этих номограмм около 80%, что превосходит только классификацию TNM. Для оценки вероятности 5-летней безрецидивной выживаемости после нефрэктомии была разработана номограмма Каттана, и после её обновления в 2005 г. точность прогноза составляет около 80% [50]. В новую прогностическую модель по Karakiewicz с соавторами были включены клинические и патологи-

ческие переменные в сочетании с алгоритмом, обеспечивающим прогностическую точность более 80% [25].

Наиболее широко используемым прогностическим инструментом для ПКР является MSKCC (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center), использующие сочетание клинических параметров, включая общее состояние, результатов лабораторных обследований, время от постановки диагноза до начала системной терапии, а также количество и расположение метастазов, для стратификации пациентов по различным категориям риска. В последнее время разрабатываются новые прогностические модели, а старые обновляются для предсказания результатов лечения пациентов при таргетной терапии [50, 52].

Добавление в номограммы к классическим переменным набора молекулярных маркёров может значительно улучшить точность прогноза.

Поиск молекулярных маркёров

Биомаркёры объективно измеряют и оценивают показатели биологических или патологических процессов, или ответ на терапию. Биомаркёры рака, как правило, производятся опухолью или органом в ответ на опухоль. Прогностические биомаркёры используются для категоризации пациентов в разных группах риска и позволяют прогнозировать развитие болезни. Идеальный прогностический биомаркёр даёт информацию, которая не предоставляется клинико-патологическими показателями.

Критериями прогностических биомаркёров являются статистическая значимость, воспроизводимость, стандартизация и реализуемость в ежедневной клинической практике, а также разумная стоимость [43].

В поисках молекулярных маркёров был исследован широкий набор генов, связанных, преимущественно, с известными механизмами развития ПКР. Ниже изложены полученные при этом результаты.

Ген VHL был идентифицирован как супрессор опухолевого роста (см. рисунок на 2-й странице обложки). Аберрации в гене VHL (мутации или гиперметилирование) свидетельствуют о высокой вероятности возникновения скПКР. В настоящее время предполагается, что регулирование ангиогенеза и характер прогрессирования скПКР не напрямую зависят от мутаций в гене VHL, но потеря функции VHL непосредственно влияет на возникновение и развитие РП [46]. Среди пациентов с метастатическим почечно-клеточным раком (мПКР) у 60% была выявлена мутация в гене VHL, и у 48% из этих пациентов был более успешный ответ на таргетную терапию по сравнению с 35% пациентов без мутаций или метилирования в гене VHL [41]. Аналогичные выводы были получены ещё в одной работе [11], где положительный ответ на терапию дали 52% пациентов с инактивированным геном VHL по сравнению с 31% с диким типом VHL. Возможно, дополнительные исследования в контексте таргетной терапии имеют некоторые перспективы. Однако эффекты, наблюдаемые в уже проведённых работах, невелики.

Белок HIF- α накапливается в условиях гипоксии клетки или при недостатке продукта гена *VHL* (см. рисунок на 2-й странице обложки). При скПКР экспрессия *HIF-1 α* более высокая по сравнению с папиллярным и хромофобным ПКР [30]. Данные о связи выживаемости пациентов с высоким и низким уровнем экспрессии HIF-1 α противоречивы [26, 31]. Более благоприятный ответ на терапию сунитинибом показан у пациентов с высоким уровнем HIF-1 α ($p = 0,003$) или HIF-2 α ($p = 0,001$) [39].

При скПКР находили корреляцию экспрессии гена *VEGF* с размером опухоли, некрозом опухоли, стадией опухоли, скоростью прогрессирования ПКР [42]. Повышение сывороточного уровня белка VEGF было связано с низкой выживаемостью [40]. Найдена коэкспрессия лиганда VEGF и рецепторов VEGF (VEGF-R1, -R2, -R3) в опухолевой ткани, эндотелиальной и нормальной прилежащей ткани почек. В опухолевых клетках экспрессия VEGF-R1 и VEGF-R2 обратно пропорциональна площади сосудов. При повышенной экспрессии в опухолевых клетках генов *VEGF* и *VEGF-R* выявлена плохая выживаемость больных [27]. Экспрессия гена *VEGF* коррелировала со стадией и общей выживаемостью также ещё в одной работе. У пациентов с высокой экспрессией гена *VEGF* наблюдалась более низкая выживаемость [35].

Ген *CA9* (карбоксиангидраза IX) участвует в регулировании внутриклеточных и внеклеточных уровней pH в ответ на гипоксический стресс, который присутствует в 94% случаев скПКР, но отсутствует в большинстве нормальных тканей [9]. Также ген *CA9* принимает участие в процессах клеточной пролиферации, канцерогенеза и опухолевой прогрессии. В исследовании М. Такасова с соавторами изучены уровни экспрессии *CA9* в крови и ткани у 74 больных РП с использованием обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в реальном времени (РТ-ПЦР), иммуноферментного анализа (ИФА), вестерн-блоттинга (ВБ) и иммуногистохимии (ИГХ). Уровень экспрессии гена *CA9* коррелировал с типом и стадией ПКР. Показана значительно более высокая экспрессия *CA9* в образцах скПКР по сравнению с другими ПКР. Уровень сывороточного белка CA9, определяемого методом иммуноферментного анализа, был значительно выше у пациентов с скПКР, чем с не-скПКР [47]. В другом исследовании [44] экспрессия *CA9* была значительно выше среди 183 образцов скПКР по сравнению с экспрессией в образцах папиллярного ПКР и хромофобного ПКР. Не было корреляции между уровнем экспрессии *CA9* и стадией TNM. Для оценки прогностической роли гена *CA9* образцы скПКР разделили на 3 группы в соответствии с уровнем экспрессии *CA9* (0—10%, 11—90% и 91—100% соответственно). Менее благоприятный прогноз был среди больных с 0—10% экспрессии, чем с 11—90% и 91—100% ($p = 0,012$ и $0,001$) соответственно. Е.М. Genega с соавторами иммуногистохимически исследовали уровень белка CA9 в 317 первичных и 42 метастатических образцах ПКР. Во всех случаях была найдена связь между высоким уровнем белка CA9 и скПКР по сравнению с не-скПКР [16].

Гены *MMP* — семейство, кодирующее внеклеточные цинкзависимые эндопептидазы. Металлопротеиназы *MMP2* и *MMP9* часто экспрессируются в злокачественных опухолях человека. Они, как известно, облегчают экспансию опухоли и обеспечивают метастазирование посредством деградации базальной мембраны и соединительно-тканых барьеров. Ген *MMP-9* в основном экспрессируется в стромальных клетках опухоли и не экспрессируется в незлокачественных сосудисто-волоконистых участках. Экспрессия генов *MMP-2* и *MMP-9*, исследованная методом ПЦР-РВ, в образцах ПКР была значительно выше, чем в нормальной почечной ткани. Данные по экспрессии генов *MMP-2* и *MMP-9* не показали корреляцию с типом опухоли или степенью развития ПКР [57]. Экспрессия *MMP-9* значительно отличалась при наличии или отсутствии метастазов в лимфатических узлах [56].

Было установлено, что почечно-клеточная карцинома индуцирует апоптоз Т-клеток и, тем самым, способствует развитию опухоли, подавляя противоопухолевый иммунитет. Белки семейства B7 являются лигандами, взаимодействующими с рецепторами лимфоцитов, которые регулируют иммунный ответ. Это осуществляется, в частности, посредством экспрессии белка **B7-H1**, который подавляет иммунный ответ, действуя в качестве лиганда для рецептора запрограммированной смерти-1 (PD-1) и доставки ингибирующего сигнала Т-клеткам [48]. В клеточных супернатантах некоторых B7-H1-позитивных линий опухолевых клеток был обнаружен сывороточный B7-H1 (сB7-H1). При помощи белкового секвенирования установили, что сB7-H1 сохранил свой рецепторсвязывающий домен и может доставить проапоптотический сигнал Т-клеткам. Более высокий до операционной уровень сB7-H1 был связан с крупными опухолями, опухолями поздней стадии и высокой степенью анаплазии. Удвоение уровня сB7-H1 было связано с 41%-ным увеличением риска смерти. Таким образом, B7-H1 присутствует в сыворотке крови больных с скПКР и сB7-H1 может системно ухудшить иммунитет, тем самым способствуя прогрессированию рака и последующему плохому клиническому исходу [20]. Повышение экспрессии *B7-H3* в опухолевых клетках или опухолевых сосудах было отмечено в 17% и 95% образцов соответственно. Повышение экспрессии *B7-H3* наблюдали в 46% образцов, и оно было связано с несколькими неблагоприятными клиническими и патологическими признаками, а также с повышенным риском смерти от РП (относительный риск 1,38, 95%-ный доверительный интервал, 1,03—1,84) [13].

Избыточная экспрессия рецептора хемокинов, ***CXCR4***, связана с плохим прогнозом при ПКР. При многофакторном анализе повышенная экспрессия гена *CXCR4* коррелировала с более короткой общей выживаемостью и безрецидивной выживаемостью независимо от пола, возраста, стадии, состояния лимфатических узлов, метастазов, гистологического типа и степе-

ни злокачественности по Фурману [33]. Экспрессия *CXCR4* отсутствовала или была снижена у 48,4%, была умеренной у 27,4% и была повышенной в 24,2% опухолей соответственно. Снижение или отсутствие экспрессии *CXCR4* предсказывало позитивный ответ на терапию сунитинибом. Кроме того, совокупные значения *CXCR4* и степени злокачественности по Фурману предсказывали ответ при первой линии терапии сунитинибом на выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость [14].

Сурвивин (IAP5) — ген антиапоптотического белка, который осуществляет свою функцию путём ингибирования процессинга прокаспаз и экспрессируется во всех гистологических подтипах ПКР. Дисрегуляция экспрессии сурвивина может способствовать развитию рака, поддерживая жизнеспособность опухолевых клеток и облегчая их сопротивление химио- и лучевой терапии [5]. Повышенная экспрессия мРНК сурвивина и соответствующего белка была показана в клетках ПКР, но отсутствовала в клеточной линии нормального почечного эпителия человека. Уровень экспрессии мРНК сурвивина в ткани ПКР был значительно выше, чем в соответствующей неопухолевой ткани почек. Найдена значимая корреляция экспрессии белка сурвивина с патологической стадией опухоли и метастазами в лимфатические узлы. Кроме того, у пациентов с высоким уровнем сурвивина более короткое время общей выживаемости, чем у пациентов с низким уровнем ($p < 0,001$) [5, 28]. Экспрессия сурвивина была связана с низкой степенью дифференцировки и более агрессивным скПКР [5]. Повышенная экспрессия сурвивина найдена у 97 пациентов из 312 при скПКР (31,1%). У пациентов с высоким уровнем экспрессии сурвивина пятикратно увеличен риск смерти от РП, по сравнению с пациентами с низким уровнем экспрессии. Специфическая 5-летняя выживаемость составила 43,0% среди пациентов с повышенной экспрессией сурвивина и 87,2% среди пациентов с низкой экспрессией сурвивина [38].

В недавнем исследовании иммуногистохимическими методами экспрессии гена *Ki67* в 401 образце скПКР аномальная экспрессия *Ki67* составила 6,5%. Среди пациентов с высокой экспрессией *Ki67* 5-летняя безрецидивная выживаемость (DFS) и ракспецифическая выживаемость (CSS) составили 67 и 84% против 87 и 95% соответственно, у больных с нормальным уровнем экспрессии этого гена. При многофакторном анализе аномальная экспрессия *Ki67* оказалась независимым фактором прогноза DFS, но не CSS [7]. При исследовании коэкспрессии генов *Trp53* и *Ki-67* при скПКР их взаимосвязь более часто встречалась у пациентов с первичными метастазами, чем у пациентов с поздними метастазами, и не наблюдалась при отсутствии метастазов. В группе с первичными и поздними метастазами экспрессия *p53* и *Ki-67* была связана со снижением выживаемости [36].

В целом, накопленные к настоящему времени данные характеризуются зачастую противоречивостью и

неполнотой. Некоторые из изученных биомаркёров могут быть рассмотрены в качестве перспективных в прогностических целях. Например, СА9, сурвивин, *Ki-67*, *B7-H1*, но их клиническое значение все ещё находится под вопросом в связи с отсутствием независимой и проспективной проверки [18].

Уровень экспрессии потенциального онкомаркёра *TuM2-РК* различается при скПКР у здоровых людей, но не различается у больных скПКР с доброкачественной опухолью почки [37]. К тому же, на ранних стадиях рака T1 уровень *TuM2-РК* повышается только у 58% больных, что не позволяет рекомендовать применение данного онкомаркёра в качестве объективного скрининг-теста на первичный РП [3]. По-видимому, этот маркёр может быть наиболее полезен при определении возникновения рецидива РП.

Предпринимаются попытки разработки прогностических моделей, которые сочетают различные независимые прогностические молекулярные маркёры, например панель биомаркёров BioScore, включающая в себя *B7-H1*, сурвивин и *Ki-67*. В прогнозировании исходов у пациентов с ПКР молекулярная панель, состоящая из *Ki-67*, *p53*, *VEGF* и *VEGFR*, показала более точный результат, чем состоящая только из клинических или патологических прогностических факторов [43].

Изучение транскрипционных профилей генов

Появление новых терапевтических возможностей может быть основано на улучшении понимания генетики и молекулярной биологии ПКР. Выявление биомаркёров необходимо для точности оценки прогноза и стратификации на этой основе пациентов в группы для оптимального лечения. Несмотря на предпринятые исследования, ни один из изученных до сих пор маркёров не проявил характеристик независимого прогностического фактора, который может улучшить точность прогноза и быть пригодным в клинической практике [43]. В связи с этим, продолжают исследования отдельных генов в поисках оптимального маркёра [29]. В то же время, фокус смещается в сторону изучения экспрессионных профилей набора генов и их связи с патологическими особенностями опухоли. Такие исследования, основанные на поиске связи экспрессии с клиническими параметрами, позволили выявить профили экспрессии нескольких генов, потенциально имеющих прогностическое значение [45, 54]. В таких исследованиях число получаемых кластеров заранее известно.

Микрочипы представляют собой перспективные методы исследования, поскольку позволяют проанализировать экспрессию большого числа генов. В настоящее время существует ряд работ, в которых исследования проводили на микрочипах с последующим кластерным анализом только экспрессионных данных (unsupervised analysis). Однако получаемые при этом наборы генов (кластеры) потенциально прогностических маркёров противоречивы.

В работе А. Brannon с соавторами [8] при кластерном анализе полученных на микрочипах экспрессионных данных, без привлечения клинических и других параметров, были выделены 2 подгруппы скПКР, обозначенные как ссА и ссВ. При анализе их связи с выживаемостью больных при скПКР было найдено существенное различие: подгруппа ссА имела медиану выживаемости 8,6 года, в то время как подгруппа ссВ — 2 года.

В исследовании С. Battaglia с соавторами объединили данные по экспрессионным профилям на микрочипах, имеющиеся в базах данных. При анализе выборки из 426 образцов (320 скПКР и 106 нормальных тканей, преимущественно соседних с опухолью) методом кластерного анализа выявили 1036 дифференциально экспрессирующихся генов. Среди них 534 гена были с повышенной экспрессией и 502 с пониженной. Пониженная экспрессия наблюдалась в связанных с метаболизмом и транспортом генах в противоположность повышенной экспрессии генов, связанных с передачей сигнала и клеточных взаимодействий. Функциональные характеристики показали, что при скПКР уменьшается экспрессия генов, связанных с оксидоредуктазной активностью, катаболизмом аминов, метаболизмом жирных кислот, выведением и секрецией, ответом на гормоны, транспортом ионов. Индуцируется транскрипция генов, связанных с иммунной реакцией, реакцией на повреждение, защитным ответом, ангиогенезом, ответом на уровень кислорода, пролиферацией клеток, хемотаксисом, адгезией, подвижностью клеток и активацией Т-клеток. В то же время, разделения образцов скПКР по профилям экспрессии на две группы не наблюдали. При дальнейшем анализе удалось выделить 44 гена, экспрессия которых была связана со степенью дифференцировки [15].

При анализе уровней экспрессии генов на микрочипе в 97 образцах РНК первичного ПКР, 15 образцах метастатического рака и 34 клеточных линий выделили три экспрессионных кластера (А, В, С), которые давали разные профили экспрессии [6]. На клеточных линиях получили характеристики экспрессии, отличающиеся от полученных на опухолевых образцах. Эти группы были охарактеризованы по подтипу опухоли, стадии опухоли и по стадии ядерной дифференцировки. Разделение на группы по профилям экспрессии не было связано с клиническими характеристиками, такими, как стадия, степень дифференцировки и т.д. В то же время, была найдена определённая связь с выживаемостью, уменьшающейся от группы А к группе С [6].

Мутации и однонуклеотидные полиморфизмы

Массивное параллельное секвенирование позволило существенно расширить представление о мутационных процессах при скПКР. Так, при изучении образцов ДНК 417 больных с скПКР было найдено 36 353 соматические мутации. В то же время, по наибольшей частоте повторяемости мутаций было выделено только 8 генов: *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, *KDM5C*, *PTEN*, *BAP1*, *MTOR* и *TP53*. Час-

тота мутаций в этих генах резко отличалась от частоты в других генах, включая 11 дополнительных, также содержащих повторяющиеся мутации. Приблизительно 20% случаев скПКР не имели мутации ни в одном из этих 19 генов. Из всех проанализированных генов с частыми мутациями только мутации в гене *BAP1* были ассоциированы с некоторыми клиническими характеристиками — при их наличии наблюдали худшую выживаемость [12].

Мутации в генах *BAP1* (встречающиеся с частотой 11–12%) и *PBRM1* (30–34%) практически не наблюдаются одновременно в образцах скПКР, т.е. взаимно исключают одна другую, что позволяет предполагать негативное генетическое взаимодействие. Среди опухолей с мутациями в гене *BAP1* более часто встречаются метастатические и есть тенденция к более короткой выживаемости по сравнению с больными с опухолями при мутациях в гене *PBRM1* [21, 22].

При полногеномном анализе ассоциаций были выявлены однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП), связанные с риском возникновения скПКР [53]. В таких исследованиях анализируются сотни тысяч ОНП на больших выборках (533191 ОНП, 894 больных и 1516 чел. контрольной группы в работе [53]), что позволяет определять ассоциации с высоким уровнем значимости. Однако величины рисков при этом невелики (в районе 1,2), и это существенно снижает возможности использования ОНП в практических целях для выявления групп повышенного риска возникновения скПКР.

Анализ ассоциаций ОНП применяется также в поиске маркёров, способных дифференцировать пациентов по ответу на терапевтическое воздействие и уровню его токсического действия. В исследовании выживаемости и токсичности при терапии скПКР у 101 больного сунитинибом анализировали 16 основных полиморфизмов в девяти генах. Два полиморфизма в гене *VEGFR3* были ассоциированы с пониженной выживаемостью больных, и высоко метаболизирующий аллель *CYP3A5*1* был ассоциирован с повышенной токсичностью при лечении сунитинибом [24]. В то же время, в другой работе [49] при исследовании 30 ОНП в 11 генах была найдена ассоциация повышенной выживаемости при терапии скПКР сунитинибом с полиморфизмами в генах *CYP3A5*, *NR113* и *ABCB1*, но не было обнаружено связи выживаемости с полиморфизмами в гене *VEGFR3*. При изучении ещё одного ингибитора тирозин киназ — пазопаниба — была сформирована выборка из 397 пациентов с скПКР. В число 13 генов были включены гены, связанные с ангиогенезом и метаболизмом, включая ген *CYP3A5*. С укороченной выживаемостью были ассоциированы ОНП в гене *IL-8*, связанные с повышенной экспрессией этого гена [55], что коррелирует с результатами работы при анализе действия сунитиниба [23]. Следует отметить, что в работе [24] связь выживаемости с вариантами в гене *IL-8* не была показана.

Видимо, для выяснения надёжных связей ОНП с действием терапевтических средств при скПКР необходимы выборки существенно больших размеров.

Заключение

Несмотря на значительное число проведённых исследований, признанные и используемые на практике генные прогностические и диагностические маркёры рака почки пока отсутствуют. Возможно, часть несовпадений результатов связана с популяционными различиями и другими особенностями формируемых выборок, а также способов анализа. Тем не менее, некоторые из выявленных генов-кандидатов могут быть рассмотрены в качестве претендентов на верификацию и последующее использование. Перспективным представляется анализ профилей экспрессии генов, дающих интегральную картину функциональных особенностей опухоли.

Следует отметить, что характеристики экспрессии микроРНК в целом соответствуют делению выборки скПКР на подгруппы по профилям экспрессии генов и не вносят нового качества. Интересно статистически значимое накопление мутаций некоторых генов в подгруппах скПКР, определённых по профилям экспрессии генов [12]. Возможно, углублённый анализ таких связей приведёт к созданию маркёров, позволяющих проводить более тонкую и точную стратификацию больных при скПКР.

Список литературы

1. Алексеев Б.Я., Калпинский А.С. Бевацизумаб (Авастин) в лечении метастатического почечно-клеточного рака // Онкоурология. — 2011. — Спец. выпуск. — С. 16—22.
2. Горелов А.И., Солдатенков А.В., Горелов Д.С. и др. Современные аспекты прогнозирования рака почки // Вестник Санкт-Петербургского университета. Онкоурология. — 2008. — Вып. 4. — С. 153—165.
3. Иванов А.П., Тюзиков И.А. Возможности применения онкомаркёра опухолевая пируваткиназа Tum2-pk в стадировании первичного рака почки // Фундаментальные исследования. — 2011. — №10 (Ч. 3). — С. 498—500.
4. Чисов 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.
5. Baytekin F.I., Tuna B., Mungan U. et al. Significance of P-glycoprotein, p53, and survivin expression in renal cell carcinoma // Urol. Oncol. — 2011. — Vol. 29. — I.5. — P. 502—507.
6. Belet M., Zimmermann Ph., Baudis M. et al. Integrative genome-wide expression profiling identifies three distinct molecular subgroups of renal cell carcinoma with different patient outcome // BMC Cancer. — 2012. — №12. — P. 310.
7. Bishoy A., Gayed, Ramy F. Youssef, Aditya Bagrodia et al. Translational Science Ki67 is an independent predictor of oncological outcomes in patients with localized clear-cell renal cell carcinoma // BJU International. — 2014. — Vol. 113. — I. 4. — P. 668—673.
8. Brannon A., Reddy A., Seiler M. et al. Molecular Stratification of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Consensus Clustering Reveals Distinct Subtypes and Survival Patterns // Genes Cancer. — 2010. — Vol. 1. — I.2. — P. 152—163.
9. Bui M.H., Seligson D., Han K.R. et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: Implications for prognosis and therapy // Clin. Cancer Res. — 2003. — №9. — P. 802—811.
10. Cairns P. Bioscience Signaling pathways in renal cell carcinoma // Cancer Biology & Therapy. — 2010. — Vol. 10. — I.7. — P. 658—664.
11. Choueiri T.K., Vaziri S.A.J., Jaeger E. et al. Von Hippel-Lindau gene status and response to vascular endothelial growth factor targeted therapy for metastatic clear cell renal cell carcinoma // J. Urol. — 2008. — №180. — P. 860—866.
12. Creighton C.J., Morgan M., Gunaratne P.H. et al. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma // Nature. — 2013. — №4. — 499(7456). — P. 43—49.
13. Crispin P.L. et al. Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma // Clinical cancer research. — 2008. — Vol. 14. — I.16. — P. 5150—5157.
14. D'Alterio C., Portella L., Ottaviano A. et al. High CXCR4 expression correlates with sunitinib poor response in metastatic renal cancer // Curr. Cancer Drug Targets. — 2012. — Vol. 12. — I.6. — P. 693—702.
- 15 / Ed. by Robert J. Amato. Emerging Research and Treatments in Renal Cell Carcinoma. — InTech. — 2012. — 442 p.
16. Elizabeth M. Genega, Musie Ghebremichael, Robert Najarian et al. Carbonic Anhydrase IX Expression in Renal Neoplasms. Correlation With Tumor Type and Grade // Am. J. Clin. Pathol. — 2010. — Vol. 134. — P. 873—879.
17. Eric A. Singer, Gopal N. Gupta, Ramaprasad Srinivasan. Targeted Therapeutic Strategies for the Management of Renal Cell Carcinoma // Curr. Opin. Oncol. — 2012. — Vol. 24. — I.3. — P. 284—290.
18. Eric Jonasch, P. Andrew Futreal, Ian J. Davis, State of the Science: An Update on Renal Cell Carcinoma // Mol. Cancer Res. — 2012. — Vol. 10. — I.7. — P. 859—880.
19. Escudier B., Bellmunt J., Negrie S. et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): Final analysis of overall survival // J. Clin. Oncol. — 2010. — Vol. 28. — P. 2144—2150.
20. Frigola X, et al. Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma // Clinical cancer research. — 2011. — Vol. 17. — I.7. — P. 1915—1923.
21. Gossage L., Murtaza M., Slatter A.F. et al. Clinical and pathological impact of VHL, PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A, and JARID1c in clear cell renal cell carcinoma // Genes Chromosomes Cancer. — 2014. — №53 (1). — P. 38—51.
22. Hakimi A.A., Ostrovskaya I., Reva B. et al. Adverse outcomes in clear cell renal cell carcinoma with mutations of 3p21 epigenetic regulators BAP1 and SETD2: a report by MSKCC and the KIRC TCGA research network // Clin. Cancer Res. — 2013. — Vol. 19. — I. 12. — P. 3259—3267.
23. Huang D., Ding Y., Zhou M. et al. Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma // Cancer Res. — 2010. — №70. — P. 1063—1071.
24. Jesus Garcia-Donas, Emilio Esteban, Luis Javier Leandro-Garcia et al. Single nucleotide polymorphism associations with response and toxic effects in patients with advanced renal-cell carcinoma treated with first-line sunitinib: a multicentre, observational, prospective study // The Lancet Oncology. — 2011. — Vol. 12. — I.12. — P. 1143—1150.
25. Karakiewicz P.I., Briganti A., Chun F.K. et al. Multi-institutional validation of a new renal cancer-specific survival nomogram // J. Clin. Oncol. — 2007. — Vol. 25. — I.11. — P. 1316—1322.
26. Klatte T., Seligson D.B., Riggs S.B. et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma // Clin. Cancer Res. — 2007. — №136. — P. 7388—7393.
27. Kluger H.M., Siddiqui S.F., Angeletti C. et al. Classification of renal cell carcinoma based on expression of VEGF and VEGF receptors in both tumor cells and endothelial cells // Lab. Invest. — 2008. — Vol. 88. — I.9. — P. 962—972.
28. Lei Y. et al. Prognostic significance of survivin expression in renal cell cancer and its correlation with radioresistance // Molecular and cellular biochemistry. — 2010. — Vol. 344. — I.1—2. — P. 23—31.
29. Lichner Z., Scorilas A., White N.M. et al. The chromatin remodeling gene ARID1A is a new prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma // Am. J. Pathol. — 2013. — Vol. 182. — I.4. — P. 1163—1170.
30. Lidgren A., Hedberg Y., Grankvist K. et al. The expression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a favorable independent prognos-

tic factor in renal cell carcinoma // Clin. Cancer Res. — 2005. — №11. — P. 1129–1135.

31. Lidgren A., Hedberg Y., Grankvist K. et al. Hypoxia-inducible factor 1a expression in renal cell carcinoma analyzed by tissue microarray // Eur. Urol. — 2006. — №50. — P. 1272–1277.

32. Linehan W.M., Yang J.C., Rini B. Cancer of the kidney // Cancer: Principles and practice of oncology (ed. V.T. De ita et al.). — 2011. — P. 1161–1182.

33. Linhui Wang, Wei Chen, Li Gao et al. High expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 predicts poor survival in renal cell carcinoma // Qing Yang, World Journal of Surgical Oncology. — 2012. — №10. — P. 212.

34. Marston Linehan W. Genetic basis of kidney cancer: Role of genomics for the development of disease-based therapeutics // Genome Res. — 2012. — №22. — P. 2089–2100.

35. Minardi Daniele, Lucarini Guendalina, Santoni Matteo. VEGF Expression and Response to Sunitinib in Patients with Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma // Anticancer Res. — 2013. — Vol. 33. — I.11. — P. 5017–5022.

36. Minna Kankuri, Karl-Ove Soderstrom, Taria-Terttu Pelliniemi et al. The Association of Immunoreactive p53 and Ki-67 with T-stage, Grade, Occurrence of Metastases and Survival in Renal Cell Carcinoma // Anticancer Research. — 2006. — Vol. 26. — P. 3825–3834.

37. Nisman B, Yutkin V, Nechushtan H. et al. Circulating tumor M2 pyruvate kinase and thymidine kinase 1 are potential predictors for disease recurrence in renal cell carcinoma after nephrectomy // Urology. — 2010. — №76(2). — P. 513–516.

38. Parker A.S. et al. High expression levels of survivin protein independently predict a poor outcome for patients who undergo surgery for clear cell renal cell carcinoma // Cancer. — 2006. — Vol. 107. — I.1. — P. 37–45.

39. Patel P., Chadalavada R., Ishill N. et al. Hypoxia-inducible factor (HIF) 1a and 2a levels in cell lines and human tumor predicts response to sunitinib in renal cell carcinoma (RCC) // J. Clin. Oncol. — 2008. — S.26.

40. Phuoc N.B., Ehara H., Gotoh T. et al. Prognostic value of the co-expression of carbonic anhydrase IX and vascular endothelial growth factor in patients with clear cell renal cell carcinoma // Oncol. Rep. — 2008. — №20. — P. 525–530.

41. Rini B.I., Jaeger E., Weinberg V. et al. Clinical response to therapy targeted at vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: impact of patient characteristics and Von Hippel-Lindau gene status // BJU Int. — 2006. — №98. — P. 756–762.

42. Rioux-Leclercq N., Fergelot P., Zerrouki S. et al. Plasma level and tissue expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma: a prospective study of 50 cases // Hum. Pathol. — 2007. — №38. — P. 1489–1495.

43. Ronkainen H.-L. Novel Prognostic Biomarkers For Renal Cell Carcinoma // Acta Universitatis Ouluensis D Medica. — 2012. — 140 p.

44. Sandlund J., Oosterwijk E., Grankvist K. et al. Prognostic impact of carbonic anhydrase IX expression in human renal cell carcinoma // BJU Int. — 2007. — Vol. 100. — I.3. — P. 556–560.

45. Sanjmyatav J. et al. A specific gene expression signature characterizes metastatic potential in clear cell renal cell carcinoma // J. Urol. — 2011. — Vol. 186. — I.1. — P. 289–294.

46. Sun M., Shariat S.F., Cheng C. et al. Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review // Eur. Urol. — 2011. — №60. — P. 644–661.

47. Takacova M., Bartosova M., Skvarkova L. et al. Carbonic anhydrase IX is a clinically significant tissue and serum biomarker associated with renal cell carcinoma // Oncology Letters. — 2013. — №5. — P. 191–197.

48. Takeshi Azuma, Sheng Yao, Gefeng Zhu et al. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells // Blood. — 2008. — Vol. 111. — I.7. — P. 3635–3643.

49. van der Veldt A.A., Eechoute K., Gelderblom H. et al. Genetic polymorphisms associated with a prolonged progression-free survival in patients with metastatic renal cell cancer treated with sunitinib // Clin. Cancer Res. — 2011. — №17. — P. 620–629.

50. Volpe A., Patard J.J. Prognostic factors in renal cell carcinoma // World J. Urol. — 2010. — Vol. 28. — I.3. — P. 319–327.

51. Wein A.J., Kavoussi L.R., Novick A.C. et al. Campbell—Walsh urology, 9th edition. — Philadelphia, Saunders Elsevier, 2007. — 4592 p.

52. Weiss R.H., Borowsky A.D., Seligson D. et al. p21 is a prognostic marker for renal cell carcinoma: implications for novel therapeutic approaches // J. Urol. — 2007. — Vol. 177. — I.1. — P. 63–69.

53. Wu X., Scelo G., Purdue M.P. et al. A genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus for renal cell carcinoma on 12p11.23 // Hum. Mol. Genet. — 2012. — №15. — 21(2). — P. 456–462.

54. Wuttig D. et al. Gene signatures of pulmonary metastases of renal cell carcinoma reflect the disease-free interval and the number of metastases per patient // Int. J. Cancer. — 2009. — Vol. 125. — I.2. — P. 474–482.

55. Xu C.F., Bing N.X., Ball H.A. et al. Pazopanib efficacy in renal cell carcinoma: evidence for predictive genetic markers in angiogenesis-related and exposure-related genes // J. Clin. Oncol. — 2011. — №29. — P. 2557–2564.

56. Yang Chuan-Ying, Liu Jiu-hua, Liang Yu. The expressions of HPA and MMP-9 in renal cell carcinoma and their relationship with the density of tumor angiogenesis // Journal of Modern Urology. — 2011. — I.3. — P. 247–249, 265.

57. Zhen-kui Qiao, Yan-long Li, Hong-tao Lu et al. Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in renal cell carcinoma // World Journal of Surgical Oncology. — 2013. — Vol. 11. — I.1.

The molecular-genetic features and markers of renal cell carcinoma

Apanovich N.V., Apanovich P.V., Karpukhin A.V.

Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia; e-mail: karpukhin@med-gen.ru

The growth rate of renal cell carcinoma (RCC) is one of the first places in Russia. Approximately one third of patients at the time of diagnosis revealed distant metastases, and 30–40% — relapse of the disease. The most common and aggressive among histological types of cancer of this localization is clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), constituting 70–80% of all cases. Typically, the disease is detected incidentally during a routine examination. The identification of ccRCC at early stage, when the conditions for its treatment are the most favorable, is very important. This necessitates the development of new, more reliable, fast and affordable for patients, methods of early diagnosis and prognostic markers of ccRCC. Identification and study of genes that are closely related to ccRCC development could make a significant contribution to the understanding of the processes occurring in the tumor and to personalization of his treatment. This review considers the molecular-genetic characteristics of the most common histological types of kidney cancer, describes the main known genetic and expression markers, as well as modern approaches to the identification of new markers on the base of transcription.

Key words: renal cancer, molecular genetics, diagnostic and prognostic markers

Применение метода гель-электрофореза отдельных клеток в комбинации с флуоресцентной гибридизацией *in situ* для прицельной оценки ДНК-повреждений*

Никитина В.А.¹, Жанатаев А.К.², Чаушева А.И.¹, Куцев С.И.¹

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, 115478, Россия, Москва, ул. Москворечье, д. 1. Факс: +7 499 324 3579

² — НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, 125315, Россия, Москва, ул. Балтийская, 8. Факс: +7 499 151 1261

Описаны технические особенности и представлен подробный протокол использования комбинации методов гель-электрофореза отдельных клеток (метод ДНК комет) и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Рассматриваются примеры методологически различных подходов применения описанной техники при решении фундаментальных и прикладных научных задач.

Ключевые слова: гель-электрофорез отдельных клеток, метод ДНК комет, флуоресцентная гибридизация *in situ*, метод комет-FISH, ДНК-повреждения

Введение

Метод гель-электрофореза отдельных клеток (или метод ДНК комет) широко используется в фундаментальных и прикладных научных исследованиях в мире, применим практически для любых клеток и тканей, активно пролиферирующих или непролиферирующих [2]. Метод ДНК комет позволяет эффективно оценивать повреждающие эффекты эндогенных и экзогенных факторов и широко используется в генотоксикологии при тестировании мутагенных соединений наряду с традиционными цитогенетическими методами, такими, как метод учёта хромосомных aberrаций и микроядерный тест. Расширение исследовательских возможностей метода связано с использованием его различных модификаций. Так, для выявления общих разрывов ДНК применяют щелочную версию метода, для двухцепочечных — нейтральную, а при добавлении фермента ДНК-N-гликозилазы — оценивают уровень 8-оксигуанина, биомаркера окислительного повреждения ДНК.

Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) позволяет визуализировать отдельные участки ДНК на хромосомах метафазных пластинок или интерфазных ядер. Прогностическая значимость FISH метода высока, его широко применяют в предимплантационной, пренатальной диагностике, в гематологической и онкологической практике. Возможность проведения гибридизации на разных типах препаратов (тканевых, клеточных, хромосомных) привела к мысли о приложении FISH к методу ДНК комет. Впервые комбинацию двух методов провели не для диагностических целей, а для изучения пространственного строения ядра [23].

Методические вопросы совместного использования гель-электрофореза и флуоресцентной гибридизации *in situ*

Метод гель-электрофореза

Метод гель-электрофореза отдельных клеток основан на регистрации различной подвижности в постоянном электрическом поле ядерной ДНК лизированных клеток, заключённых в агарозный гель. При этом ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий «хвост кометы», параметры которого зависят от степени повреждённости исследуемой ДНК [2].

Для получения микропрепаратов комет суспензию клеток погружают в агарозный гель (с температурой плавления 42°C), наносят на специально подготовленное стекло с подложкой из универсальной агарозы, а затем лизируют, разрушая мембраны и удаляя гистоновые белки. Так называемая комета до проведения электрофореза представляет собой нити ДНК с сохранённой суперспирализацией в 3D-формате, поддерживаемом не структурой нуклеосом, а полисахаридными цепями агарозы. Петли ДНК зафиксированы на ядерном матриксе. После проведения электрофореза при наличии разрывов более лёгкие фрагменты ДНК мигрируют быстрее, образуя «хвост кометы». По параметрам, характеризующим содержание ДНК в «хвосте кометы», можно судить об уровне повреждений ДНК в клетке. Обработка клеточной суспензии препаратами, индуцирующими повреждение ДНК, с дальнейшим мониторингом их уровня в течение 24 ч, позволяет судить об интенсивности

* Авторы выражают благодарность сотрудникам кафедры общей и медицинской генетики медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова и лично А.Б. Кузнецову за возможность использования лазерного сканирующего конфокального микроскопа.

протекания процессов репарации ДНК в отдельных клетках. Соотношение между числом разрывов и активностью ферментов системы репарации определяет спонтанный уровень ДНК повреждений в клетке, который может меняться ещё и в зависимости от стадии клеточного деления, воздействия внешних и внутренних повреждающих факторов.

Метод флуоресцентной гибридизации in situ

Классический FISH метод в цитогенетике основан на гибридизации известной по нуклеотидному составу ДНК пробы (ДНК зонда) с участком хромосомы делящейся или покоящейся клетки с последующим выявлением результата гибридизации по флуоресцентной метке. В качестве ДНК пробы могут быть использованы относительно небольшие фрагменты ДНК, комплементарные анализируемой последовательности ДНК мишени. Размер проб может варьировать от 50–100 т.п.н. до нескольких млн п.н., так что в качестве мишени могут выступать не только отдельные гены или хромосомные участки, но и целая хромосома. По размеру ДНК пробы разделяют на полнохромосомные (WCP, whole chromosome probe), окрашивающие p-, q-плечи и центромеру хромосомы, и частично хромосомные, окрашивающие только одно из плеч (PCP, partial chromosome probe), центромеру (CP, centromeric probe), прителомерный участок хромосомы (telomeric probe) или регион (локус) хромосомы со специфической последовательностью ДНК (LCP, locus-specific probe) [17]. По методу получения ДНК пробы можно разделить на клонированные в плаزمиды, фагах, космидах, искусственных хромосомах фага P1 (PACs), бактерий (BACs), дрожжей (YACs); амплифицированные методом полимеразной цепной реакции и синтезированные (олигонуклеотидные цепочки). ДНК зонды включают в состав флуорофоры (прямо меченные зонды) или репортерные группы, в качестве которых обычно выступают антигены (непрямо меченные зонды). В последнем варианте после завершения гибридизации препараты инкубируют с мечеными антителами.

Основными этапами FISH метода являются денатурация, гибридизация и отмыв.

Сначала цитогенетические препараты и ДНК пробы одновременно или последовательно подвергают денатурации с формамидом при температуре 72–75°C.

Далее при 37–41°C проводят совместную гибридизацию, продолжительность которой зависит от типа ДНК проб и может варьировать от 2 до 48 ч.

На следующем этапе для исключения неспецифической гибридизации препараты отмывают при температуре на несколько градусов ниже температуры денатурации (65–70°C). Для контрастной окраски ядер используют краситель DAPI, разведённый в растворе, препятствующем быстрому выцветанию флуорохромов. Диагностику обычно проводят по количеству светящихся сигналов (например, при выявлении наиболее распространённых анеуплоидий по центромерным сигналам

хромосом 13, 18, 21, X, Y при предимплантационном или пренатальном скрининге) или по сочетанию двух или нескольких сигналов и появлению нехарактерного нового цвета (например, при определении гибридного гена BCR-ABL, характерного для хронического миелолейкоза).

Особенности проведения гибридизации на препаратах ДНК комет

FISH на ДНК кометах отличается большей сложностью по сравнению с классическим, проводимым на цитогенетических препаратах методом. Это связано с невозможностью проведения стандартной высокотемпературной процедуры денатурации из-за необходимости сохранения ядерного материала ДНК комет в тонком слое легкоплавкой агарозы (температура плавления 42°C). Перегревание препаратов ведёт к плавлению или схождению верхнего слоя агарозы со стёкол с нарушением целостности ДНК комет. Поэтому процесс денатурации препаратов, предшествующий гибридизации с флуоресцентной пробой, проводится в растворе щёлочи при комнатной температуре. Неспецифически связанные зонды отмывают в 50%-ном растворе формамида, что позволяет снизить температуру до 40°C.

Выбор флуоресцентных проб для гибридизации на ДНК кометах ограничивается исключительно задачами исследования. Возможно использование как лабораторных, так и коммерческих флуоресцентных зондов, предназначенных для интерфазной цитогенетики. Применение готовых коммерческих зондов технически облегчает работу исследователя, кроме того, они дают сильный, легко визуализируемый сигнал. В целом, ДНК пробы больших фрагментов геномной ДНК всегда дают более яркий сигнал, но могут быть причиной неспецифической гибридизации, если содержат повторяющиеся последовательности. Большой интерес для исследователей в связи с возможностью выбора и идентификации любой последовательности ДНК представляют уникальные зонды, полученные при амплификации методом ПЦР отдельных участков хромосом или химически синтезированные олигонуклеотидные зонды. Такие зонды строго специфичны, но их сигналы могут быть слабыми из-за небольшого размера цепи. При выборе ДНК проб надо учитывать и то, что их размер не должен быть менее 10 т.п.н., так как небольшие фрагменты могут быть потеряны при электрофорезе [22]. Специфика самой последовательности ДНК в пробе также влияет на визуальную картинку сигнала. Иногда определение разрывов некоторых последовательностей ДНК может быть затруднено из-за их ассоциации с ядерным матриксом и слабой подвижности в электрическом поле [24]. Точность локализации повреждений ДНК может быть достигнута при использовании оригинальных зондов. Особый дизайн зондов, ограничивающих участок ДНК флуорофорами разных цветов, предложен в исследовании [13] и будет описан ниже.

Подсчёт сигналов в комете соответствует общим правилам визуальной оценки, используемым при проведении стандартной гибридизации на цитогенетических препаратах [1]. Сложность интерпретации на ДНК комете связана с особенностями архитектуры ядерного хроматина в ней, так как многоуровневость расположения сигналов значительно затрудняет анализ. В зависимости от условий электрофореза (нейтральный или щелочной), обуславливающих различия кинетики выхода ДНК в хвост кометы, сигналы ДНК проб могут выглядеть по-разному. На одностранных петлях ДНК, полученных при нейтральном форезе, FISH-сигналы видны как нити или цепочки. В щелочной версии сигналы точечные, лежат в виде «глыбок», иногда образуют конгломераты [24].

Однако наиболее интересной, в рамках обсуждаемых методов, является оценка положения флуоресцентного сигнала в ДНК комете. Его расположение в голове или хвосте кометы указывает на то, есть ли повреждение в интересующей нас последовательности ДНК или в непосредственной близости от неё. Подсчёт числа сигналов в хвосте и голове кометы осуществляется визуально или при анализе посредством программного обеспечения. Если оба сигнала, которые соответствуют последовательностям ДНК в паре хромосом, расположены в голове кометы, разрыв не произошел, если один или более сигналов выходят за пределы головы кометы, можно предположить, что разрыв произошел в непосредственной близости от места гибридизации. Если произошел двунитевой разрыв внутри меченой последовательности, количество сигналов увеличится [11]. Некоторые сигналы, а соответственно и последовательности ДНК, могут оставаться в голове кометы, даже если в них произошел разрыв. Вероятно, это связано с присутствием MAR/SAR-последовательностей, фланкирующих исследуемый ген или его часть, а также с его участием в процессе транскрипции [13, 25].

Обработку данных обычно осуществляют после фотографирования на флуоресцентном микроскопе с помощью программ, предназначенных для подсчёта нескольких параметров ДНК комет (процент ДНК в хвосте, момент хвоста и др.). При анализе комет-FISH рассчитывают ещё и частоту появления сигналов в хвосте кометы. Частоту разрывов в конкретном участке ДНК обычно сравнивают с «общегеномной» частотой разрывов. Конфокальная лазерная микроскопия с последовательным сканированием 10—15 слоёв позволяет визуализировать расположение всех флуоресцентных сигналов в комете. В работе [4] для контроля гибридизации при выявлении теломерных повторов использовали лазерный сканирующий микроскоп. Для статистического анализа отобрали 50 комет с наиболее яркими сигналами. Вопрос о размере выборки для получения достоверных результатов широко не обсуждается и, видимо, требует отдельного изучения. В большинстве исследований сиг-

налы подсчитывают примерно в 50—100 кометах, при условии повторяемости эксперимента.

Таким образом, выполнение гибридизации на препаратах ДНК комет расширяет возможности обоих методов, делая их более информативными, и позволяет оценить не только частоты возникновения и локализацию ДНК повреждений, но и кинетику репарации изучаемых генов в зависимости от их расположения в геноме и последовательности нуклеотидов. Благодаря сохранению ядерного материала в объёмной форме данный подход может быть использован при исследовании структурной организации ДНК и хроматина.

Далее представлен протокол исследования разрывов ДНК в отдельных клетках с применением комбинированного метода комет-FISH. На рис. 1—4 на 3-й странице обложки представлены собственные фотографии ДНК комет с флуоресцентными сигналами, сделанные с помощью лазерного сканирующего микроскопа (рис. 1) и эпифлуоресцентного микроскопа (рис. 2—4).

Протокол флуоресцентной гибридизации *in situ* на препаратах ДНК комет

1. Приготовление препаратов ДНК комет

1.1. Подготовка стёкол для препаратов

Обезжиренные предметные стекла выложить на поверхность электрической плитки, нагретой до 65—70°C.

1%-ный раствор универсальной агарозы из расчёта 20 мм³ на площадь стекла 25 мм² дозатором нанести на край стекла и равномерно распределить по всей поверхности.

Высушить стёкла на воздухе, хранить не более месяца в сухом месте при комнатной температуре.

1.2. Приготовление препаратов

В микропробирке смешать 240 мкл 1%-ного раствора легкоплавкой агарозы с 60 мкл клеточной суспензии.

В центральную часть предметного стекла нанести 60 мкл полученного агарозного геля с клетками и накрыть покровным стеклом.

Предметные стёкла положить на поверхность хладагента и оставить на 10 мин для затвердевания геля.

Аккуратно снять покровные стёкла, препараты поместить в кювету с лизирующим раствором (10 mM Tris-HCl [pH 10], 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA-Na₂, 1% Triton X-100, 10% ДМСО) и инкубировать при 4°C в течение 1 ч.

В щелочной версии метода перенести препараты в кювету с охлаждённым до 4°C щелочным раствором для электрофореза (300 mM NaOH, 1 mM EDTA-Na₂, pH>13) и инкубировать при 4°C в течение 20 мин.

Поместить препараты в камеру для горизонтального электрофореза. Электрофорез проводить в свежей порции охлаждённого до 4°C щелочного раствора для электрофореза при температуре окружающей среды 20—25°C в течение 20 мин при напряжённости электрического поля 1 В/см.

В нейтральной версии метода по окончании лизиса поместить препараты в камеру для горизонтального электрофореза и провести электрофорез в 45 mM Tris-borate/1 EDTA- Na_2 , pH 7.5.

По окончании электрофореза нейтрализовать препараты в 70% этилового спирта в течение 15 мин и высушить препараты при комнатной температуре.

2. Гибридизация *in situ* на препаратах ДНК комет

2.1. Денатурация препаратов

Дегидратировать препараты в этиловом спирте 70, 85, 96% по 5 мин в каждом при комнатной температуре. Высушить препараты на воздухе.

Денатурировать в растворе 0,5M NaOH в 2xSSC 10 мин при комнатной температуре.

Зафиксировать в 70%-ном этиловом спирте при -20°C в течение 10 мин, затем 85-, 96%-ном при $+4^\circ\text{C}$ по 3 мин. Высушить препараты на воздухе.

2.2. Денатурация ДНК проб

Приготовить гибридизационную смесь, состоящую из ДНК-зондов и гибридизационного буфера (использовался коммерческий CEP или LSI буфер и пробы CEP8 (D8Z1), CEPX (DXZ1), LSI 21 (локусы D21S259, D21S341, D21S342, 21q22.13-q22.2), Vysis, Abbott, USA).

Денатурировать гибридизационную смесь при $+75^\circ\text{C}$, 5 мин, после чего немедленно охладить до $+4^\circ\text{C}$.

2.3. Гибридизация

Нанести гибридизационную смесь на подготовленные препараты, накрыть покровным стеклом, стыки заклеить резиновым клеем.

Поместить препараты во влажную камеру при 37°C , оставить на ночь.

2.4. Отмыв с формамидом

Предварительно нагреть кювету с 50%-ным формамидом до $+40^\circ\text{C}$ в водяной бане.

Погрузить препараты в раствор 50%-ного формамида ($+40^\circ\text{C}$) на 5 мин, повторить 3 раза.

Погрузить препараты в раствор 2xSSC ($+40^\circ\text{C}$) на 5 мин, повторить 3 раза.

Переложить препараты в кювету с 4xSSC/Tween, 10 мин осторожно помешивать на орбитальном шейкере при комнатной температуре.

Последовательно перемещать препараты в кюветы с 70-, 85-, 96%-ным этиловым спиртом по 3 мин в каждом при комнатной температуре.

3. Окрашивание препаратов

Нанести раствор DAPI в Vectashield, препарат накрыть покровным стеклом, можно хранить в темном прохладном месте.

Применение

комбинированного метода ДНК комет и FISH

Исследования структурной организации ядра

Заключение клеток в агарозный гель ведёт к сохранению структурной организации хроматина, характерной для живой клетки. Благодаря этому после проведения лизиса клеточной, ядерной мембран и большинства белков, ДНК комета представляет собой нити сохранившей суперспирализацию молекулы ДНК, связанные с ядерным матриксом. Впервые структура ДНК комет была описана в работе [23]. С использованием меченных биотином олигонуклеотидных центромерных и теломерных ДНК проб для всех хромосом и локус-специфичных клонированных зондов к участкам хромосом 3, 7 и 10 были исследованы особенности расположения последовательностей ДНК в кометах. Авторы описывают флуоресцентные сигналы центромерных участков хромосом как слабо конденсированные, «разреженные», которые тянутся из центра головы кометы к периферии её хвоста. В этом же исследовании сигналы теломер и фрагмента гена *MGMT*, кодирующего фермент репарации O^6 -метилгуанин-ДНК метилтрансферазу, напротив, описаны как сконденсированные гранулы хроматина, расположенные на периферии головной части кометы.

Исследование положения теломерных повторов в лимфоцитах периферической крови человека до и после экспозиции с мутагенами разного типа проведено авторами работы [4]. Было отмечено, что даже в контроле значительное количество (15—18%) теломерных сигналов наблюдали в хвосте кометы. Авторы связывают это не с повышенной ломкостью прителомерных/теломерных участков, а с их локализацией на периферии ядра вблизи ядерной мембраны.

Благодаря использованию флуоресцентной гибридизации были выявлены структурные различия в организации комет при проведении электрофореза в щелочных и нейтральных условиях. С учётом проведённых исследований [6, 13, 15, 25] можно предположить, что хвосты комет после нейтрального электрофореза состоят из петель двуниевых молекул ДНК, прикреплённых к ядерному матриксу, которые вытягиваются под действием электрического поля при возникновении разрыва. При использовании щелочной версии метода происходит денатурация ДНК с частичной ренатурацией при последующей нейтрализации. Поэтому при возникновении разрыва в хвосте кометы наблюдают одноцепочечные молекулы ДНК, они видны как отдельные фрагменты, в то же время, голова кометы состоит из двухцепочечной ДНК, что было подтверждено специфическим окрашиванием [6].

Исследования процессов репарации

Ряд исследований посвящён изучению скорости репарации разных генов в зависимости от их топологических характеристик и состава (последовательности нуклеотидов), т.е. наличие геноспецифичности репарации после специфического химического или физического воздействия на клетки.

Авторы [13] изучали процессы репарации в генах, которые экспрессируются в большинстве типов клеток человека и китайского хомячка (СНО): дигидрофолат-редуктаза (*DHFR*), *O*₆-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза (*MGMT*) и опухолевый супрессор *p53*. В этом исследовании был использован уникальный дизайн зондов. Для трёх выбранных последовательностей генов синтезировали олигонуклеотиды с люминесцентными молекулами разных цветов на их терминальных участках. При анализе производили подсчёт сигналов в голове и хвосте кометы. Если сигналы обоих цветов находились в голове кометы, то ген считали неповреждённым. Появление обоих сигналов в хвосте кометы указывало на то, что разрыв произошёл в непосредственной близости от гена. Увеличение расстояния между сигналами разного цвета указывало на разрыв внутри гена. Было обнаружено, что в клетках китайского хомячка преимущество имеет репарация окисленных оснований гена *MGMT*, а разрывы в гене *p53* человека репарируются быстрее по сравнению с остальной ДНК. Неожиданностью стало то, что в гене *DHFR* клеток китайского хомячка сигналы фиксировали только в голове кометы, даже в повреждённых клетках с высоким процентным содержанием ДНК в хвосте. Напротив, тот же ген в лимфоцитах человека обнаруживали и в хвосте кометы наряду с *MGMT* и *p53*. Авторы считают маловероятным большую устойчивость гена *DHFR* у китайского хомячка к повреждениям. Они предполагают, что некоторые гены или их части могут располагаться в голове кометы даже при наличии разрывов в них, и связывают это с высокой транскрипционной активностью гена или присутствием в нем SAR/MAR последовательностей, локализованных на ядерном матриксе. Это подтверждают данные литературы [14] о наличии SAR/MAR последовательностей в гене *DHFR* китайского хомячка.

В исследовании [18] изучали степень повреждённости и активность репарации участков гена *TP53* в клетках двух линий рака мочевого пузыря (RT4 и RT112) после гамма-облучения дозой 5 Гр. Ген *TP53* является особенно интересным объектом для изучения процессов репарации, так как он активно транскрибируется на протяжении всего клеточного цикла и является одним из ключевых генов-супрессоров опухолевого роста [5]. На основании результатов о частоте повреждённых «комет» и расположении в них гибридизационных сигналов участка гена *TP53* в разные временные промежутки после облучения авторы подтвердили предположение о существовании порядковой очередности репарации функционально разных генов в первые минуты после повреждения. Оказалось, что скорость репарации изучаемого участка гена *TP53* в ответ на гамма-облучение была наиболее высокой в сравнении с общегеномной в течение первых 15 мин в обеих клеточных линиях. В это время наблюдали уменьшение количества гибридизационных сигналов, расположенных в хвосте кометы и свидетельствующих о разрывах ДНК.

Исследования в области мутагенеза и канцерогенеза

Выявление, идентификация и анализ частот повреждений ДНК в ДНК кометах важны при исследовании генетической стабильности клеточной популяции. В разных исследованиях делаются попытки выявления наиболее чувствительных к повреждению ДНК хромосом или их регионов. Комбинированный тест комет-FISH с использованием полнохромосомных зондов позволяет вычислить степень вовлечённости отдельных хромосом в процесс спонтанного и индуцированного мутагенеза и затем выявить взаимосвязь между различными характеристиками хромосом и уровнем повреждений в них.

А. Рапп с соавторами [22] провели сравнительную оценку числа разрывов ДНК, индуцированных УФ-облучением с помощью полнохромосомных зондов двенадцати хромосом (1, 2, 3, 8, 9, 11, 14, 18, 19, 21, X, Y). Показано, что число разрывов ДНК не коррелировало с размером хромосом, но выявлена обратная зависимость между плотностью активных генов в хромосоме и уровнем индуцированных ультрафиолетом ДНК повреждений в ней. Например, богатая генами хромосома 1 оказалась более стабильной, только в 3% клеток её фрагменты обнаружены в хвосте кометы, тогда как для хромосомы 8 это значение составило 25%. Авторы предположили, что хромосомы с высокой плотностью генов более устойчивы к ДНК-повреждающим агентам или содержащиеся в них гены быстрее репарируются. Альтернативное объяснение было предложено С.А. Шапошниковым с соавторами [24], допускающими, что транскрипционно активные участки хроматина плотно связаны с белками ядерного матрикса, что затрудняет миграцию их фрагментов в хвост кометы.

В другом исследовании не выявили различий между чувствительностью к разрывам ДНК и стохастичностью их распределения в разных хромосомах [19]. Две группы было обследовано: в первую вошли больные анемией Фанкони и гетерозиготные носители этого заболевания, во вторую — здоровые доноры. На препаратах ДНК комет гибридизовали полнохромосомные пробы хромосом 13 и 16. Хромосома 16 была выбрана в связи с найденным на её длинном плече геном, ассоциированным с анемией Фанкони [21], а 13 — в качестве контроля. При индукции гамма-облучением и метилметансульфонатом статистически значимых различий между частотой разрывов хромосом не выявлено.

Оригинальный протокол исследования повреждённости отдельных хромосом предложен в работе [7]. Объектом исследования были не клеточное ядро, а изолированные метафазные хромосомы клеток линии HeLa. Для получения ДНК комет отдельных хромосом сначала с помощью колхицина блокировали клеточное деление в культуре клеток на стадии метафазы, затем инкубировали полученные суспензии в гипотоническом растворе и несколько раз пропускали их через тонкую иглу. Посредством фазово-контрастного микроскопа определяли наличие изолированных хромосом наряду с интерфазными ядрами. Препараты

ДНК комет готовили, проводя стандартные процедуры: лизис и гель-электрофорез. Индуцированные перекисью водорода ДНК повреждения оценивали в двух группах:

- 1) ДНК кометы ядер;
- 2) ДНК кометы хромосом, причём хромосомы дифференцировали по размеру на большие, средние и малые.

Было выявлено 8% повреждённых интерфазных ядер и соответственно 12, 9 и 11% больших, средних и малых повреждённых хромосом. Не выявлена корреляция частоты разрывов ДНК с размером хромосом. Исходя из денситометрического соотношения между общей ДНК и ДНК в хвосте кометы, предположено, что повреждения в хромосомах произошли не случайно и, по-видимому, связаны с общими сайтами фрагильности, «горячими точками» хромосом, чувствительными к прооксидантному повреждающему действию перекиси водорода. Предложенный авторами метод прост в исполнении, однако аутентификация пар хромосом невозможна, а, следовательно, степень корректности оценки результатов фактически не будет отличаться от классического анализа ДНК комет интерфазных ядер. Однако метод заслуживает внимания, так как при использовании флуоресцентной окраски, например многоцветного бэндинга хромосом, может конкурировать с полнохромосомной окраской комет интерфазных ядер по точности определения места разрыва.

Еще одним применением комбинации методов ДНК комет и FISH является исследование механизмов канцерогенеза. Используется следующий экспериментальный подход: проводится оценка стабильности отдельных хромосом, содержащих гены, ассоциированные с канцерогенезом или самих этих генов (их частей), под действием физических, химических или фармакологических мутагенных факторов. В качестве экспериментальной модели чаще используют линии опухолевых клеток или сравнивают клеточные популяции из тканей здоровых и больных онкологическими заболеваниями людей.

U.A. Narreus с соавторами [12] показали, что у пациентов с плоскоклеточным раком гортани чувствительность к индуцированным бензопиреном повреждениям ДНК в хромосомах 3, 5 и 8 статистически достоверно выше по сравнению с хромосомой 1, что не наблюдали в контрольной группе пациентов.

Разная чувствительность локусов генов *APC* (5q13-q31), *KRAS* (12pter-p11.2) и *TP53* (17pter-p12), ассоциированных с раком толстой кишки человека, к действию продуктов окислительного стресса (перекись водорода, транс-2-гексенал и 4-гидрокси-2-ноненаль) продемонстрирована в первичных клетках толстой кишки здоровых людей и клетках линии аденомы толстой кишки (LT97) [11]. Частота сигналов ДНК зонда гена *TP53* в хвосте кометы после обработки 4-гидрокси-2-ноненалем была почти в 2 раза выше в клетках LT97 по сравнению с контрольными. Авторы полагают, что мутации в гене *TP53* играют ключевую роль в прогрессии аденомы в аденокарциному, а контакт человека с генотоксикантами, такими, как 4-гидрокси-2-ноненаль, является фактором риска развития рака.

Высокая чувствительность к разрывам гена *TP53* продемонстрирована при длительной экспозиции культуры лимфоцитов здоровых добровольцев в низкоконтентрированном растворе пестицидов (тербутилазина и карбофурана) *in vitro* [20]. Показано, что часто бывают повреждены обе копии гена *TP53*, что может привести к нарушению регуляции клеточного цикла, а, следовательно, к индукции и прогрессии опухолевого роста.

При изучении этиологии и патогенеза острого миелолейкоза линию ТК6 лимфобластоидных клеток обрабатывали мелфаланом, этопозидом и гидрохиноном в разных концентрациях и оценивали число разрывов в участках хромосом 5 и 11. Кариотип больных острым миелолейкозом часто характеризуется делецией длинного плеча хромосомы 5 и перестройками хромосомного района 11q23 с участием гена *MLL*. Авторы статьи подтвердили своё предположение о том, что возникновение хромосомных аберраций связано с терапией мелфаланом и ингибиторами топоизомеразы II, продемонстрировав избирательность повреждения хромосом исследованными химическими агентами [9].

Высокий уровень спонтанной нестабильности генов *p53* и *HER-2/neu* в нескольких линиях раковых клеток молочной железы [16] натолкнул исследователей на мысль об использовании комбинации комет-FISH для ранней диагностики рака разного генеза. Авторы считают, что метод имеет большой потенциал в клинической диагностике рака молочной железы в будущем для оценки риска развития и прогрессии рака, так как позволяет использовать клетки разных тканей (лимфоциты периферической крови, аспираты, взятые для биопсии) для определения частоты разрывов в генах-кандидатах.

Таким образом, представленные данные демонстрируют, что комбинирование методов гель-электрофореза отдельных клеток и флуоресцентной гибридизации *in situ* является инструментом, который позволяет исследовать структурные особенности расположения хроматина в ядре, оценивать скорость репарации отдельных генов, ответственных за ключевые процессы клеточного цикла, а также их чувствительность к генотоксическим воздействиям. На сегодняшний день с помощью представленного здесь методического подхода описаны некоторые особенности расположения разных последовательностей ДНК относительно ядерного матрикса. Показано, что скорость репарации генов может определяться их положением в ядре, транскрипционной активностью или наличием специфических последовательностей ДНК. Некоторые исследователи [7, 16] рекомендуют этот метод для оценки риска развития и прогрессии некоторых онкологических заболеваний. Прогностическая и диагностическая значимость метода не слишком высока, но данные, полученные при обследовании групп пациентов с различными онкозаболеваниями, могут быть интересны и востребованы для понимания механизмов канцерогенеза. Основные направления развития и применения метода в будущем, видимо, связаны с получением новых данных о специфичности и частоте разрывов

в разных участках ДНК (например, субтеломерных участках, фрагильных сайтах хромосом и др.) и выяснением их взаимосвязи с развитием патологических процессов.

Список литературы

1. Бочков Н.П., Никитина В.А., Воронина Е.С., Кулешов Н.П. Методическое пособие по тестированию клеточных трансплантатов на генетическую безопасность // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2009. — №4. — С. 183–190.
2. Жанатаев А.К., Никитина В.А., Воронина Е.С., Дурнев А.Д. Методические аспекты оценки ДНК-повреждений методом ДНК-комет // Прикладная токсикология. — 2011. — 2(4). — С. 28–37.
3. Никитина В.А., Катосова Л.Д., Чаушева А.И., Платонова В.И., Воронина Е.С., Жанатаев А.К., Дурнев А.Д. Исследование генотоксичности бромата калия // Мед. генетика. — 2012. — 2. — С. 38–42.
4. Arutyunyan R., Gebhart E., Hovhannisyann G., Greulich K.O., Rapp A. Comet-FISH using peptide nucleic acid probes detects telomeric repeats in DNA damaged by bleomycin and mitomycin C proportional to general DNA damage // Mutagenesis. — 2004. — Vol. 19, №5. — P. 403–408.
5. Calabretta B., Kaczmarek L., Selleri L., Torelli G., Ming P.M., Ming S.C., Mercer W.E. Growth-dependent expression of human Mr 53,000 tumour antigen messenger RNA in normal and neoplastic cells // Cancer Res. — 1986. — Vol. 46. — P. 5738–5742.
6. Collins A.R., Dobson V.L., Dusinska M., Kennedy G., Stetina R. // Mutat. Res. — 1997. — Vol. 375. — P. 183–193.
7. Cortes-Gutierrez E.I., Davila-Rodriguez M.I., Fernandez J.L., Lopez-Fernandez C., Gosalbez A., Gosalvez J. New Application of the comet assay: chromosome-comet assay // J. Histochem. Cytochem. — 2011. — Vol. 59 (7). — P. 655–660.
8. Cortes-Gutierrez E.I., Hernandez-Garza F., Garcia-Perez J.O., Davila-Rodriguez M.I., Aguado-Barrera M., Cerda-Flores R.M. Evaluation of DNA single and double strand breaks in women with cervical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques // J. Biomedicine and Biotechnology. — 2012. 2012: 385245. doi: 10.1155/2012/385245.
9. Escobar P.A., Smith M.T., Vasishta A., Hubbard A.E., Zhang L. Leukaemia-specific chromosome damage detected by comet with fluorescence in situ hybridization (comet-FISH) // Mutagenesis. — 2007. — Vol. 22, №5. — P. 321–327.
10. Gleit M., Schaeferhenrich A., Claussen U., Kuechler A., Liehr T., Weise A., Marian B., Sendt W., Pool-Zobel B.L. Comet fluorescence in situ hybridization analysis for oxidative stress-Induced DNA damage in colon cancer relevant genes // Toxicological sciences. — 2007. — Vol. 96 (2). — P. 279–284.
11. Gleit M., Schlormann W. Analysis of DNA Damage and Repair by Comet Fluorescence In Situ Hybridization (Comet-FISH) // Methods Mol. Biol. — 2014. — Vol. 1094. — P. 39–48.
12. Harreus U.A., Kleinsasser N.H., Zieger S., Wallner B., Reiter M., Schuller P., Berghaus A. Sensitivity to DNA-damage induction and chromosomal alterations in mucosa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of comet assay and fluorescence in situ hybridization // Mutat. Res. — 2004. — Vol. 563(2). — P. 131–138.
13. Horvathova E., Dusinska M., Shaposhnikov S., Collins A.R. DNA damage and repair measured in different genomic regions using the comet assay with fluorescent in situ hybridization // Mutagenesis. — 2004. — 19 (4). — P. 269–276.
14. Kas E., Chasin L.S. Anchorage of the Chinese hamster dihydrofolate reductase gene to the nuclear scaffold occurs in an intragenic region // J. Mol. Biol. — 1987. — Vol. 198. — P. 677–692.
15. Klaude M., Eriksson S., Nygren J., Ahnstrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations // Mutat. Res. — 1996. — Vol. 363. — P. 89–96.
16. Kumaravel T.S., Bristow R.G. Detection of genetic instability at HER-2/neu and p53 loci in breast cancer cells using comet-FISH // Breast Cancer Res. Treat. — 2005. — Vol. 91 (1). — P. 89–93.
17. Liehr T., Starke H., Weise A., Lehrer H., Claussen U. Multicolor FISH probe sets and their applications // Histol. Histopathol. — 2004. — 19 (1). — P. 229–237.
18. McKenna D.J., Rajab N.F., McKeown S.R., McKerr G., McKelvey-Martin V.J. Use of the comet-FISH assay to demonstrate repair of the TP53 gene region in two human bladder carcinoma cell lines // Radiation research. — 2003. — Vol. 159. — P. 49–56.
19. Meybodi A.M., Mozdarani H. DNA Damage in leukocytes from Fanconi anemia (FA) patients and heterozygotes induced by mitomycin C and ionizing radiation as assessed by the comet and comet-FISH assay // Iranian Biomedical Journal. — 2009. — Vol. 13 (1). — P. 1–8.
20. Mladinic M., Zeljezic D., Shaposhnikov S.A., Collins A.R. The use of FISH-comet to detect c-Myc and TP53 damage in extended-term lymphocyte cultures treated with terbuthylazine and carbofuran // Toxicology Letters. — 2012. — Vol. 211. — P. 62–69.
21. Pronk J.C., Gibson R.A., Savoia A., Wijker M., Morgan M.V., Melchionda S., Ford D., Temtamy S., Ortega J.J., Jansen S. Localization of the Fanconi anemia complementation group A gene to chromosome 16q24.3 // Nat. Genet. — 1995. — Vol. 11. — P. 338–340.
22. Rapp A., Bock C., Dittmar H., Greulich K.O. UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by comet-fish depends on gene density and not on the chromosome size // J. Photochem. Photobiol. B. — 2000. — 56 (2–3). — P. 109–117.
23. Santos S.J., Singh N.P., Natarajan A.T. Fluorescence in situ hybridization with comets // Exp. Cell Res. — 1997. — 1. — 232 (2). — P. 407–411.
24. Shaposhnikov S., Frengen E., Collins A.R. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization — a review // Mutagenesis. — 2009. — Vol. 24 (5). — P. 383–389.
25. Shaposhnikov S.A., Salenko V.B., Brunborg G., Nygren J., Collins A.R. Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): Loops or fragments? // Electrophoresis. — 2008. — Vol. 29. — P. 3005–3012.

Combination of methods of gel-electrophoresis for individual cells (comet assay) and fluorescence hybridization *in situ* (FISH) for evaluation of DNA damage

Nikitina V.A.¹, Zhanataev A.K.², Chausheva A.I.¹, Kucev S.I.¹

¹ — Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences

² — V.V. Zakusov Institute of Pharmacology Russian Academy of Medical Sciences

This article has described the technical features and detailed protocol using combination methods of gel-electrophoresis for individual cells (comet assay) and fluorescence hybridization *in situ* (FISH). The examples of the application of methodologically different approaches of described techniques in the solution of fundamental and applied scientific problems have considered.

Key words: gel-electrophoresis of individual cells, comet assay, fluorescent hybridization *in situ*, comet-FISH, DNA damage

Поиск ассоциаций полиморфных вариантов гена рецептора витамина D (*VDR*) с остеоартритом и дисплазией соединительной ткани

Тюрин А.В.^{1,2}, Хусаинова Р.И.¹, Хуснутдинова Н.Н.¹, Давлетшин Р.А.², Хуснутдинова Э.К.¹

¹ — Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа; e-mail: anton.bgmu@gmail.com

² — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации

Проведено изучение полиморфных вариантов *rs2228570* (с.2T/A/C/G, *Met1Lys/Arg/Thr*, *FokI*, *rs10735810*), *rs1544410* (с.1024+283G>A; *BsmI*), *rs7975232* (с.1025-49G>T, *ApaI*), *rs731236* (с.1056T>C, *TaqI*) гена рецептора витамина D (*VDR*) у женщин, страдающих остеоартритом (ОА) и имеющих признаки дисплазии соединительной ткани. Обнаружена значимость аллеля *VDR*G* и генотипа *VDR*G*G* локуса *rs1544410* в развитии ОА в сочетании с дисплазией соединительной ткани (ДСТ), генотипа *VDR*G*T* локуса *rs7975232* с риском возникновения изолированного полиостеоартрита (ПОА) и сочетанной патологии. Гаплотип **CTG* ассоциирован с повышенным риском развития ПОА, гаплотип **CGG* — с повышенным риском развития ДСТ, гаплотип **CTA* снижает риск развития ОА в сочетании с ДСТ.

Ключевые слова: рецептор витамина D, остеоартрит, дисплазия соединительной ткани

Введение

Остеоартрит (ОА) — заболевание сложной этиологии, в основе которого лежит поражение всех компонентов сустава: хряща, субхондральной кости, синовиальной оболочки, связок, капсулы околосуставных мышц [6, 11]. Распространенность ОА в популяции на 1997 г. составляла 6,43%, увеличившись к 2009 г. до 12% [12, 31]. Отмечается тенденция к раннему развитию ОА, все больше людей 40—45 лет страдают данной патологией, что ведёт к раннему снижению трудоспособности и качества жизни больных. ОА — многофакторное заболевание, возникает в результате взаимодействия генетических и средовых факторов. Установленными факторами, способствующими развитию ОА, являются избыточная масса тела, снижение уровня женских половых гормонов, пороки развития костей и суставов, операции на суставах в анамнезе, профессиональные и спортивные травмы [17, 26]. Однако ещё предстоит идентифицировать генетические факторы предрасположенности к ОА и состояния, способствующие развитию дегенеративных процессов в суставе. Одним из таких состояний является синдром дисплазии соединительной ткани.

Дисплазия соединительной ткани (ДСТ) — генетически детерминированное нарушение развития соединительной ткани в эмбриональном и постнатальном периодах, характеризующееся дефектами волокнистых структур и основного вещества, приводящее к расстройству гомеостаза на тканевом, органном и организменном уровнях в виде различных морфофункциональных нарушений висцеральных и локомоторных органов с прогрессирующим течением [10]. Эти изменения затрагивают коллагеновые, эластические фибриллы, гликопротеиды, протеогликаны и фибробласты и могут ускорять дегене-

ративные процессы в соединительной ткани, в частности в суставном хряще, что патогенетически сходно с развитием ОА. На сегодняшний день связь заболеваний опорно-двигательного аппарата и ДСТ освещена недостаточно широко. В связи с этим, вопрос коморбидности ОА и ДСТ требует дальнейшей разработки. Очевидно, что генетический фактор играет значительную роль в патогенезе данных состояний. В настоящее время изучается более 30 кандидатных генов. Один из них — ген рецептора витамина D (ген *VDR*), который расположен на хромосоме 12q12-q14, рядом с геном коллагена 2-го типа, и оказывает существенное влияние на метаболизм хрящевой ткани. Рецепторы витамина D широко представлены в организме и обнаружены, по меньшей мере, в 35 органах и тканях, причём не только в таких классических органах-мишенях для витамина D, как кишечник, почки и кости, но и в мозге, сердце, поджелудочной и парашитовидных железах, коже, хряще и других органах и тканях. Известно, что дефицит витамина D ассоциирован с рахитом в детском возрасте и остеопорозом у взрослых. Долгое время витамину D отводилась роль гормона-регулятора гомеостаза кальция и фосфора в организме, однако за последнее время накоплены убедительные данные о его роли во многих других биологических процессах, в том числе и в регуляции иммунной системы [7]. Вследствие рецепторного влияния витамин D оказывает воздействие на биологические реакции организма через транскрипцию генов (геномный механизм) и быстрые реакции «внегеномного» генеза. За последние годы обнаружено множество генов, работа которых регулируется данным витамином. Эти участки, названные VDRE (от vitamin D response elements), примыкают к генам, активируемым белковым комплексом VDR-RXR (от retinoic

acid X receptor). Витамин D предотвращает воспаление, блокируя взаимодействие иммунных клеток посредством цитокинов. Также исследования последних лет показывают существенное влияние рецепторов витамина D на клеточную пролиферацию [9]. Принимая во внимание патогенез ОА и ДСТ, представляется целесообразным изучить влияние полиморфных вариантов гена рецептора витамина D на их развитие.

Целью исследования является оценка роли полиморфных вариантов rs2228570 (с.2Т>А/Г/С, р.Met1>Lys/Arg/Thr; *FokI*, rs10735810), rs1544410 (с.1024+283G>А; *BsmI*), rs7975232 (с.1025-49G>Т, *ApaI*), rs731236 (с.1056Т>С, *TaqI*) гена рецептора витамина D (*VDR*) в развитии остеоартрита в целом и с учётом локализации патологического процесса (ОА коленного сустава (гонартрит, ГА), тазобедренного сустава (коксоартрит, КА), генерализованная форма (полиостеоартрит, ПОА)), а также в сочетании с дисплазией соединительной ткани (ДСТ).

Материал и методы исследования

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 255 женщин в возрасте от 23 до 61 года, средний возраст 51,4±2,2 года, находившихся на лечении в терапевтическом отделении ГКБ №18 г.Уфы. Все женщины заполнили анкеты, прошли подробный медицинский осмотр. В анкету включена информация о возрасте на момент постановки диагноза, весе, росте, наличии вредных привычек и перенесённых заболеваниях. ОА диагностировался на основании критериев Американской ассоциации ревматологов (1995 г.). Наличие и степень тяжести ДСТ оценивали клинически, с помощью фенотипической таблицы Т.И. Кадуриной [5]. Каждому признаку соответствовала определённая диагностическая значимость, выраженная в баллах. Степень тяжести ДСТ оценивали по сумме баллов — 0—8 — отсутствие ДСТ, 9—14 — лёгкая степень, более 15 — выраженная степень.

Из 255 обследованных женщин ОА был выявлен у 110 пациенток (43%). Изолированный гонартрит обнаружен у 58 больных (52,73%), коксоартрит — у 25 (22,73%), полиостеоартрит — у 27 пациентов (24,54%).

Среди 255 обследованных женщин у 120 была диагностирована ДСТ (47,1%), из них лёгкой степени у 92 (76,7%), выраженной — у 28 (23,3%). ОА в сочетании с ДСТ наблюдался у 70 пациенток (27,4%), у 40 (15,6%) пациенток с ОА признаки ДСТ отсутствовали. У 45 женщин с ДСТ (17,6%) отсутствовали признаки дегенеративных поражений суставов.

Контрольную группу составили 145 женщин без признаков дегенеративного поражения суставов, соответствующие по возрасту группе сравнения. Исследование одобрено биоэтическими комитетами ИБГ УНЦ РАН и БГМУ.

В состав исследуемых выборок вошли представители трех этносов, являющихся наиболее многочисленными этническими группами Республики Башкортостан. Большую часть составили русские (36,4%), далее татары (35,6%), существенно меньше было башкир (8,8%), метисов и представителей иных национальностей (19,2%). При сравнении распределения частот аллелей и генотипов исследуемых полиморфизмов гена *VDR* не было обнаружено статистически значимой разницы между сравниваемыми группами в зависимости от их этнической принадлежности, что позволило нам рассматривать выборки без учёта их происхождения.

ДНК выделена из венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [24]. Генотипирование полиморфных вариантов гена *VDR* осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК, с использованием праймеров, описанных ранее [21, 23], полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), с применением эндонуклеаз рестрикции *FokI*, *TaqI*, *BsmI*, *ApaI*, в соответствии с рекомендациями фирм-производителей, последующим электрофорезом в 7%-ном полиакриламидном геле, окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в проходящем УФ-свете.

Статистическую обработку результатов исследования проводили посредством пакета программ статистического анализа Statistica 6.1. Для оценки неравновесия по сцеплению и анализа гаплотипов применяли программу HaploView 4.2.

Результаты исследования

Исследование проводилось в 3 этапа:

1) оценка роли полиморфных вариантов гена *VDR* на развитие ОА в целом, а также с учётом различной локализации патологического процесса (гонартрит, коксоартрит и полиостеоартрит), контролем служили женщины без ОА, оценка наличия ДСТ не проводилась;

2) анализ влияния полиморфных вариантов гена *VDR* на степень тяжести ДСТ. Контролем служили женщины без ДСТ, наличие суставной патологии не оценивалось;

3) поиск ассоциаций полиморфных вариантов гена *VDR* с развитием ОА в сочетании с ДСТ, а также с изолированными случаями ОА и ДСТ. Были сформированы 3 группы, в которые вошли пациентки с изолированной и сочетанной патологией, которые в дальнейшем сравнивались между собой и с контролем, где были женщины без ОА и ДСТ (табл. 1).

Распределение частот аллелей и генотипов изученных локусов гена *VDR* соответствовало равновесию Харди—Вайнберга ($p>0,05$) во всех исследуемых группах. Частота минорного аллеля варьировала от 0,212 в локусе rs1544410 (с.1056Т>С, *BsmI*) до 0,487 в локусе rs7975232 (с.1025-49G>Т, *ApaI*).

Распределение частот аллелей и генотипов изученных локусов гена *VDR*

Обследованные группы	n	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
1	2	3	4	5	6	7
<i>rs1544410 (c. 1024+283G>A; BsmI)</i>						
	252	*G (b)	*A (B)	*G*G	*G*A	*A*A
Больные с ГА	57	(73) 0,640	(41) 0,360	(24) 0,421	(25) 0,438	(8) 0,141
Больные с КА	24	(31) 0,646	(17) 0,354	(11) 0,458	(9) 0,375	(4) 0,167
Больные с ПОА	26	(41) 0,788	(11) 0,212	(18) 0,692	(5) 0,193	(3) 0,115
Больные ОА	107	(146) 0,682	(68) 0,318	(52) 0,486	(40) 0,374	(15) 0,140
Контроль без ДСТ	145	(172) 0,593	(118) 0,407	(57) 0,393	(58) 0,400	(30) 0,207
ОА+ ДСТ+	69	(99) 0,717	(39) 0,283	(38) 0,550	(23) 0,334	(8) 0,116
ОА+ ДСТ–	40	(49) 0,613	(31) 0,387	(16) 0,400	(17) 0,425	(7) 0,175
ОА– ДСТ+	45	(58) 0,644	(32) 0,356	(20) 0,444	(17) 0,378	(8) 0,178
ОА– ДСТ–	98	(110) 0,561	(86) 0,439	(35) 0,357	(40) 0,408	(23) 0,235
Контроль без ОА	134	(152) 0,567	(116) 0,433	(48) 0,358	(56) 0,418	(30) 0,224
ДСТ 1	90	(126) 0,700	(54) 0,300	(45) 0,500	(36) 0,400	(9) 0,100
ДСТ 2	28	(39) 0,696	(17) 0,304	(17) 0,607	(5) 0,179	(6) 0,214
ДСТ 1+2	118	(165) 0,699	(71) 0,301	(62) 0,525	(41) 0,347	(15) 0,128
<i>rs7975232 (c. 1025-49G>T, ApaI)</i>						
	251	*G (a)	*T (A)	*G*G	*G*T	*T*T
Больные с ГА	58	(57) 0,491	(59) 0,509	(11) 0,189	(35) 0,604	(12) 0,207
Больные с КА	24	(23) 0,479	(25) 0,521	(6) 0,250	(11) 0,458	(7) 0,292
Больные с ПОА	26	(23) 0,442	(29) 0,558	(1) 0,039	(21) 0,807	(4) 0,154
Больные ОА	108	(103) 0,477	(113) 0,523	(18) 0,167	(67) 0,620	(23) 0,213
Контроль без ДСТ	143	(122) 0,427	(164) 0,573	(21) 0,147	(80) 0,559	(42) 0,294
ОА+ ДСТ+	70	(65) 0,464	(75) 0,536	(8) 0,114	(49) 0,700	(13) 0,186
ОА+ ДСТ–	40	(40) 0,500	(40) 0,500	(10) 0,250	(20) 0,500	(10) 0,250
ОА– ДСТ+	43	(42) 0,488	(44) 0,512	(9) 0,209	(24) 0,558	(10) 0,233
ОА– ДСТ–	98	(78) 0,398	(118) 0,602	(12) 0,122	(54) 0,551	(32) 0,327
Контроль без ДСТ	134	(111) 0,414	(157) 0,586	(19) 0,142	(73) 0,545	(42) 0,313
ДСТ 1	89	(84) 0,472	(94) 0,528	(13) 0,146	(58) 0,652	(18) 0,202
ДСТ 2	28	(30) 0,536	(26) 0,464	(7) 0,250	(16) 0,571	(5) 0,179
ДСТ 1+2	117	(114) 0,487	(120) 0,513	(20) 0,171	(74) 0,632	(23) 0,197
<i>rs731236 (c. 1056T>C, TaqI)</i>						
	255	*T (t)	*C (T)	*T*T	*T*C	*C*C
Больные с ГА	59	(40) 0,339	(78) 0,661	(8) 0,136	(23) 0,390	(28) 0,474
Больные с КА	24	(16) 0,333	(32) 0,667	(4) 0,167	(8) 0,333	(12) 0,500
Больные с ПОА	27	(14) 0,259	(40) 0,741	(2) 0,074	(10) 0,370	(15) 0,556
Больные ОА	110	(68) 0,309	(152) 0,691	(13) 0,118	(41) 0,373	(56) 0,509
Контроль без ДСТ	145	(90) 0,310	(200) 0,690	(14) 0,097	(63) 0,434	(68) 0,469
ОА+ ДСТ+	70	(40) 0,286	(100) 0,714	(9) 0,129	(24) 0,343	(37) 0,520
ОА+ ДСТ–	40	(27) 0,338	(53) 0,662	(5) 0,125	(17) 0,425	(18) 0,450
ОА– ДСТ+	45	(39) 0,433	(51) 0,567	(5) 0,111	(19) 0,422	(21) 0,467
ОА– ДСТ–	100	(66) 0,330	(134) 0,670	(17) 0,170	(43) 0,430	(40) 0,400
Контроль без ДСТ	135	(88) 0,326	(182) 0,674	(14) 0,104	(60) 0,444	(61) 0,452
ДСТ 1	92	(59) 0,321	(125) 0,679	(11) 0,120	(37) 0,402	(44) 0,478
ДСТ 2	28	(13) 0,232	(43) 0,768	(3) 0,107	(7) 0,250	(18) 0,643
ДСТ 1+2	120	(72) 0,300	(168) 0,700	(14) 0,117	(44) 0,367	(62) 0,516

Таблица 1 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7
rs2228570 (с.2Т>А/Г/С, р.Met1/Lys/Arg/Thr; FokI, rs10735810)						
	241	*Т (f)	*А (F)	*Т*Т	*Т*А	*А*А
Больные с ГА	55	(40) 0,364	(70) 0,636	(8) 0,146	(24) 0,436	(23) 0,418
Больные с КА	23	(20) 0,435	(26) 0,565	(5) 0,217	(10) 0,435	(8) 0,348
Больные с ПОА	25	(22) 0,440	(28) 0,560	(4) 0,160	(14) 0,560	(7) 0,280
Больные ОА	103	(82) 0,398	(124) 0,602	(18) 0,174	(47) 0,456	(38) 0,370
Контроль без ДСТ	138	(104) 0,377	(172) 0,623	(21) 0,152	(62) 0,449	(55) 0,399
ОА+ ДСТ+	65	(49) 0,377	(81) 0,623	(9) 0,138	(31) 0,477	(25) 0,385
ОА+ ДСТ–	40	(35) 0,438	(45) 0,562	(9) 0,225	(17) 0,425	(14) 0,350
ОА– ДСТ+	43	(32) 0,372	(54) 0,628	(5) 0,116	(22) 0,512	(16) 0,372
ОА– ДСТ–	93	(70) 0,376	(116) 0,624	(15) 0,161	(40) 0,430	(38) 0,409
Контроль без ДСТ	129	(104) 0,403	(154) 0,597	(24) 0,186	(56) 0,434	(49) 0,380
ДСТ 1	86	(58) 0,337	(114) 0,663	(9) 0,105	(40) 0,465	(37) 0,430
ДСТ 2	26	(24) 0,462	(28) 0,538	(5) 0,192	(14) 0,539	(7) 0,269
ДСТ 1+2	112	(82) 0,366	(142) 0,634	(14) 0,125	(54) 0,482	(44) 0,393

Примечание. После названия аллелей в скобках приведены устаревшие обозначения аллелей исследуемых локусов гена *VDR* для удобства сравнения с данными литературы; ДСТ 1 — женщины с лёгкой степенью ДСТ; ДСТ 2 — женщины с выраженной степенью ДСТ; ДСТ 1+2 — женщины с признаками ДСТ

Аллель *G полиморфного варианта *rs1544410* (с.1024+283G>A; *BsmI*) чаще встречался у больных ОА (68,2%), его частота в группе контроля составила 59,3%, различия достигли уровня статистической значимости ($\chi^2 = 4,2$; $p = 0,04$). Сравнительный анализ распределения частот генотипов показал, что гетерозиготный генотип *G*A преобладает как у больных, так и в контроле (0,374 и 0,400 соответственно), отмечается тенденция накопления генотипа *VDR**A*A в группе контроля — 20,7% по сравнению с группой больных (14,0%), различия не достигают статистической значимости ($\chi^2 = 2,04$, $p = 0,15$). Таким образом, аллель *G оказался маркером повышенного риска развития ОА (OR = 1,24; 95%ДИ 1,01—1,54).

При разделении больных ОА в зависимости от локализации поражённых суставов выявлены статистически значимые различия по распределению частот аллелей и генотипов полиморфизма *rs1544410* гена *VDR* между пациентами с полиостеоартритом и контрольной группой здоровых женщин. Частоты аллелей *G и *A составили 78,8% и 21,2% у больных ПОА и 59,3% и 40,7% соответственно в группе контроля ($\chi^2 = 7,16$, $p = 0,007$). Частота генотипа *G*G варьировала от 39,3% в контроле до 69,2% у больных с полиостеоартритом ($\chi^2 = 8,01$ $p = 0,002$). Отмечалась тенденция к преобладанию гетерозиготного генотипа *G*A в группе контроля (40,0%) по сравнению с больными полиостеоартритом (19,3%) ($\chi^2 = 3,24$, $p = 0,06$). Как и в случае с ОА в целом, аллель *G полиморфизма *rs1544410* оказался маркером повышенного риска развития полиостеоартрита (OR = 2,25; 95%ДИ 1,20—4,23). Распределения частот аллелей и

генотипов полиморфного локуса *rs1544410* гена *VDR* у пациентов с ОА коленных и тазобедренных суставов существенно не отличались от таковых в группе контроля (табл. 1).

При разделении исследуемых выборок в зависимости от количества признаков ДСТ без учёта ОА обнаружено статистически значимое различие в распределении частот аллелей исследуемого локуса между женщинами с ДСТ лёгкой степени и отсутствием признаков ДСТ ($\chi^2 = 8,06$; $p = 0,004$). Частоты генотипов *G*G и *A*A локуса *rs1544410* гена *VDR* у женщин с ДСТ лёгкой степени составили 50,0% и 10,0%, что также значительно отличается от таковых в контрольной группе (0,358 и 0,235 соответственно, $\chi^2 = 4,45$ и 5,74, $p < 0,05$) (табл. 2). Показатель отношения шансов (OR) для аллеля *G составил 1,42 (95%ДИ 1,10—1,69), что свидетельствует об ассоциации данного аллеля с ДСТ, генотип *G*G также был ассоциирован с повышенным риском развития ДСТ (OR = 1,42; 95%ДИ 1,09—1,85). Аллель *A оказался протективным (OR = 0,72; 95%ДИ 0,59—0,90 и OR = 0,66; 95%ДИ 0,66—1,03 соответственно). При этом у женщин с выраженной ДСТ частота аллеля *G оказалась ещё выше (69,6%) по сравнению с контрольной выборкой (56,7%), что подтверждает повышенный риск ДСТ для носителей данного аллеля полиморфизма *rs1544410* гена *VDR* ($\chi^2 = 3,19$; $p = 0,07$ OR = 1,59; 95%ДИ 1,02—2,69). Генотип *G*G также чаще встречается у женщин с выраженной ДСТ (60,7%) по сравнению с группами сравнения (35,8% и 50,0% соответственно у женщин без ДСТ и с ДСТ лёгкой степени ($\chi^2 = 5,97$; $p = 0,01$; OR = 2,3; 95%ДИ 1,15—4,59) (табл. 1, 2).

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов локусов *rs1544410* и *rs7975232* между группами больных и контроля в зависимости от локализации ОА и наличия ДСТ

<i>rs1544410</i> (с.1024+283G>A; BsmI)			
I этап			
	Гонартрит	Коксоартрит	Полиостеоартрит
Контроль без ОА	*G ($\chi^2 = 0,76$; p = 0,38) *G*G ($\chi^2 = 0,13$; p = 0,35) *A*A ($\chi^2 = 1,18$; p = 0,13)	*G ($\chi^2 = 0,47$; p = 0,48) *G*G ($\chi^2 = 0,36$; p = 0,27) *A*A ($\chi^2 = 0,03$; p = 0,32)	*G ($\chi^2 = 7,16$; p = 0,007) OR = 2,25 (1,2–4,23) *G*G ($\chi^2 = 8,01$; p = 0,002) OR = 2,88 (1,32–6,25) *G*A ($\chi^2 = 3,24$; p = 0,06)
II этап			
	ДСТ лёгкая	ДСТ тяжёлая	ДСТ лёгкая + тяжёлая
Контроль без ДСТ	*G ($\chi^2 = 8,06$; p = 0,004; OR = 1,42 (1,1–1,84) *G*G ($\chi^2 = 4,45$; p = 0,03) OR = 1,40 (1,02–1,93) *A*A ($\chi^2 = 5,74$; p = 0,01) OR = 0,52 (0,29–0,95)	*G ($\chi^2 = 3,19$; p = 0,07) *G*G ($\chi^2 = 5,97$; p = 0,01) OR = 2,3 (1,15–4,59) *G*A ($\chi^2 = 5,65$; p = 0,01) OR = 0,35 (0,14–0,86)	*G ($\chi^2 = 9,36$; p = 0,001) OR = 1,37 (1,1–1,69) *G*G ($\chi^2 = 7,13$; p = 0,007) OR = 1,42 (1,09–1,85) *A*A ($\chi^2 = 4,0$; p = 0,045) OR = 0,66 (0,66–1,03)
III этап			
	ОА– ДСТ+	ОА+ ДСТ–	ОА+ ДСТ+
Контроль без ОА и ДСТ	*G ($\chi^2 = 1,82$; p = 0,17) *G*G ($\chi^2 = 0,93$; p = 0,33) *A*A ($\chi^2 = 0,5$; p = 0,47)	*G ($\chi^2 = 0,64$ p = 0,42) *G*G ($\chi^2 = 0,19$ p = 0,65) *A*A ($\chi^2 = 0,51$ p = 0,47)	*G ($\chi^2 = 8,43$; p = 0,003; OR = 1,51 (1,12–2,04) *G*G ($\chi^2 = 6,16$; p = 0,01) OR = 1,57 (1,09–2,26) *A*A ($\chi^2 = 3,77$; p = 0,051)
ОА– ДСТ+		*G ($\chi^2 = 0,16$ p = 0,66) *G*G ($\chi^2 = 0,66$ p = 0,3) *A*A ($\chi^2 = 0,5$ p = 0,43)	*G ($\chi^2 = 1,3$ p = 0,24) *G*G ($\chi^2 = 1,2$ p = 0,26) *A*A ($\chi^2 = 0,86$ p = 0,35)
ОА+ ДСТ–			*G ($\chi^2 = 2,55$; p = 0,1) *G*G ($\chi^2 = 2,3$ p = 0,12) *G*A ($\chi^2 = 0,74$ p = 0,38)
<i>rs7975232</i> (с.1025–49G>T, ApaI)			
I этап			
	Гонартрит	Коксоартрит	Полиостеоартрит
Контроль без ОА	*G ($\chi^2 = 1,4$; p = 0,23) *G*G ($\chi^2 = 0,56$; p = 0,22) *T*T ($\chi^2 = 1,5$; p = 0,1)	*G ($\chi^2 = 0,46$; p = 0,5) *G*G ($\chi^2 = 1,6$; p = 0,35) *T*T ($\chi^2 = 1,82$; p = 0,29)	*G ($\chi^2 = 0,004$; p = 0,8) *G*G ($\chi^2 = 1,4$; p = 0,23) *G*T ($\chi^2 = 4,65$; p = 0,008) OR = 2,8 (1,12–7,13)
II этап			
	ДСТ лёгкая	ДСТ тяжёлая	ДСТ лёгкая + тяжёлая
Контроль без ДСТ	*G ($\chi^2 = 1,44$; p = 0,22) *G*G ($\chi^2 = 0,007$; p = 0,9) *T*T ($\chi^2 = 3,36$; p = 0,06)	*G ($\chi^2 = 2,78$; p = 0,95) *G*G ($\chi^2 = 2,01$; p = 0,15) *T*T ($\chi^2 = 2,04$; p = 0,15)	*G ($\chi^2 = 2,69$; p = 0,1) *G*G ($\chi^2 = 0,4$; p = 0,5) *T*T ($\chi^2 = 4,59$; p = 0,03) OR = 0,69 (0,48–0,99)
III этап			
	ОА– ДСТ+	ОА+ ДСТ–	ОА+ ДСТ+
Контроль без ОА и ДСТ	*G ($\chi^2 = 1,92$; p = 0,16) *G*G ($\chi^2 = 1,91$; p = 0,16) *T*T ($\chi^2 = 1,35$; p = 0,24)	*G ($\chi^2 = 2,33$; p = 0,12) *G*G ($\chi^2 = 3,44$; p = 0,063) *T*T ($\chi^2 = 0,85$; p = 0,35)	*G ($\chi^2 = 1,39$; p = 0,23) *G*T ($\chi^2 = 3,82$; p = 0,049) OR = 1,47 (0,98–2,21) *T*T ($\chi^2 = 4,46$; p = 0,034) OR = 0,61 (0,37–1,0)
ОА– ДСТ+		*G ($\chi^2 = 0,02$; p = 0,88) *G*G ($\chi^2 = 0,19$; p = 0,65) *T*T ($\chi^2 = 0,03$; p = 0,85)	*G ($\chi^2 = 1,3$; p = 0,24) *G*G ($\chi^2 = 1,2$; p = 0,26) *T*T ($\chi^2 = 0,86$; p = 0,35)
ОА+ ДСТ–			*G ($\chi^2 = 1,6$; p = 0,2) *G*G ($\chi^2 = 3,42$; p = 0,06) *G*T ($\chi^2 = 4,35$; p = 0,03) OR = 1,38 (0,99–1,93)

При оценке распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs1544410* гена *VDR* в группах пациентов с ОА и ДСТ и без таковой, а также между женщинами без ОА, но с признаками ДСТ и здоровыми женщинами без ДСТ значимых различий обнаружено не было.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs7975232* (*c.1025-49G>T, ApaI*) гена *VDR* между группами больных ОА и контроля существенных различий не выявил. При исследовании групп больных с различной локализацией ОА отмечается большая доля генотипа **G*T* у больных с полиостеоартритом (80,7%) по сравнению с контрольной группой (55,9%). Различия достигли уровня статистической значимости ($\chi^2 = 5,6$; $p = 0,008$), данный генотип является рисковым для развития полиостеоартрита (OR = 2,8; 95%ДИ 1,12—7,13).

Существенных различий в распределении частот аллелей локуса *rs7975232* в исследуемых группах в зависимости от степени тяжести ДСТ выявлено не было. При этом частота генотипа **T*T* снижалась от 31,3% в группе женщин без ДСТ до 20,2% у женщин с ДСТ лёгкой степени ($\chi^2 = 3,36$; $p = 0,06$) и 19,7% у женщин с ДСТ в целом, таким образом, данный генотип оказался маркером пониженного риска развития ДСТ, достигая статистически значимых различий между группами женщин с ДСТ и контрольной группой ($\chi^2 = 4,59$; $p = 0,03$; OR = 0,69; 95%ДИ 0,48—0,99).

В группе пациенток с ОА и ДСТ отмечалась более высокая частота генотипа **G*T* (70%) локуса *rs7975232*, чем у пациенток с ОА без ДСТ (50%). Различия достигли уровня статистической значимости ($\chi^2 = 4,35$; $p = 0,03$). Напротив, отмечалась тенденция к преобладанию генотипа **G*G* в группе пациенток с ОА без признаков ДСТ по сравнению с женщинами без ОА и ДСТ — 11,4% и 25% соответственно ($\chi^2 = 3,44$; $p = 0,063$). Генотип **G*T* ассоциирован с повышенным риском наличия ДСТ у пациенток с ОА (OR = 1,38; 95%ДИ 1,01—1,93).

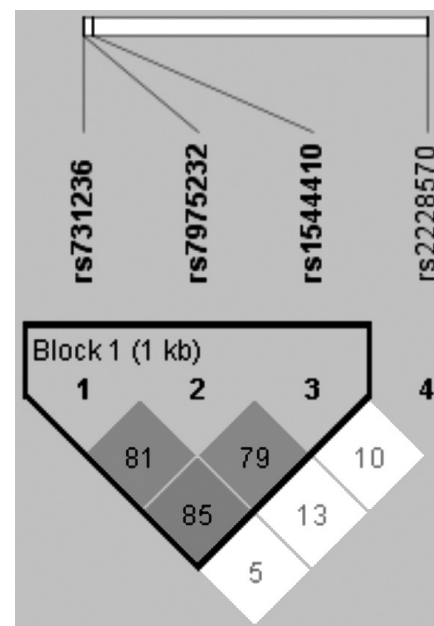
При анализе распределения частот и генотипов полиморфных вариантов *rs2228570* (*c.2T>A, Met1Lys/Arg/Thr; FokI*) и *rs731236* (*c.1056T>C, TaqI*) статистически значимых различий между группами сравнения обнаружено не было (табл. 1).

Эффекты отдельных маркёров, выявляемые при классическом анализе ассоциаций, как правило, невелики и могут быть связаны не с самим изучаемым маркером, а со сцепленным с ним функционально значимым вариантом. В силу этого анализ ассоциаций на уровне гаплотипов может оказаться более мощным и информативным средством, чем изучение отдельных маркёров [14]. Мы провели оценку сцепления изученных локусов гена *VDR* с последующим сравнительным анализом гаплотипов. Выявлено, что полиморфные варианты *rs1544410* (*c.1024+283G>A; BsmI*), *rs7975232* (*c.1025-49G>T, ApaI*) и *rs731236* (*c.1056T>C, TaqI*) находятся в неравновесии по сцеплению ($D' > 0,75$) (рисунок). В группах больных ОА выявлено 7 гаплоти-

пов локусов *rs1544410*, *rs7975232* и *rs731236*, в группе контроля — 6. Сравнительный анализ показал, что у женщин контрольной группы статистически значимо чаще встречался гаплотип **CTA* ($\chi^2 = 6,95$; $p = 0,034$), который был ассоциирован со сниженным риском развития ОА (OR = 0,47; 95%ДИ 0,24—0,91). При анализе распределения частот гаплотипов в зависимости от выраженности ДСТ прослеживаются сходные закономерности — гаплотип **CTA* являлся маркером сниженного риска ДСТ в целом, а также изолированной ДСТ (табл. 3).

Обсуждение

Несколько групп исследователей проводили поиск ассоциаций полиморфных вариантов гена *VDR* с заболеваниями опорно-двигательного аппарата. Результаты исследований противоречивы и нуждаются в уточнении. Одним из наиболее изученных локусов является *rs1544410* (*c.1024+283G>A; BsmI*). Аллель **B* (**A*) оказался ассоциированным с выраженностью остеофитов при спондилоартрите в британской популяции [19]. В работе отечественных исследователей у пациенток старше 50 лет с тяжёлым ОА коленных суставов выявлено накопление генотипа **B*B* (**A*A*) локуса *BsmI* гена *VDR* по сравнению с контрольной группой, генотип **B*b* (**A*G*) был протективным [8]. По результатам наших исследований аллель **G* и генотип **G*G* локуса *BsmI* (*rs1544410*) ассоциированы с повышенным риском развития полиостеоартрита, генотип **A*A* является по данному параметру протективным, что не согласуется с результатами, приведёнными выше.



Анализ неравновесия по сцеплению локусов гена *VDR* (показано значение D')

Анализ гаплотипов полиморфных локусов *rs1544410* (с.1024+283G>A; *BsmI*),
rs7975232 (с.1025-49G>T, *ApaI*) и *rs731236* (с.1056T>C, *TaqI*) гена *VDR*

Выборки	Частоты гаплотипов						
	*CGG	*TTA	*CTG	*CTA	*CGA	*TGG	*TTG
Больные ОА	0,427	0,261	0,213	0,032	0,018	0,024	0,016
Контроль	0,377	0,279	0,192	0,092	0,027	0,019	0,008
χ^2	1,41	0,314	0,365	6,956	0,606	0,119	0,652
p	0,705	0,991	0,987	0,034	0,958	0,999	0,951
Отношение шансов (OR)	—	—	—	0,47 (0,24—0,91)	—	—	—
ГА	0,432	0,310	0,191	0,020	0,024	0,022	—
χ^2	0,572	0,168	0,001	2,818	0,046	0,002	—
p	0,937	0,997	1	0,328	1	1	—
Отношение шансов (OR)	—	—	—	—	—	—	—
КА	0,448	0,297	0,175	0,028	0,023	0,016	—
χ^2	1,766	0,120	0,161	4,992	0,800	0,308	—
p	0,626	0,999	0,997	0,103	0,894	0,991	—
Отношение шансов (OR)	—	—	—	—	—	—	—
ПОА	0,372	0,162	0,309	0,040	0,019	0,059	0,038
χ^2	0,001	3,280	3,768	1,614	0,196	2,366	3,35
p	1	0,294	0,208	0,666	0,998	0,460	0,280
Отношение шансов (OR)	—	—	—	—	—	—	—
Выборка с ДСТ	0,446	0,254	0,217	0,027	0,010	0,024	0,012
Выборка без ДСТ	0,355	0,292	0,186	0,097	0,036	0,018	0,010
χ^2	4,366	0,932	0,732	10,312	3,514	0,199	0,049
p	0,165	0,889	0,931	0,0054	0,276	0,997	1
Отношение шансов (OR)	—	—	—	0,43 (0,22—0,84)	—	—	—
Больные ОА с ДСТ	0,386	0,329	0,201	0,014	0,028	0,033	0,008
Выборка с ОА и без ДСТ	0,405	0,257	0,200	0,075	0,023	0,019	0,012
χ^2	0,104	1,722	0,001	4,063	0,058	0,635	0,096
p	0,999	0,657	1	0,193	1	0,962	0,999
Отношение шансов (OR)	—	—	—	—	—	—	—
Выборка с ДСТ и без ОА	0,449	0,295	0,181	0,026	0,220	0,020	—
Контроль без ДСТ и ОА	0,340	0,279	0,196	0,119	0,032	0,022	—
χ^2	3,146	0,078	0,081	6,565	0,256	0,008	—
p	0,268	0,999	0,999	0,0375	0,993	1	—
Отношение шансов (OR)	—	—	—	0,34 (0,11—0,01)	—	—	—
Примечание. В графе OR в скобках указаны 95%-ные доверительные интервалы (ДИ)							

Генотип $*b*b$ ($*G*G$) полиморфного варианта *BsmI* чаще встречался у лиц с врождённой аплазией коленного сустава в итальянской популяции [16], что отчасти согласуется с результатами наших исследований. В опубликованных результатах метаанализов также наблюдаются противоречивые данные, однако прослеживается определённая закономерность в зависимости от этнического состава исследуемой популяции. Так, метаанализ ассоциаций полиморфных вариантов гена *VDR* с риском развития остеопороза показал, что аллель $*b$ ($*G$) является в общей выборке протективным (OR = 0,93), однако после разделения по этническому признаку для данного аллеля усилился протективный эффект в азиатских популяциях (OR = 0,31), в то время как у европеоидов аллель $*b$ стал ближе к рисковому (OR = 0,93, ДИ 0,86—1,16) [33]. В другом метаанализе были взяты результаты 41 исследования влияния полиморфного варианта *BsmI* на развитие остеопороза. В общей выборке аллель $*B$ ($*A$) являлся маркёром повышенного риска как у азиатов, как и у европейцев (OR = 1,05 и OR = 1,04 соответственно), однако после исключения авторами исследований, результаты которых не удовлетворяют критерию Харди—Вайнберга, показатели существенно изменились — OR = 0,94 и OR = 0,78 соответственно. Данные приведённых выше метаанализов демонстрируют гетерогенность приводимых в литературе результатов [15].

Данных о влиянии локуса *ApaI* на развитие ОА в литературе встречается меньше. Исследование 789 британских пациентов обоего пола выявило ассоциацию генотипа $*A*a$ ($*G*T$) полиморфного варианта *ApaI* со сниженным риском развития ОА (OR = 0,59), а также генотипа $*f*f$ ($*T*T$) полиморфного варианта *FokI* с увеличением данного риска (OR = 1,6) [25]. Согласно нашим данным, генотип $*G*T$ локуса *ApaI* (*rs7975232*) ассоциирован с риском развития полиостеоартрита. Генотип $*G*G$ имеет выраженную тенденцию к накоплению у больных с ОА без ДСТ. Также генотип $*T*T$ снижает риск развития ОА в сочетании с ДСТ.

Наличие генотипов $*A*A$ и $*A*a$ ($*G*T$ и $*T*T$) усиливало риск развития дегенеративных процессов в хряще межпозвоночных дисков у китайцев обоего пола среднего возраста [29]. Аналогичные результаты были получены исследователями в Египте, более того, генотип $*G*T$ был ассоциирован с выраженностью дегенеративных изменений, по данным МРТ-исследования [30], что согласуется с результатами, полученными нами о роли генотипа $*G*T$ локуса *ApaI* (*rs7975232*) гена *VDR* в развитии дегенеративных процессов хрящевой ткани. В наиболее актуальном метаанализе, посвящённом влиянию полиморфных вариантов гена *VDR* на развитие ОА, отмечается роль аллеля $*A$ ($*T$) полиморфного варианта *ApaI* как маркёра повышенного риска развития ОА у пациентов азиатской этнической принадлежности и генотипа $*F*F$ ($*A*A$) полиморфного варианта *FokI* как маркёра сниженного риска [32].

Аллель $*T$ ($*C$) полиморфного варианта *TagI* ассоциирован с повышенным риском развития гонартрита по сравнению с $*t$ ($*T$), независимо от возраста, индекса

массы тела и минеральной плотности кости в исследовании немецких ученых. Вместе с тем, носительство гаплотипа $*aT$ ($*GC$) и низкое поступление кальция ассоциировано в данной популяции с развитием симметричного ОА. Также была выявлена ассоциация полиморфных вариантов *TagI* с коленным ОА у женщин постменопаузного периода раннего возраста (45—64 года) [22].

Носительство аллеля $*T$ ($*C$) или гаплотипа $*At$ ($*GC$) снижало шансы развития ОА практически вдвое (OR = 0,6), в то время как носительство двух $*a$ ($*G$) аллелей полиморфизма *ApaI* и *TagI* повышало риск развития заболевания при ОА кистей среди финской популяции женщин [27].

Не обнаружено ассоциаций полиморфных вариантов гена *VDR* и тазобедренного [13], коленного и тазобедренного суставов в бельгийской популяции, несмотря на большое количество обследованных (N = 1123). Однако влияние гена на развитие полиостеоартрита изучено в меньшей степени. Приводятся результаты исследования японских учёных, где не выявлено ассоциаций с риском развития ОА [18]. В наших исследованиях мы также не выявили ассоциаций полиморфных вариантов *TagI* и *FokI* с развитием ОА.

В ряде исследований определялось влияние не только аллелей и генотипов, но и гаплотипов на развитие той или иной патологии. Изучение полиморфных вариантов *BsmI*, *ApaI*, *TagI* гена *VDR* в датской популяции пожилых мужчин и женщин выявило существенное преобладание гаплотипа $*baT$ ($*CGG$ в нашем исследовании) у больных ОА коленного сустава, независимо от массы тела, тогда как гаплотип $*baT$ ($*CTG$) был протективным. В другом исследовании сочетание гаплотипов $*baT$ и $*4B$ *Col2A1* аллеля отмечалось ещё большим риском развития ОА [28]. Гаплотип $*baT$ был ассоциирован с более низкой костной массой у корейских женщин в постменопаузе [20]. По результатам наших исследований, гаплотип $*CTA$ является протективным в развитии ОА и ДСТ.

Влияние гена *VDR* на развитие ДСТ изучено мало. В основном изучались ассоциации полиморфных вариантов гена *VDR* с отдельными проявлениями ДСТ. В частности, при изучении роли полиморфного варианта *BsmI* в формировании минеральной плотности костной ткани у детей с признаками ДСТ существенных закономерностей выявлено не было [1]. У детей с ДСТ генотип $*T*T$ ($*C*C$) полиморфного варианта *TagI* встречается реже, а $*T*t$ ($*C*T$) чаще, чем в группе сравнения [2]. Полиморфные варианты гена *VDR* не оказывали существенного влияния на риск развития сколиоза и компрессионных переломов позвоночника у молодых парней по сравнению с позитивным и негативным контролем [4]. Установлена связь полиморфных вариантов *BsmI* и *TagI* с размерами глаз, что, в сочетании с внешними факторами, может способствовать развитию миопии [3]. По результатам наших исследований, аллель $*G$ и генотип $*G*G$ локуса *BsmI* ассоциированы с повышенным риском развития ДСТ. Наличие аллеля $*G$ зачастую приводит к сочетанной патоло-

гии, в то время как генотип **A*A* является протективным. Аллель **T* полиморфного варианта *ApaI* ассоциирован со сниженным риском развития ДСТ. В группе с ДСТ чаще встречался аллель **G*. Генотип **C*C* снижает риск развития сочетанной патологии, а генотип **A*C* увеличивает риск ДСТ у больных ОА.

Заключение

Таким образом, можно сделать вывод о существовании множества противоречивых данных о роли полиморфных вариантов гена *VDR* в развитии ОА различной локализации, в разных возрастных группах и популяциях мира, различающихся по происхождению и регионам проживания, что подтверждает важность изучения полиморфных вариантов кандидатных генов в различных регионах мира. Полученные нами результаты вносят неоценимый вклад в изучение полиморфизма человека и в выявление оптимальных ДНК-маркёров многофакторных заболеваний в целом и ОА в частности с учётом особенностей генетической структуры народов Волго-Уральского региона России.

Обнаружена значимость полиморфных вариантов *rs1544410* (с.1024+283G>A; *BsmI*) и *rs7975232* (с.1025-49G>T, *ApaI*) гена *VDR* для развития как ОА и ДСТ, так и сочетания данных патологических состояний. Среди различных локализаций ОА наиболее генетически детерминирован полиостеоартрит. Наибольший вклад в увеличение риска развития ОА и ДСТ вносят аллель **G* и генотип **G*G* локуса *BsmI*. Генотип **A*A* является маркёром пониженного риска развития ДСТ. Генотип **G*T* локуса *ApaI* увеличивает риск развития полиостеоартрита и сочетания ОА с признаками ДСТ. Генотип **T*T* служит маркёром пониженного риска развития ДСТ в целом, а также развития сочетанной патологии. Гаплотип **CTA* снижает риск развития ОА и ДСТ.

Список литературы

1. Арсентьев В.Г., Асеев М.В., Баранов В.С. и др. Исследование минеральной плотности костной ткани у детей и подростков с дисплазиями соединительной ткани // Педиатрия. — 2010. — Т. 89, №5. — С. 73—77.
2. Арсентьев В.Г., Асеев М.В., Баранов В.С., Шабалов Н.П. Результаты молекулярно-генетического обследования детей с дисплазиями соединительной ткани // Педиатрия. — 2013. — Т. 92, №4. — С. 27—30.
3. Баннур Р., Войтович А.Н., Ларионова В.И. Роль рецептора к витамину d и его генетического полиморфизма в прогнозировании течения миопии у детей // Офтальмологические ведомости. — 2010. — Т. III, №3. — С. 27—33.
4. Горбунова В.Н., Асеев М.В., Белоног О.Л. Анализ ассоциации полиморфных аллелей генов, участвующих в контроле минеральной плотности кости, со сколиозом у подростков // Медицинская генетика. — 2008. — Т. 7, №6. — С. 13—18.
5. Кадурина Т.И., Горбунова В.Н. Дисплазия соединительной ткани: Руководство для врачей. — СПб.: ЭЛБИ, 2008. — 1121 с.
6. Коваленко В.Н., Борткевич О.П. Остеоартроз: практическое руководство. — М., 2003. — 448 с.
7. Коровина Н.А., Захарова И.Н., Дмитриева Ю.А. Современные представления о физиологической роли витамина D у здоровых и больных детей // Педиатрия. — 2008. — Т. 87, №4. — С. 124—130.
8. Крылов М.Ю., Мякоткин В.А., Колесник Т.В., Алексеева Л.И. Полиморфизм гена *vdr* при остеоартрозе коленных суставов // Научно-практическая ревматология. — 2006. — №5. — URL: <http://cyberleninka.ru/article/n/polimorfizm-gena-vdr-pri-osteoartroze-kolennykh-sustavov>
9. Семин С.Г., Волкова Л.В., Моисеев А.Б., Никитина Н.В. Перспективы изучения биологической роли витамина D // Педиатрия. — 2012. — Т. 91, №2. — С. 122—131.
10. Тябут Т.Д., Каратыш О.М. Недифференцированная дисплазия соединительной ткани // Современная ревматология. — 2009. — №2. — С. 19—23.
11. Хитров Н.А. Болевой синдром при остеоартрозе // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. — 2009. — №2. — С. 62—67.
12. Цветкова Е.С. Остеоартроз // Ревматические болезни / Под ред. В.А. Насонова, Н.В. Бунчук. — М.: Медицина, 1997. — С. 335—348.
13. Aerssens J., Dequeker J., Peeters J. et al. Lack of association between osteoarthritis of the hip and gene polymorphisms of VDR, COL1A1, and COL2A1 in postmenopausal women // Arthritis Rheum. — 1998. — Vol. 41, №11. — P. 1946—50.
14. de Bakker P.I., Yelensky R., Pe'er I. et al. Efficiency and power in genetic association studies // Nat. Genet. — 2005. — Vol. 37, №11. — P. 1217—1223.
15. Gang Q., Dong Z., Zeng P. et al. Association of vitamin D receptor *BsmI* gene polymorphism with risk of osteoporosis: a meta-analysis of 41 studies // Mol. Biol. Rep. — 2013. — Vol. 40, №1. — P. 497—506.
16. Granchi D., Stea S., Sudanese A. et al. Association of two gene polymorphisms with osteoarthritis secondary to hip dysplasia // Clin. Orthopaed. Relat. Res. — 2002. — Vol. 403. — P. 108—117.
17. Hart D.J., Doyle D.V., Spector T.D. Association between metabolic factors and knee osteoarthritis in women: the Chingford Study // J. Rheumatol. — 1995. — Vol. 22. — P. 1118—1123.
18. Huang J., Ushiyama T., Inoue K., Kawasaki T. Vitamin D receptor gene polymorphisms and osteoarthritis of the hand, hip, and knee: a case-control study in Japan // J. Clin. Invest. — 1997. — Vol. 100, №2. — P. 259—263.
19. Jordan K.M., Syddall H., Dennison E.M. et al. Birthweight, vitamin D receptor gene polymorphism, and risk of lumbar spine osteoarthritis // J. Rheumatol. — 2005. — Vol. 32. — P. 678—683.
20. Kim J.G., Kwon J.H., Kim S.H. et al. Association between vitamin D receptor gene haplotypes and bone mass in postmenopausal Korean women // Am. J. Obstet. Gynecol. — 2003. — Vol. 189. — P. 1234—1240.
21. Langdahl B.L., Gravholt C.H., Brixen K. et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures // Eur. J. Clin. Invest. — 2000. — Vol. 30, №7. — P. 608—617.
22. Loughlin J., Sinsheimer J.S., Mustafa Z. et al. Association analysis of the vitamin d receptor gene, the type I collagen gene *colla1*, and the estrogen receptor gene in idiopathic osteoarthritis // J. Rheumatol. — 2000. — Vol. 27, №3. — P. 779—784.
23. Lucotte G., Mercier G., Burckel A. Fok I polymorphism at the human vitamin D receptor gene locus in Europeans and Africans // Clin. Genet. — 1999. — Vol. 55, №4. — P. 281—282.
24. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucaryotic DNA // Methods in Molecular Biology. — Humana Press, 1984. — P. 31—34.

25. Muraki S., Dennison E., Jameson K. et al. Association of vitamin D status with knee pain and radiographic knee osteoarthritis // *Osteoarthritis Cartilage*. — 2011. — Vol. 19, №11. — P. 1301–1306.
26. Punzi L. New horizons in osteoarthritis. — URL: <http://www.smw.ch> — Early Online Publication, 28. April 2010.
27. Solovieva S., Hirvonen A., Siivola P. et al. Vitamin d receptor gene polymorphisms and susceptibility of hand osteoarthritis in finnish women // *Arthritis Res. Ther.* — 2006. — Vol. 8, №1. — P. R20.
28. Uitterlinden A.G., Burger H., van Duijn C.M. et al. Adjacent genes for COL2A1 and the vitamin D receptor, are associated with separate features of radiographic osteoarthritis of the knee // *Arthritis Rheumat.* — 2000. — Vol. 43. — P. 1456–1464.
29. Yuan H.Y., Tang Y., Liang Y.X. et al. Matrix metalloproteinase-3 and vitamin d receptor genetic polymorphisms, and their interactions with occupational exposure in lumbar disc degeneration // *J. Occup. Health.* — 2010. — Vol. 52, №1. — P. 23–30.
30. Zawilla N.H., Darweesh H., Mansour N. et al. Matrix Metalloproteinase-3, Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms, and Occupational Risk Factors in Lumbar Disc Degeneration // *J. Occup. Rehabil.* — 2013. — Aug. 24. — Epub ahead of print.
31. Zhang Y., Jordan J.M. Epidemiology of osteoarthritis // *Clin. Geriatr. Med.* — 2010. — Vol. 26, №3. — P. 355–369.
32. Zhu Z.H., Jin X.Z., Zhang W. et al. Associations between vitamin D receptor gene polymorphisms and osteoarthritis: an updated meta-analysis // *Rheumatology (Oxford)*. — 2014. — Feb.4. — Epub ahead of print.
33. Zintzaras E., Rodopoulou P., Koukoulis G.N. BsmI, TaqI, ApaI and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and the risk of osteoporosis: A meta-analysis // *Dis. Markers*. — 2006. — Vol. 22. — P. 317–326.

Search for associations of polymorphisms in the vitamin D receptor gene (*VDR*) with osteoarthritis and connective tissue dysplasia

Tyurin A.V.^{1,2}, Khusainova R.I.¹, Khusnutdinova N.N.¹, Davletshin R.A.², Khusnutdinova E.K.¹

¹ — Institute of Biochemistry and Genetics; e-mail: anton.bgmu@gmail.com

² — Bashkir State Medical University, Ufa

The study of vitamin D receptor gene (*VDR*) *rs2228570* (s.2T/A/C/G, Met1Lys/Arg/Thr, FokI, *rs10735810*), *rs1544410* (c.1024+283 G>A; BsmI), *rs7975232* (c.1025-49G>T, AarI), *rs731236* (c.1056T>C, TaqI) polymorphisms in female with osteoarthritis and with signs of connective tissue dysplasia was performed. We discovered importance of *VDR**G allele and genotype *VDR**G*G locus *rs1544410* in the development of osteoarthritis in combination with connective tissue dysplasia, genotype *VDR**G*T locus *rs7975232* with the risk of isolated poliosteoarthritis and comorbidity. *CTA haplotype reduces the risk of OA in combination with CTD.

Key words: vitamin D receptor, osteoarthritis, connective tissue dysplasia

Роль полиморфных вариантов генов ядерного и митохондриального геномов в детерминации эндофенотипов ишемической болезни сердца

Бабушкина Н.П.¹, Кучер А.Н.¹, Буйкин С.В.¹, Голубенко М.В.¹,
Макеева О.А.¹, Шипулин В.М.², Пузырев В.П.¹

¹ — ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН,

634050, г.Томск, Набережная р.Ушайки, 10, факс (3822) 513744, e-mail: valery.puzyrev@medgenetics.ru

² — ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН,

634012, Томск, ул. Киевская, 111а, факс: 8 (3822) 565830, e-mail: sv@cardio-tomsk.ru

Проведён анализ ассоциаций 27 SNP и 1 VNTR, локализованных в 17 ядерных генах и четырёх SNP в мтДНК с рядом качественных и количественных признаков ишемической болезни сердца (ИБС). Получены ассоциации с патогенетически значимыми для ИБС признаками для 17 полиморфных вариантов 12 генов (*ACE*, *GNB3*, *ADRB2*, *NOS3*, *PPP3R1*, *GATA4*, *LTA*, *TNFRSF1B*, *IL4R*, *IL12A*, *IFNG*, *IFNGR2*) и гаплогруппы U мтДНК. Для генов *IL12A* и *IFNGR2* вовлечённость в развитие сердечно-сосудистой патологии показана впервые. Вклад ассоциированных генов в детерминацию изменчивости количественных признаков был невысок, только для rs2070744 в гене *NOS3* значение G превышало 10%. Полученные результаты подтверждают существенную роль воспаления в развитии сердечно-сосудистой патологии.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, ИБС, эндофенотипы

Введение

ИБС в настоящее время является одним из самых распространенных, прогрессирующих и прогностически неблагоприятных заболеваний сердечно-сосудистой системы.

При ИБС в ответ на неадекватные гемодинамические условия функционирования сердца развиваются сердечная недостаточность и дисфункция миокарда; снижается насосная функция миокарда, что приводит к дисбалансу между гемодинамической потребностью организма и возможностями сердца.

Как правило, у больных ИБС выявляется несколько заболеваний: артериальная гипертензия (АГ), ожирение, метаболические нарушения, сахарный диабет 2-го типа (СД2) и др.

Поэтому ассоциации генетических маркёров с заболеванием, в целом, нередко могут объясняться тем, что кодируемые этими генами белковые продукты участвуют в биохимических путях, детерминирующих какие-либо патогенетически значимые признаки нозологии или сопутствующие ей состояния.

Ранее были установлены ассоциации с ИБС в сочетании с АГ аллелей, генотипов, сочетаний генотипов и гаплотипов ряда генов, относящихся к генам-кандидатам сердечно-сосудистой патологии (*ACE*, *NOS3*, *GNB3*), и генов регуляции иммунного ответа (*TNF*, *LTA*, *TNFRSF1B* и *IL12RB1*) [1].

В настоящем сообщении представлены результаты анализа ассоциаций исследованных маркёров с рядом качественных и количественных признаков ИБС.

Материалы и методы

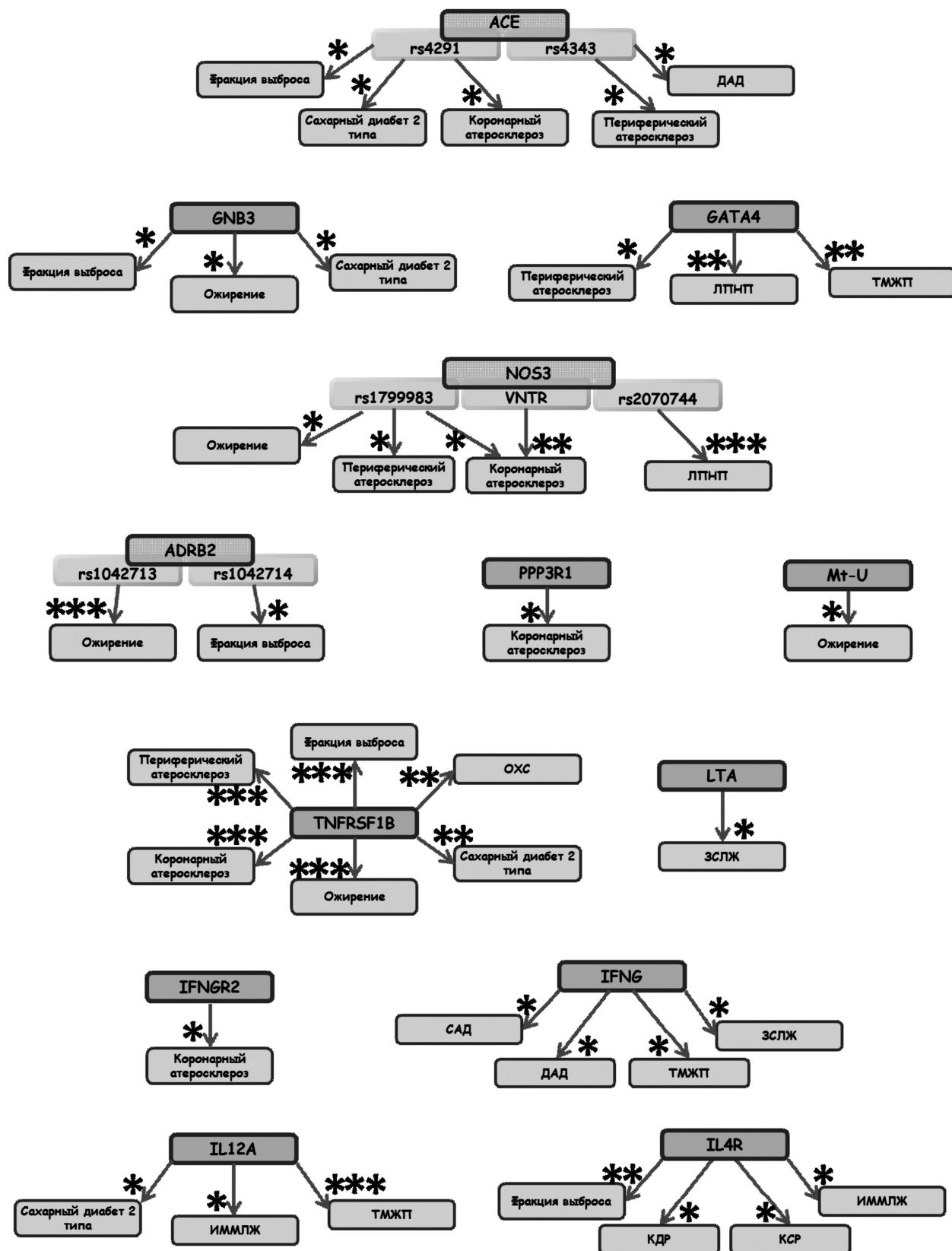
Группа больных ИБС в сочетании с АГ включала в себя 149 чел. (129 мужчин и 20 женщин). Согласно анамнезу, 137 пациентов (92%) перенесли один или несколько инфарктов миокарда (ИМ), у остальных зарегистрирован стенозирующий атеросклероз.

У всех пациентов были проведены измерение артериального давления, анализ липидного профиля, эхокардиографическое исследование (ЭхоКГ) и коронаро-вентрикулография.

Обследование больных осуществлялось на базе ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН (г.Томск).

В выборке больных ИБС проанализированы следующие *количественные признаки*:

- липидные показатели:
 - общий холестерин (ОХС);
 - липопротеины низкой плотности (ЛПНП);
 - липопротеины высокой плотности (ЛПВП);
- систолическое (САД) и диастолическое артериальное давление (ДАД);
- ЭхоКГ-показатели:
 - фракция выброса (ФВ);
 - конечный диастолический размер (КДР);
 - конечный систолический размер (КСР);
 - индекс массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ);
 - толщина межжелудочковой перегородки (ТМЖП);
 - толщина задней стенки левого желудочка (ЗСЛЖ).



Ассоциации изученных генов с эндофенотипами (* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$)

Выборка больных была также разделена на подгруппы в зависимости от изученных *качественных признаков*:

1) среди лиц с *коронарным атеросклерозом* выделены индивиды с поражением одной ($n = 25$ индивидов), двух ($n = 27$) и трёх ($n = 47$) артерий;

2) ИМТ > 30 ($n = 42$) и ИМТ < 30 ($n = 83$);

3) *периферический атеросклероз* был диагностирован у 70 и не диагностирован у 37 пациентов;

4) *сахарный диабет 2-го типа (СД2)* диагностирован/не диагностирован у 22 и 127 чел. соответственно;

5) *фракция выброса (ФВ)* — рассматривалась и как количественный показатель (см. выше), и как качественный — $ФВ < 40\%$ ($n = 30$) и $ФВ > 40\%$ ($n = 102$).

В качестве контрольной группы была использована популяционная выборка жителей города Томска (96 чел.), охарактеризованная ранее [1]. В группе больных и контрольной группе русские составляли более 90%. У всех обследуемых получено информированное согласие на проведение исследования.

В обеих выборках были проанализированы 27 SNP и 1 VNTR, локализованные в 17 ядерных генах (*ADRB2* (rs1042713, rs1042714), *NOS3* (rs2070744, rs61722009 (VNTR), rs1799983), *ACE* (rs4291, rs4343), *AGTR1* (rs5186), *GNB3* (rs5443), *PPP3R1* (rs11126176), *GATA4* (rs804271), *LTA* (rs909253), *TNF* (rs1800629), *TNFRSF1B* (rs1061622), *IL4* (rs2243291), *IL4R* (rs1801275, rs2074570), *IL12A* (rs568408), *IL12B* (rs3212227, rs3212220), *IL12RB1* (rs3746190, rs11575926), *IFNG* (rs2069705), *IFNGR2* (rs17880053)), и четыре SNP в мтДНК (rs2015062, rs2853498, rs28357372, rs28539178). Изменчивость данных генетических вариантов охарактеризована ранее [1, 3—5, 11].

При проведении ассоциативных исследований с *качественными признаками* сравнения частот аллелей и генотипов исследованных полиморфных вариантов были выполнены как между подгруппами пациентов с изучаемым эндофенотипом, так и между каждой из подгрупп с популяционной выборкой. Для сравнения частот аллелей и генотипов между различными группами применяли критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность и точный тест Фишера. Об ассоциации аллелей или генотипов с функциональными состояниями судили по величине отношения шансов (OR) и границам 95%-ного доверительного интервала (CI) [26].

При первичном анализе *количественных признаков* была устранена зависимость от возраста (по [15]) и пола (по [8]); в случае отклонения распределения признака от нормального проводили логарифмирование показателей. Сравнение дисперсий проводили по тесту Левина; сравнение средних значений нескольких независимых распределений — методом однофакторного дисперсионного анализа по Фишеру (F-критерий), включая метод линейных контрастов Шеффе [7]. Вклад генов в детерминацию количественных признаков оценивали методом регрессионного анализа [7]. Анализ проводился с использованием пакета программ Statisticafor Windows 7.0.

Результаты и обсуждение

В предыдущем сообщении обсуждались результаты ассоциативного исследования полиморфных вариантов ряда генов с ИБС в сочетании с АГ [1]. Так, ассоциации с данной патологией были получены как с аллелями, так и с генотипами полиморфных вариантов генов *GNB3* (rs5443) и *TNFRSF1B* (rs1061622); с аллелями и генотипами rs4291 и сочетаниями генотипов по rs4291 и rs4343 в гене *ACE*; с сочетаниями генотипов по rs2070744 и rs61722009 в гене *NOS3* и по rs3746190 и rs11575926 в гене *IL12RB1*; с сочетаниями генотипов и гаплотипам rs909253 и rs1800629 (в генах *LTA* и *TNF* соответственно) [1].

В настоящем исследовании ассоциации с патогенетически значимыми для ИБС признаками были получены для 17 полиморфных вариантов 13 генов (рисунок). То есть в формировании эндофенотипов заболевания принимает участие более широкий (по сравнению с непосредственно ассоциированным с патологией) спектр генов, что неудивительно, поскольку для изученных генов показан выраженный плейотропный эффект [6]. Причём из всех анализировавшихся качественных и количественных признаков не выявлено ассоциаций с полиморфизмом изученных генов только для ЛПВП. В большинстве случаев ассоциации маркёров регистрировались с несколькими признаками и лишь для четырёх генов — только с одним показателем (табл. 1, 2). Представляется целесообразным рассмотреть ассоциированные с эндофенотипами маркёры, сравнивая их возможную функциональную роль в детерминации отдельных признаков.

Роль ангиотензин I превращающего фермента (АПФ) в функционировании организма широко известна, как и факт ассоциированности полиморфизма кодирующего его гена (*ACE*) с сердечно-сосудистой патологией [33, 35 и др.]. В гене *ACE* анализировались две функционально значимые замены. Для rs4343 (A2350G, Thr776Thr) установлены 2 ассоциации: с периферическим атеросклерозом и уровнем ДАД (табл. 1). В группе лиц с периферическим атеросклерозом частота генотипа AA и аллеля А была статистически значимо выше, чем в группе больных ИБС без атеросклероза (табл. 1). Также выявлена ассоциация генотипа AG данного SNP с повышенным уровнем ДАД ($p = 0,029$) (табл. 2), что, в целом, не противоречит данным X. Zhu с соавторами [35], показавшими связь аллеля 2350G с увеличением уровня САД у жителей Нигерии. Аллель Т второго изученного SNP (rs4291, A-240T), являющийся рисковым по отношению к развитию ИБС [1], также предрасполагает к СД2 при данной патологии и коронарному атеросклерозу трёх артерий, но является протективным в отношении снижения показателей ФВ (табл. 1). В группе больных с гомозиготным генотипом ТТ зарегистрирован статистически значимо более высокий уровень показателя ФВ по сравнению с другими группами (табл. 2).

Таблица 1

Отношения шансов для качественных эндофенотипов при синтропии ИБС

Аллель/генотип	Признак	OR	95% CI	χ^2	p
ACE (rs4343)					
GG	ПА– vs k	2,76	1,09–6,97	4,74	0,030
AA	ПА+ vs ПА–	4,05	1,35–12,14	6,06	0,014
ACE (rs4291)					
T	ФВ > 40 vs k	1,63	1,01–2,64	4,02	0,045
	КА 3 vs k	2,05	1,07–3,92	4,75	0,029
	СД2+ vs k	2,52	1,10–5,76	4,95	0,026
GNB3 (rs5443)					
TT	ФВ < 40 vs k	5,03	1,47–17,19	5,55	0,019 (p ^f = 0,014)
	ИМТ < 30 vs k	3,13	1,09–8,95	3,97	0,046
CC	СД2– vs k	0,52	0,29–0,93	5,01	0,025
NOS3 (rs179983)					
GT	ПА– vs k	2,72	1,16–6,39	5,54	0,019
	КА 2 vs k	2,89	1,11–7,60	4,84	0,028
	ИМТ > 30 vs k	2,54	1,13–5,74	5,25	0,022
NOS3 (VNTR)					
AB	КА 1 vs k	5,1	1,84–14,17	9,59	0,002
	КА 1 vs КА 3	6,69	2,14–20,94	10,29	0,001
PPP3R1 (rs11126176)					
AG	КА 1 vs k	4,45	1,32–14,94	5,78	0,016
	КА 1 vs КА 2	5,57	1,37–22,62	5,13	0,023
	КА 1 vs КА 3	7,29	2,02–26,24	9,5	0,002
GATA4 (rs804271)					
T	ПА– vs ПА+	1,86	1,01–3,46	3,94	0,047
ADRB2 (rs1042713)					
GG	ИМТ > 30 vs k	2,71	1,18–6,29	5,78	0,016
	ИМТ > 30 vs ИМТ < 30	3,65	1,54–8,74	9,48	0,002
IL4RA (rs2074570)					
AA	ФВ > 40 vs ФВ < 40	6,28	1,96–20,20	9,17	0,002 (p ^f = 0,002)
AG	ФВ < 40 vs k	4	1,2–13,48	5,37	0,020 (p ^f = 0,023)
IL12A (rs568408)					
GA	СД2+ vs СД2–	3,03	1,10–8,47	4,73	0,03
IFNGR2 (rs17880053)					
Gd	КА 3 vs КА 1	3,85	1,08–13,72	3,91	0,048
TNFRSF1B (rs1061622)					
GG	ФВ < 40 vs k	13,19	2,92–59,45	13,68	0,0002 (p ^f = 0,0004)
	ФВ > 40 vs k	5,83	1,47–23,19	6,79	0,009
	ПА+ vs k	10,1	2,51–40,65	13,23	0,0003
	ПА– vs k	8,06	1,77–36,64	7,39	0,007 (p ^f = 0,005)
	КА 1 vs k	18,29	3,97–84,37	18,44	0,00002 (p ^f = 0,00009)
	КА 2 vs k	7,56	1,51–37,93	5,16	0,02 (p ^f = 0,02)
	КА 3 vs k	8,13	1,89–34,96	8,65	0,003 (p ^f = 0,002)
	ИМТ < 30 vs k	4,95	1,19–20,62	4,69	0,03
	ИМТ > 30 vs k	11,05	2,59–47,06	12,78	0,0004 (p ^f = 0,0003)
	СД2+ vs k	9,72	1,91–49,51	7,00	0,008 (p ^f = 0,009)
	СД2– vs k	6,27	1,62–24,28	8,05	0,005
mt (A12308G)					
G*	ИМТ > 30 vs ИМТ < 30	2,74	1,07–7,01	4,55	0,033

Примечание. k — контрольная группа; vs (versus — против) — применяется для обозначения сравнения между группами; OR — отношение шансов; 95% CI — границы 95%-ного доверительного интервала; χ^2 (p) — критерий χ^2 и его уровень значимости; p^f — уровень значимости для двустороннего точного критерия Фишера; ФВ — фракция выброса; ПА– и ПА+ — подгруппы с диагностированным/недиагностированным соответственно периферическим атеросклерозом; КА 1, КА 2, КА 3 — подгруппы с коронарным атеросклерозом одного, двух и трёх сосудов соответственно; СД2+ и СД2– — подгруппы с наличием сахарного диабета 2-го типа и без СД2 соответственно; G* — вариант 12308G определяет гаплогруппу U

Основной функцией продукта гена *GNB3* является связывание G-белка γ -3, передающего информацию от рецептора к внутриклеточным исполнительным системам. Редкий аллель Trs5443 (C825T, Ser275Ser) снижает активность продукта гена [29], поэтому можно предположить, что ослабление связывания G-белка γ -3, приводящее к усилению передачи сигнала, играет важную роль в формировании ИБС, в целом [1]. В настоящем исследовании показано участие rs5443 и в формировании особенностей течения данной патологии. Так, аллель Т и генотип ТТ ассоциированы с низкими значениями ФВ (<40%), что является клиническим признаком недостаточности сократительной функции левого желудочка [12]. Генотип СС чаще регистрируется в контрольной группе, чем в общей группе больных ИБС [1], при дифференцировке подгрупп по наличию СД2 наименьшая частота этого генотипа отмечается в подгруппе больных ИБС без СД2, в этой же подгруппе наблюдает-

ся наибольшая частота регистрации альтернативного генотипа ТТ. При сравнении с контролем подгрупп больных ИБС, дифференцированных по ИМТ, был установлен протективный эффект аллеля Т и генотипа ТТ в отношении ожирения (табл. 1). Вышесказанное позволяет предположить наличие протективного эффекта аллеля Т и генотипа ТТ в отношении развития нарушений углеводного обмена, в целом. Полученные в отношении СД2 результаты, как и данные о связи rs5443 с ожирением, подтверждают наблюдения других исследователей [18, 22].

Для всех изученных полиморфных вариантов гена *NOS3* установлены ассоциации с эндофенотипами. В группе больных ИБС генотип СС промоторного варианта rs2070744 (T-786C) ассоциирован с низким уровнем ЛПНП в плазме крови ($p = 0,0008$) (табл. 2). Аллель А и генотип АВNTR-полиморфизма (rs61722009) в гене *NOS3* ассоциированы с возникновением коронарного

Таблица 2

Средний уровень количественных признаков у больных ИБС в зависимости от генотипов исследованных полиморфных вариантов генов и вклад гена в детерминацию ассоциированного признака

Ген/ полиморфизм	Показатель	Значение признаков при генотипах			p	Вклад гена (G, %)
ACE rs4343	ДАД _{Ig}	AA	AG	GG	0,029	1,18
		1,93 ± 0,04; n = 27	1,97 ± 0,06; n = 23	1,95 ± 0,04; n = 24		
NOS3 rs2070744	ЛПНП (ммоль/л)	ТТ	СТ	СС	0,0008	10,68
		4,05 ± 1,12; n = 28	4,31 ± 1,79; n = 19	0,81 ± 0,16; n = 3		
GATA4 rs804271	ЛПНП (ммоль/л)	GG	GT	ТТ	0,004	0,1
		3,35 ± 0,93; n = 13	4,57 ± 1,64; n = 30	3,03 ± 1,31; n = 11		
	ТМЖП _{Ig}	1,03 ± 0,07; n = 33	1,06 ± 0,08; n = 70	1,00 ± 0,09; n = 28	0,002	0,2
ADRB2 rs10442714	ФВ (%)	CC	CG	GG	0,040	0,32
		47,84 ± 15,20; n = 43	54,80 ± 12,51; n = 60	50,08 ± 14,75; n = 26		
LTA rs909253	ЗСЛЖ _{Ig}	AA	AG	GG	0,028	4,21
		0,99 ± 0,07; n = 61	1,03 ± 0,07; n = 52	1,04 ± 0,03; n = 8		
TNFRSF1B rs1061622	ОХС (ммоль/л)	ТТ	GT	GG	0,001	0,001
		5,90 ± 1,30; n = 60	6,04 ± 1,26; n = 44	4,81 ± 1,18; n = 20		
IL4R rs2074570	ФВ (%)	AA	AG	GG	0,002	5,78
		52,89 ± 13,51; n = 118	39,48 ± 5,47; n = 12	—		
	ИММЛЖ	145,71 ± 40,97; n = 103	180,73 ± 48,99; n = 10	—	0,013	4,63
	КДР _{Ig}	1,74 ± 0,09; n = 118	1,79 ± 0,05; n = 10	—	0,041	0,97
	КСР _{Ig}	1,60 ± 0,11; n = 115	1,68 ± 0,09; n = 10	—	0,023	2,2
IL12A rs568408	ИММЛЖ	GG	GA	AA	0,042	2,92
		152,85 ± 44,84; n = 65	146,87 ± 37,22; n = 45	90,45 ± 38,21; n = 3		
	ТМЖП _{Ig}	1,05 ± 0,07; n = 79	1,04 ± 0,09; n = 49	0,87 ± 0,15; n = 3	0,0006	3,12
IFNG rs2069705	САД _{Ig}	CC	СТ	ТТ	0,011	3,46
		2,14 ± 0,05; n = 29	2,13 ± 0,05; n = 51	2,17 ± 0,06; n = 25		
	ДАД _{Ig}	1,95 ± 0,05; n = 29	1,94 ± 0,06; n = 51	1,98 ± 0,06; n = 25	0,023	2,98
	МЖП _{Ig}	1,02 ± 0,10; n = 35	1,06 ± 0,07; n = 60	1,03 ± 0,08; n = 32	0,014	0,001
	ЗСЛЖ _{Ig}	1,01 ± 0,07; n = 35	1,03 ± 0,07; n = 60	0,99 ± 0,07; n = 32	0,045	0,001

Примечание. _{Ig} — в случае отклонения распределения признака от нормального проводили логарифмирование показателей

атеросклероза (статистически значимая величина OR получена при сравнении подгрупп с поражением одного коронарного сосуда с контролем), но зарегистрирован протективный эффект в отношении множественного атеросклероза (дифференциация наблюдалась при сравнении подгрупп с поражением одного и трёх сосудов) (табл. 1). В настоящее время недостаточно данных для объяснения этой ассоциации, однако известно, что аллель В снижает продукцию белка eNOS [34], возможно, тем самым, опосредованно ухудшая течение атеросклероза, что может приводить к более частой его регистрации в подгруппе лиц с множественным атеросклеротическим поражением коронарных артерий. Для третьего изученного полиморфизма rs1799983 (G894T, Glu298Asp) выявлено преобладание гетерозиготного генотипа GT в группах пациентов с ожирением (ИМТ > 30) и с поражением двух сосудов при коронарном атеросклерозе при сравнении их с контролем (табл. 1). Получены также данные о протективном эффекте генотипа GT в отношении развития периферического атеросклероза у больных ИБС (табл. 1). Возможно, это является следствием функциональной значимости данного SNP: при наличии аллеля Т продукт гена в большей степени подвержен гидролизу [31].

В гетерозиготном состоянии полиморфизм tagSNP гена *PPP3R1* (продукт которого обладает широким спектром плейотропных эффектов в разных системах организма [13]) — rs11126176 (A/G) — значимо чаще встречался в группе больных с поражением одной коронарной артерии при сравнении с контрольной выборкой, являясь, таким образом, предрасполагающим к развитию коронарного атеросклероза. Вместе с тем, этот же генотип является протективным в отношении развития множественного коронарного атеросклероза (получены различия по частотам генотипов между группами с поражением одной артерии и двух и трёх артерий) (табл. 1).

Для полиморфизма tagSNP гена *GATA4* (основного регулятора ангиогенеза [20]) rs804271 (G/T) получено статистически значимое преобладание частоты аллеля Т в подгруппе больных ИБС с сопутствующим атеросклерозом периферических артерий по сравнению с подгруппой без этой патологии (табл. 1). Кроме того, гетерозиготный генотип GT ассоциирован ($p = 0,004$) с более высоким уровнем ЛПНП, а генотип ТТ — с более низким значением ТМЖП ($p = 0,002$) (табл. 2).

В гене β_2 -адренорецептора (*ADRB2*) проанализированы две функционально значимые замены. По rs1042713 зарегистрировано преобладание аллеля G и генотипа GG в подгруппе больных ИБС с ожирением, по сравнению как с подгруппой больных с нормальной массой тела, так и с популяционным контролем (табл. 1). Для замены rs10442714 (C79G, Gln27Glu) в настоящем исследовании получена ассоциация гетерозиготного генотипа с более высокими показателями ФВ ($p = 0,04$) (табл. 2). Поскольку β_2 -адренорецептор принимает участие в регуляции деятельности симпатиче-

ской нервной системы, осуществляющей множество процессов в организме [32], можно предположить наличие опосредованного, потенцирующего влияния замены rs10442714 на сократимость миокарда и на соответствующие характеристики его функционирования.

Известно, что воспаление при ИБС чрезвычайно важно, причём оно не зависит от выраженности коронарного атеросклероза и некроза миокарда [9]. В литературе широко освещается роль ФНО и интерлейкинов в процессах ремоделирования сердца [10]. В настоящем исследовании получен целый ряд ассоциаций эндотипов ИБС с различными цитокинами и их рецепторами.

Зарегистрирована ассоциация толщины задней стенки левого желудочка ($p = 0,028$) с SNP гена семейства *TNF*, кодирующего лимфотоксин α — *LTA*. В группе больных ИБС наибольшая толщина ЗСЛЖ фиксируется у гомозигот GG по rs909253 (A252G), наименьшая — у гомозигот AA, у носителей гетерозиготного генотипа регистрируются промежуточные значения (табл. 2). Ассоциативные исследования, включающие ген *LTA*, проводятся широко: установлены ассоциации с большим спектром патологических состояний, в том числе и заболеваний сердечно-сосудистой системы (см., например, [21]).

Особое внимание обращает на себя полиморфный вариант в гене *TNFRSF1B* (rs1061622). Ранее [1] была выявлена ассоциация аллеля G и генотипа GG данного SNP с ИБС в сочетании с АГ. В настоящем исследовании для rs1061622 выявлены однонаправленные ассоциации со всеми проанализированными качественными признаками: частоты аллеля G и генотипа GG в подгруппах, дифференцируемых по наличию/отсутствию качественных признаков выше, чем в контроле (табл. 1). Однонаправленные ассоциации и отсутствие различий между подгруппами в каждой паре сравнения могут свидетельствовать о влиянии данного SNP на риск развития непосредственно патологии, а не её эндотипов. Кроме того, установлена ассоциация редкого аллеля G с более низким уровнем ОХС ($p = 0,001$) (табл. 2). Ассоциация данного полиморфного варианта с уровнем ЛПВП описана в литературе [14].

Из двух исследованных замен в гене рецептора к ИЛ-4 (*IL4R*) ассоциации с эндотипами ИБС были выявлены только для rs2074570 (A2726G). Характерно, что относительно ФВ ассоциация была получена при рассмотрении его и как качественного, и как количественного признака. Результаты двух видов статистического анализа подтверждают друг друга: с более низкими значениями ФВ ассоциирован генотип AG. При сравнении подгрупп больных с нормальным и сниженным уровнем ФВ установлен протективный эффект генотипа AA в отношении снижения сократительной функции сердца (табл. 1). Для носителей гетерозиготного генотипа по rs2074570 гена *IL4R*, кроме того, характерны большие значения КДР ($p = 0,041$) и КСР ($p = 0,023$), более высокий индекс ММЛЖ ($p = 0,013$)

(табл. 2). Эхокардиографические показатели КСР, КДР и ФВ характеризуют сократительную функцию сердца и нагрузку на миокард. ФВ определяет объём крови, выброшенной сердцем за одно сокращение: чем сильнее происходит сокращение, тем больше ФВ и меньше значения КСР и КДР. Это объясняет «зеркальные» эффекты для КДР и КСР, с одной стороны, и ФВ, — с другой [12], и может говорить о неслучайности полученных ассоциаций. Для расчётов показателя ИММЛЖ используют значения КДР, что определяет однонаправленность характера изменений этих показателей. В доступных научных работах не обнаружено сведений о вовлечённости данного гена в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний.

Для замены G1098A (rs568408) субъединицы p35 ИЛ-12 (*IL12A*) получены данные об ассоциации гетерозиготного генотипа с нарушениями углеводного обмена (СД2) в группе больных ИБС (табл. 1). Кроме того, установлены ассоциации частого генотипа GG с более высокими показателями ИММЛЖ ($p = 0,042$) и ТМЖП ($p = 0,0006$) у больных ИБС (табл. 2); эти два показателя характеризуют состояние левого желудочка и служат диагностическими критериями гипертрофии миокарда [12].

Полиморфный вариант rs2069705 (C-3511T) в гене *IFNG* ассоциирован с четырьмя эндофенотипами при ИБС, характеризующими геометрию миокарда и гемодинамику (табл. 2): для лиц с генотипом TT характерны повышенные уровни САД и ДАД ($p = 0,011$ и $p = 0,023$ соответственно) и более низкое значение толщины ЗСЛЖ ($p = 0,045$); для гетерозиготного генотипа СТ — большая величина толщины МЖП ($p = 0,014$). Продукт гена *IFNG* регулирует экспрессию более 500 генов [16]; его полиморфизм вовлечён в детерминацию предрасположенности к патологическим состояниям различной природы, в том числе и сердечно-сосудистой патологии [30]. Можно предположить его опосредованное участие и в развитии гипертрофии левого желудочка.

Для гена рецептора к IFN- γ (*IFNGR2*) выявлена ассоциация генотипа Gd (табл. 1) rs17880053 с множественным коронарным атеросклерозом ($p = 0,048$) при сравнении подгрупп с коронарным атеросклерозом одного и трёх сосудов, причём частота данного генотипа снижается в группах с разным числом поражённых сосудов ($1 > 2 > 3$). Информации о возможной функциональной значимости rs17880053 гена *IFNGR2* в доступной литературе не обнаружено. Однако известно, что в *IFNGR2* идентифицирован кластер из четырёх SNP, строго ассоциированный с прогрессированием фиброза у лиц с хронической формой гепатита С [27]. Рассуждая о некоторой общности процессов, лежащих в основе фиброгенеза и атерогенеза, можно предположить наличие сходных механизмов вовлечения продукта гена *IFNGR2* в формирование коронарного атеросклероза.

Участие продуктов генов *мтДНК* в процессах синтеза и накопления АТФ позволяет считать её универсальным кандидатным локусом для изучения генетических

основ широко распространённых заболеваний [25]. Нарушения функционирования митохондрий и повышение продукции активных форм кислорода наблюдаются при многих сердечно-сосудистых заболеваниях, в частности при гипертрофической кардиомиопатии, эндотелиальной дисфункции, атеросклерозе [19, 24]. Кроме того, мтДНК активно изучается с точки зрения вовлечённости в процессы регуляции окислительного стресса, ИБС и ИМ, АГ, продолжительности жизни и старения [2, 17, 23 и др.].

При сравнении частот гаплогрупп мтДНК в группе больных ИБС была зарегистрирована ассоциация (табл. 1) гаплогруппы U (аллель 12308G, rs2853498) с ожирением. Ожирение (ИМТ > 30) является одним из компонентов метаболического синдрома, для которого ранее была выявлена ассоциация с заменой T16189C [28]. Данный вариант характерен для одной из самых распространённых у русских подгрупп U — гаплогруппы U5, а также для более редких гаплогрупп U1 и U2e. Следует отметить, однако, что вариант 16189C часто встречается также и в гаплогруппах H и T.

Таким образом, в результате выполнения исследования были получены ассоциации 13 генов с рядом эндофенотипов ИБС в сочетании с АГ. Причём, согласно данным доступных источников литературы [36], для двух генов (*IL12A*, *IFNGR2*) вовлечённость в развитие сердечно-сосудистой патологии показана впервые. В то же время, вклад генов в детерминацию изменчивости количественных признаков был невысок: для трех генов (*GATA4*, *ADRB2* (rs10442714) и *TNFRSF1B*) не достигал 1%; для двух генов либо существенно варьировал для разных признаков (*IFNG* — от 0,001% до 3,46%), либо немногим превышал 1% (*ACE* — 1,18%). Вклад остальных ассоциированных с количественными признаками генов достигал для ряда признаков 3% (*IL12A*), 4% (*LTA*), 1—5% (*IL4R*); только для rs2070744 в гене *NOS3* вклад гена в детерминацию ассоциированного признака превышал 10% (табл. 2).

Следует отметить, что с качественными признаками ассоциированы преимущественно гены-кандидаты сердечно-сосудистых заболеваний, а с количественными — преимущественно гены иммунного ответа. Несомненный интерес вызывает сам факт вовлечённости полиморфизма генов регуляции иммунного ответа в изменчивость патогенетически значимых для функционирования сердечно-сосудистой системы количественных признаков. Из семи генов, ассоциированных как с качественными, так и с количественными признаками, четыре относятся к группе генов-кандидатов заболеваний сердечно-сосудистой системы (*ACE*, *NOS3*, *ADRB2*, *GATA4*), а три — к генам цитокинов и их рецепторов, как провоспалительных (*IL12A*, *TNFRSF1B*), так и противовоспалительных (*IL4R*). Полученные на примере ИБС в сочетании с АГ результаты подтверждают существенную роль воспаления в развитии сердечно-сосудистой патологии.

Список литературы

1. Бабушкина Н.П., Кучер А.Н., Буйкин С.В. и др. Ассоциации полиморфных вариантов генов ядерного и митохондриального геномов с ишемической болезнью сердца // Медицинская генетика. — 2014. — Т. 13, №5. — С. 36–46.
2. Буйкин С.В., Голубенко М.В., Пузырев В.П. Участие «митохондриальных генов» в формировании гипертрофии левого желудочка при артериальной гипертензии // Молекулярная биология. — 2010. — Т. 44, №1. — С. 28–32.
3. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Брагина Е.Ю. и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов интерлейкинов и их рецепторов у представителей четырех этнических групп сибирского региона // Медицинская генетика. — 2009. — Т. 10. — С. 43–52.
4. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Маркова В.В. и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов-кандидатов заболеваний сердечно-сосудистой системы у представителей четырех этнических групп сибирского региона // Медицинская генетика. — 2010. — №5. — С. 24–34.
5. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Тарасенко Н.В. и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов факторов некроза опухоли и их рецепторов у представителей четырех этнических групп сибирского региона // Медицинская генетика. — 2010. — №6. — С. 16–23.
6. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Буйкин С.В., Пузырев В.П. Плейотропные эффекты генов предрасположенности многофакторным заболеваниям // Молекулярная медицина. — 2013. — №2. — С. 13–23.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. ВУЗов. 4-е изд-е, перераб. и доп. — М.: Высш. шк. — 1990. — 352 с.
8. Лильин Е. Т., Трубников В. И., Ванюков М. М. Введение в современную фармакогенетику. — М.: Медицина, 1984. — 160 с.
9. Лутай М.И., Пархоменко А.Н., Шумаков В.А., Следзевская И.К. Ишемическая болезнь сердца (из Руководства по кардиологии / Под ред. проф. Н.В. Коваленко. — Киев: Морион, 2008. — С. 522–707.
10. Нечесова Т.А., Коробко И.Ю., Кузнецова Н.И. Ремоделирование левого желудочка: патогенез и методы оценки // Медицинские новости. — 2008. — №11. — С. 7–13.
11. Пузырев В.П., Кучер А.Н., Бабушкина Н.П. и др. Анализ мультилокусных генотипов, гаплотипов и оценка параметров неравновесия по сцеплению по полиморфным вариантам генов-кандидатов многофакторных заболеваний в сибирских популяциях // Медицинская генетика. — 2011. — №2. — С. 36–48.
12. Рыбакова М.К., Алехин М.Н., Митьков В.В. Практическое руководство по ультразвуковой диагностике. Эхокардиография. — М.: Видар-М, 2008. — 544 с.
13. Aramburu J., Heitman J., Crabtree G.R. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes // EMBO Rep. — 2004. — Vol. 5. — P. 343–348.
14. Barton A., John S., Ollier W.E. et al. Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians // Arthritis Rheum. — 2001. — Vol. 44. — P. 61–65.
15. Blumenthal M. N., Namboodiri K. K., Mendell N. et al. Genetic transmission of serum IgE levels // Am. J. Med. Genet. — 1981. — Vol. 10. — P. 219–228.
16. Brewington R., Chatterji M., Zoubine M. et al. IFN- γ -independent autocrine cytokine regulatory mechanism in reprogramming of macrophage responses to bacterial lipopolysaccharide // J. Immunol. — 2001. — Vol. 167. — P. 392–398.
17. Dai D.F., Rabinovitch P.S., Ungvari Z. Mitochondria and cardiovascular aging // Circ. Res. — 2012. — Vol. 110(8). — P. 1109–1124.
18. Daimon M., Sato H., Sasaki S. et al. Salt consumption-dependent association of the *GNB3* gene polymorphism with type 2 DM // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2008. — Vol. 374, №3. — P. 576–580.
19. Finsterer J. Is atherosclerosis a mitochondrial disorder? // Vasa. — 2007. — Vol. 36(4). — P. 229–240.
20. Heineke J., Auger-Messier M., Xu J. et al. Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart // J. Clin. Invest. — 2007. — Vol. 117. — P. 3198–3210.
21. Ikeda S., Tanaka N., Arai T. et al. Polymorphisms of *LTA*, *LGALS2*, and *PSMA6* genes and coronary atherosclerosis: a pathological study of 1503 consecutive autopsy cases // Atherosclerosis. — 2012. — Vol. 221, №2. — P. 458–460.
22. Khamidullaeva G.A., Eliseyeva M.R., Nagay A.V., Abdullaeva G.J. C825T polymorphism of the G-protein $\beta 3$ subunit and its association with essential hypertension in Uzbek males // Turk. Kardiyol. Dern. Ars. — 2011. — Vol. 39, №3. — P. 198–204.
23. Lapointe J., Hekimi S. Early mitochondrial dysfunction in long-lived *Mcl1*^{+/-} mice // J. Biol. Chem. — 2008. — Vol. 283. — P. 26217–26227.
24. Limongelli G., Masarone D., D'Alessandro R., Elliott P.M. Mitochondrial diseases and the heart: an overview of molecular basis, diagnosis, treatment and clinical course // Future Cardiol. — 2012. — Vol. 8(1). — P. 71–88.
25. McKusick V.A. Genomics: structural and functional studies of genomes // Genomics. — 1997. — Vol. 45. — P. 244–249.
26. Morris J.A., Gardner M.J. Statistics in Medicine: Calculating confidence intervals for relative risks (odds ratios) and standardised ratios and rates // Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.). — 1988. — Vol. 296. — P. 1313–1316.
27. Nalpas B., Lavalie-Meziani R., Plancoulaine S. et al. Interferon gamma receptor 2 gene variants are associated with liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C infection // Gut. — 2010. — Vol. 59, №8. — P. 1120–1126.
28. Palmieri V.O., De Rasmio D., Signorile A. et al. T16189C mitochondrial DNA variant is associated with metabolic syndrome in Caucasian subjects // Nutrition. — 2011. — Vol. 27. — P. 773–777.
29. Siffert W., Rosskopf D., Moritz A. et al. Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension // J. Clin. Invest. — 1995. — Vol. 96. — P. 759–766.
30. Srikanth B.B.M., Pulla R.B., Priya V.H. et al. Cytokine gene polymorphisms in the susceptibility to acute coronary syndrome // Genet. Test. Mol. Biomarkers. — 2012. — Vol. 16, №5. — P. 359–365.
31. Tesauro M., Thompson W.C., Rogliani P. et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate versus glutamate at position 298 // PNAS USA. — 2000. — Vol. 97. — P. 2832–2835.
32. Thomsen M., Dahl M., Tybjaerg-Hansen A., Nordestgaard B.G. $\beta 2$ -adrenergic receptor Thr164Ile polymorphism, obesity, and diabetes: comparison with *FTO*, *MC4R*, and *TMEM18* polymorphisms in more than 64,000 individuals // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2012. — Vol. 97, №6. — P. E1074–1079.
33. Xi B., Ruiter R., Chen J. et al. The *ACE* insertion/deletion polymorphism and its association with metabolic syndrome // Metabolism. — 2012. — Vol. 61, №6. — P. 891–897.
34. Zhang M.-X., Zhang C., Shen Y.H. et al. Biogenesis of short intronic repeat 27-nucleotide small RNA from endothelial nitric-oxide synthase gene // J. Biol. Chem. — 2008. — Vol. 283, №21. — P. 14685–14693.
35. Zhu X., Bouzekry N., Southam L. et al. Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (*ACE*)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure // Am. J. Hum. Genet. — 2001. — Vol. 68. — P. 1139–1148.
36. <http://www.hugenavigator.net/> (по состоянию на апрель 2014).

Role of polymorphic variants of the genes of nuclear and mitochondrial genomes in determining ischemic heart disease endophenotypes

Babushkina N.P.¹, Kucher A.N.¹, Buikin S.V.¹, Golubenko M.V.¹,
Makeeva O.A.¹, Shipulin V.M.², Puzyrev V.P.¹

¹ — Institute of Medical Genetics SB RAMS,
Ushaika Embankment, 10, Tomsk, 634050, Russia, fax: (3822)513744

² — Institute of Cardiology SB RAMS,
634012, Tomsk, Kievskaya 111a, fax: 8 (3822) 565830, e-mail: sv@cardio-tomsk.ru

An analysis of association with qualitative and quantitative endophenotypes of coronary heart disease was performed for 27 SNP and 1 VNTR localized in 17 nuclear genes and for 4 SNP in mtDNA. Significant association with some pathogenetically important traits was found for 17 variants of 12 genes (*ACE*, *GNB3*, *ADRB2*, *NOS3*, *PPP3R1*, *GATA4*, *LTA*, *TNFRSF1B*, *IL4R*, *IL12A*, *IFNG*, *IFNGR2*) and for mitochondrial haplogroup U. For *IL12A* and *IFNGR2* genes, their involvement in the cardiovascular disease development has been shown for the first time. Estimates of contribution of the associated genes in the variability of quantitative traits were low, and only for rs2070744 in *NOS3* the G value exceeded 10%. The results confirm a significant role of inflammation in the development of cardiovascular disease.

Key words: genetic polymorphism, coronary artery disease, endophenotypes

Анализ гена коннексина 50 (*GJA8*) у больных с наследственной врождённой катарактой из Республики Башкортостан*

Хидиятова И.И.¹, Азнабаев М.Т.³, Хидиятова И.М.^{1,2}, Авхадеева С.Р.³,
Джемилева Л.У.¹, Зинченко Р.А.⁴, Хуснутдинова Э.К.^{1,2}

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, 450054, e-mail: imkhid@mail.ru

² — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Башкирский государственный университет», Уфа, 450000; e-mail: ekkh@anrb.ru

³ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития,
Уфа, 450000; e-mail: indi-86@mail.ru

⁴ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр»
Российской академии медицинских наук, Москва, 115478; e-mail: renazinchenko@mail.ru

Мутации в гене коннексина 50 (*GJA8*) — одна из частых причин развития наследственной врождённой катаракты (НВК). Определены спектр мутаций гена *GJA8* и фенотипические особенности катаракты у больных с НВК из Республики Башкортостан (РБ). Три мутации в гетерозиготном состоянии обнаружены у четырёх из 40 неродственных пациентов: с.68G>T (p.Arg23Thr), 179G>A (p.Gly60Asp) и с.133-142delTGGGGGGATG (p.Trp45SerfsX72), из которых две последние ранее не описаны. В целом, вклад НВК, обусловленной мутациями в гене *GJA8*, в структуру данного заболевания в РБ составляет, приблизительно, 10%. В семьях с выявленными мутациями установлен доминантный тип наследования катаракты. При мутации p.Arg23Thr у двух неродственных больных диагностированы, соответственно, передняя полярная и ядерная формы катаракты, при мутации p.Gly60Asp — зоналярная катаракта в сочетании с микрофтальмом и микрокорнея, при мутации с.133-142delTGGGGGGATG (p.Trp45SerfsX72) — передняя полярная катаракта.

Ключевые слова: наследственная врождённая катаракта; ген коннексина 50 (*GJA8*); Республика Башкортостан

Введение

Катаракта — одно из наиболее частых заболеваний органа зрения, нередко приводящее к слепоте. Частота наследственных врождённых изолированных (несиндромальных) случаев катаракты варьирует от 1 до 6 на 10 000 детей [10]. В РБ распространённость наследственных врождённых катаракт составляет 0,84 на 10 000 населения [3].

НВК фенотипически и генетически гетерогенны, чаще наследуются по аутосомно-доминантному, реже — по аутосомно-рецессивному и X-сцепленному типам. На сегодняшний день картировано 45 генных локусов, сцепленных с наследственными формами катаракты, идентифицировано 38 генов. Около половины мутаций, приводящих к развитию катаракты, выявлено в генах кристаллинов — структурных белков хрусталика, примерно 15% — в генах коннексинов, 10% — в генах транскрипционных факторов [26]. При этом следует отметить, что к различным фенотипическим особенностям катаракты могут приводить не только мутации в разных генах, но и различные мутации в одних и тех же генах, чем объясняется наблюдаемое большое разнообразие

клинических форм заболевания: в настоящее время известны 32 клинические формы и 61 клинко-генетический вариант наследственных катаракт. Мутации в известных генах, выявляемые у больных с НВК, проживающих в различных регионах мира, достаточно разнообразны, и накопление данных о популяционном разнообразии спектра мутаций и соответствующих фенотипических признаках катаракты представляет значительный интерес, способствует как совершенствованию медико-генетического консультирования семей с данной патологией, так и познанию механизмов патогенеза заболевания.

Гены коннексинов 50 (*Cx50*, *GJA8*) и 46 (*Cx46*, *GJA3*), экспрессирующиеся в хрусталике, кодируют структурные белки, участвующие в формировании межклеточных щелевых контактов (gap junctions) — коннексонов, осуществляющих диффузное перемещение между клетками ионов K⁺ и других небольших электролитов и метаболитов размером менее 1 kDa [11]. Этот процесс крайне важен для нормального функционирования хрусталика, поскольку для последнего характерно отсутствие кровеносных и лимфатических сосудов, а также

* Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

Работа частично финансируется грантом РФФИ №14-04-97007p_Поволжье_а.

нервных волокон и питание его осуществляется путём диффузии или активного транспорта через капсулу растворённых во внутриглазной жидкости питательных веществ и кислорода. Мутации в генах коннексинов 50 и 46 приводят к нарушению структуры и функции соответствующих белков, обуславливая развитие врождённой катаракты. В гене коннексина 50 (*GJA8*) к настоящему времени описаны 33 мутации, идентифицированные у больных из ряда стран Европы и Азии, приводящие к развитию различных фенотипических форм катаракты, наследуемых чаще всего по аутосомно-доминантному типу [14]. Следует отметить, что мажорных мутаций в гене *GJA8* пока не обнаружено, что наряду с наблюдаемой вариабельностью фенотипических признаков наследственной катаракты определяет актуальность изучения популяционных особенностей спектра и частоты мутаций в этом гене, и гено-фенотипических корреляций в семьях больных с выявленными мутациями.

В РБ анализ генетических основ наследственной катаракты ранее не проводился. Этот регион представляет особый интерес для изучения эпидемиологии и молекулярно-генетических основ моногенной патологии, поскольку его многонациональное население характеризуется значительным своеобразием генофонда, подтверждённым многочисленными исследованиями ядерного и митохондриального геномов [4], а действующие здесь генетико-демографические факторы (преобладание моноэтнических браков, высокий уровень эндогамности в районах РБ) способствуют неравномерному распространению наследственных заболеваний, в том числе офтальмологических [1–3].

Целью представленной работы были поиск и анализ мутаций в гене *GJA8* у больных с наследственной врождённой катарактой из Башкортостана и определение вклада генетических форм катаракты, обусловленных мутациями в этом гене, в структуру данного заболевания.

Материалы и методы

Исследование проведено у 40 неродственных больных с НВК из Республики Башкортостан. Диагноз *катаракта* установлен на основании общепринятого офтальмологического исследования, включающего в себя определение остроты зрения, биомикроскопию, рефрактометрию, офтальмоскопию, кератометрию, эхобиометрию, тонометрию [5]. Наряду с офтальмологическим исследованием, амбулаторно, по месту жительства проводилось обследование общего состояния пациентов, включающее в себя консультации педиатра, стоматолога, оториноларинголога, невропатолога, общие анализы крови и мочи. На основании данных комплексного обследования у всех обследованных пациентов был установлен изолированный характер катаракты, не сочетающейся с клиническими признаками других заболеваний — неврологических,

сердечно-сосудистых, опорно-двигательных и др. Тип наследования катаракты был установлен на основании проведённого генеалогического анализа в семьях больных. В 80% случаев ($n = 32$) катаракта имела аутосомно-доминантный характер наследования, в 5% ($n = 2$) — аутосомно-рецессивный, в шести (15%) семьях тип наследования точно установить не удалось.

С целью определения функциональной значимости выявленных изменений в нуклеотидной последовательности гена *GJA8* был проведен скрининг на их наличие/отсутствие как у здоровых членов семей пробандов, так и у контрольных здоровых индивидов (185 чел.) — жителей РБ различной этнической принадлежности: русских (60 чел.), татар (65 чел.) и башкир (60 чел.). У всех обследуемых лиц кровь для ДНК-анализа была получена с их информационного согласия.

Молекулярно-генетическое исследование проведено с использованием стандартных методов: выделение ДНК — методом фенольно-хлороформной экстракции из цельной венозной крови; поиск мутаций в кодирующем участке гена *GJA8* — методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК с использованием олигонуклеотидных праймеров, представленных в работе [27], последующим анализом конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP) и секвенированием образцов ДНК с изменённой электрофоретической подвижностью на автоматическом секвенаторе ABI Prism, модель 3130 XL (Applied Biosystems).

Функциональная значимость выявленных миссенс-мутаций, помимо их скрининга в группах здоровых лиц, была оценена посредством компьютерной программы PoliPhen2 [13], рассчитывающей вероятность повреждающего действия аминокислотной замены на основе анализа множественного выравнивания ортологических аминокислотных последовательностей, выявляющего уровень эволюционной консервативности соответствующего участка белка, и сравнения третичной структуры белка при нормальном аллеле («диком» типе) и при исследуемой мутации.

Результаты и обсуждение

Ген коннексина 50 (*GJA8*), локализованный в хромосомной области 1q21.1, содержит два экзона, второй из которых — кодирующий (1299 п.н.). Кодируемый геном интегральный белок коннексин 50 (Cx50), состоящий из 432 аминокислот, содержит четыре трансмембранных домена, две экстрацеллюлярные петли, одну интрацеллюлярную петлю и цитоплазматические N- и C-концы [35]. Мутантные коннексины препятствуют образованию щелевых контактов и ингибируют образование каналов [18]. В результате SSCP-анализа кодирующей области гена *GJA8*, проведённого у 40 неродственных больных с врождённой изолированной катарактой из РБ, было выявлено 3 типа изменения нуклеотидной последовательности гена.

У русского больного в гетерозиготном состоянии обнаружена замена гуанина на аденин в положении 179

нуклеотидной последовательности гена, приводящая к замене глицина на аспарагиновую кислоту в 60-м положении аминокислотной последовательности белка (с.179G>A (p.Gly60Asp)) (рис. 1 на 4-й странице обложки). У пациента с данной нуклеотидной заменой была диагностирована врождённая зонулярная катаракта, сочетающаяся с микрофтальмом и микрокорнеа; острота зрения его составляла 0,04—0,05. В результате генеалогического исследования, проведённого в семье данного пациента, был установлен доминантный тип наследования заболевания, однако, к сожалению, ДНК других членов семьи не была доступна для анализа. В литературе нуклеотидная замена с.179G>A ранее не описана. В контрольной выборке здоровых индивидов русской этнической принадлежности данная нуклеотидная замена не обнаружена. Мутация с.179G>A (p.Gly60Asp) затрагивает экстрацеллюлярную петлю E1 белка коннексина 50, аминокислотная последовательность которой является эволюционно высоко консервативной. В частности, аминокислота глицин в 60-м положении этой последовательности также является высоко консервативной [19]. Две экстрацеллюлярные петли Cx50 обеспечивают стыковку между коннексонами, а петля E1 также важна и для создания электрического напряжения в этом соединении, необходимого для смыкания пор щелевого контакта. Мутантные белки могут нарушать нормальное взаимодействие между коннексонами, понижая способность межклеточного канала передавать малые ионы. Учитывая, что глицин — незаряженная аминокислота, а аспарагиновая кислота — моноаминодикарбоновая кислота, несущая в растворе отрицательный заряд, можно предположить и влияние аминокислотной замены p.Gly60Asp на указанные выше процессы. Посредством программы PoliPhen2 был установлен высокий уровень вероятности (0,999) функциональной значимости мутации p.Gly60Asp, её поражающего действия на структуру и функцию белка. На основании этих данных, нуклеотидную замену с.179G>A и соответствующую аминокислотную замену p.Gly60Asp можно считать функционально значимой мутацией, приводящей к развитию врождённой катаракты. Её частота среди неродственных больных с ВНК из РБ составила 2,5%.

У одной больной башкирской этнической принадлежности с передней полярной катарактой идентифицирована делеция десяти нуклеотидов в кодирующей части гена *GJA8*, приводящая к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона (с.133-142delTGGGGGGATG (p.Trp45SerfsX72)) (рис. 2 на 4-й странице обложки). Данная делеция также ранее не описана в литературе и, предположительно, является функционально значимой мутацией. У пациентки с катарактой данная мутация выявлена в гетерозиготном состоянии; в контрольной выборке здоровых индивидов башкирской этнической принадлежности эта делеция не обнаружена. Триптофан в положении 45 в белке коннексина 50 принадлежит первому транс-

мембранному домену (M1) и также является высоко консервативным у разных видов животных. Ранее в гене *GJA8* у больных с врождённой катарактой в семье индийского происхождения V. Vanita с соавторами [30] выявили мутацию с.134G>C (p.Trp45Ser), не обнаруженную ими как у здоровых членов семьи, так и у 108 контрольных лиц из популяции Северной Индии. У всех больных членов этой семьи врождённая катаракта имела медузовидную форму (jellyfish-like) и была ассоциирована с микрокорнеа [30]. Другими авторами [9] была обнаружена мутация в соседнем, 44-м, кодоне гена (p.Val44Glu), также приводящая к катаракте, сочетающейся с микрокорнеа. Кроме того, интересно, что Z. Ma с соавторами [19] описали мутацию p.Trp45Ser, обнаруженную ими в другом, родственном, гене — *GJA3*, — у 10 больных катарактой из трёх поколений в китайской семье. В этой семье у больных диагностировалась ядерная катаракта, но без микрокорнеа [19]. Все эти данные свидетельствуют о важной роли триптофана-45 в белках коннексинов 46 и 50 в поддержании прозрачности хрусталика. Учитывая, что выявленная нами мутация 142delTGGGGGGATG приводит не только к замене аминокислоты, но и к сдвигу рамки считывания и дальнейшей терминации синтеза белка, трудно сомневаться в её функциональной значимости.

У двух неродственных больных русской этнической принадлежности, проживающих в зауральских районах РБ, в гетерозиготном состоянии выявлена известная миссенс-мутация — замена гуанина на тимин в положении 68 нуклеотидной последовательности гена, приводящая к замене аргинина на треонин в положении 23 аминокислотной последовательности белковой молекулы (с.68G>T (p.Arg23Thr)) (rs80358203) (рис. 3 на 4-й странице обложки). У матери одного из этих пациентов, имеющей в анамнезе врождённую катаракту, также идентифицирована данная мутация. ДНК других членов семей этих больных не была доступна для анализа. У одного из больных установлена передняя полярная катаракта, у другого — ядерная катаракта. В контрольных выборках трех этнических групп данная нуклеотидная замена не обнаружена. Мутация в гене коннексина 50 ранее была описана Willoughby с соавторами [33], обнаружившими её в иранской семье с аутосомно-доминантной врождённой прогрессирующей ядерной катарактой. Мутация была выявлена авторами только у больных с катарактой, но не обнаружена у здоровых членов семьи и в контрольной, этнически соответствующей выборке (152 чел.). Кроме того, авторы провели поиск данной мутации, но не обнаружили её в двух группах больных с катарактой из Швеции — у 37 пациентов с врождённой и ювенильной катарактой и у 44 пациентов с возрастной ядерной склеротической катарактой [33]. В молекуле белка коннексина 50 аргинин в позиции 23 относится к цитоплазматическому N-концевому региону, точнее, к границе между цитоплазматическим и первым трансмембранным (M1) доменами (M1: аминокислоты 24—45). Аргинин-23 не считается высоко

консервативной аминокислотой, хотя присутствует в этом положении аминокислотной последовательности как у человека, так и у мыши и крысы, а также у ряда животных из разных таксономических групп в белках других коннексинов — Cx44, Cx45, Cx49 [33]. Однако у человека в позиции 23 белков Cx26, Cx31, Cx37, Cx43, Cx46 вместо аргинина присутствует лизин, который, как и аргинин, является основной полярной положительно заряженной аминокислотой. Поэтому, в целом, аргинин-23 и лизин-23 для различных белков коннексинов можно считать достаточно консервативными аминокислотами, играющими важную роль для поддержания их структуры и функции. Известно, что положительно заряженные аминокислоты в гидрофильных цитоплазматических доменах мембранных белков являются важными факторами для вставки этих белков в мембраны и ориентации гидрофобных трансмембранных элементов [31]. Наряду с этим, ранее было показано, что замены аминокислот в N-концевых доменах белков коннексинов могут приводить к изменению конформации и эластичности amino-концов, а также влиять и на проведение электрического импульса [25]. В случае мутации с.68G>T (p.Arg23Thr) замена аргинина на треонин, незаряженную полярную аминокислоту, может приводить к прямому взаимодействию между интактной и мутантной молекулами коннексина на уровне плазматической мембраны [23]. Следует также отметить, что мутации в N-концах других коннексинов идентифицированы и при ряде других наследственных заболеваний: моторно-сенсорной нейропатии (Cx32), нейросенсорной глухоте (Cx26), эритрокератодермии (Cx31) [16, 17, 24]. Таким образом, можно считать, что выявленная нами и другими авторами мутация p.Arg23Thr оказывает существенное влияние на функцию белка Cx50, вызывая развитие катаракты.

В целом, у четырёх из 40 неродственных больных с аутосомно-доминантной врождённой наследственной катарактой из Республики Башкортостан в гене коннексина 50 выявлены три мутации: с.68G>T (p.Arg23Thr), 179G>A (p.Gly60Asp) и с.133-142delTGGGGGGATG (p.Trp45SerfsX72), две последние из которых ранее не описаны; вклад наследственной врождённой катаракты, обусловленной мутациями в гене *GJA8*, в структуру данного заболевания в РБ составляет приблизительно 10%.

Как уже было сказано, к настоящему времени в гене *GJA8* у больных с наследственной катарактой из различных стран — России [22], Англии [6, 20, 27], Германии [28], Дании [12], Индии [9, 18, 30], Китая [15, 29, 32], Пакистана [7], Ирана [33] — выявлено более 30 различных мутаций, при которых наблюдается значительная межсемейная фенотипическая вариабельность. Это может быть зонулярная, зонулярная порошкообразная, ядерная, ядерная порошкообразная, ядерная катаракта в сочетании с микрокорнеа, а также полная катаракта с нистагмом. Фенотипические различия в проявлении катаракты объясняются различными механизмами действия мута-

ций. Так, например, для мутаций p.Pro88Ser, p.Pro88Gln и p.Arg23Thr был установлен доминантно-негативный эффект [6, 21, 27, 33], а для мутаций p.Asp47Ala, p.Gly22Arg — и механизм «отсутствия функции» [8, 34]. Фенотипическая вариабельность катаракты при различных мутациях в гене *GJA8* подтверждается и нашими исследованиями: при мутации с.68G>T (p.Arg23Thr) у разных больных диагностированы передняя полярная и ядерная формы катаракты, при мутации 179G>A (p.Gly60Asp) — зонулярная катаракта в сочетании с микрофтальмом и микрокорнеа, при мутации с.133-142delTGGGGGGATG (p.Trp45SerfsX72) — передняя полярная катаракта. Тот факт, что при одинаковой мутации могут развиваться фенотипически различные формы катаракты, объясняется предположением о существовании дополнительных генетических и экологических факторов, изменяющих фенотип катаракты [26].

В целом, полученные нами данные пополняют сведения о разнообразии мутаций в гене коннексина 50, приводящих к развитию наследственной катаракты, о их фенотипическом проявлении. Это вносит вклад в познание геногеографии заболевания и служит основой для разработки оптимальных для исследуемого региона подходов ДНК-диагностики и эффективных методов генетического консультирования семей с наследственными формами врождённой катаракты.

Список литературы

1. Зинченко Р.А., Мурзабаева С.Ш., Гринберг Я.И. и др. Генетико-эпидемиологическое изучение населения Республики Башкортостан. Разнообразие моногенной наследственной патологии в пяти районах республики // Генетика. — 2009. — Т. 45, №5. — С. 677—690.
2. Мурзабаева С.Ш., Зинченко Р.А., Гринберг Я.И. и др. Генетико-эпидемиологическое изучение населения Республики Башкортостан. Влияние генетической структуры популяций на уровень груза моногенных наследственных болезней // Генетика. — 2009. — Т. 45, №4. — С. 546—554.
3. Хлебникова О.В., Бессонова Л.А., Кадышев В.В. и др. Медико-генетическое изучение населения Республики Башкортостан. Сообщение IX. Разнообразие спектра и отягощённость наследственной патологией органа зрения в 8 районах Республики Башкортостан // Медицинская генетика. — 2011. — Т. 11, №3. — С. 43—48.
4. Хуснутдинова Э.К. Молекулярная этногенетика народов Волго-Уральского региона. — Уфа: Гилем, 1999. — 237 с.
5. Шамшинова А.М., Волков В.В. Функциональные методы исследования в офтальмологии. — М., 1998. — С. 133—195, 222—253.
6. Arora A., Minogue P.J., Liu X. et al. A novel GJA8 mutation is associated with autosomal dominant lamellar pulverulent cataract: further evidence for gap junction dysfunction in human cataract // J. Med. Genet. — 2006. — Vol. 43. — e.2.
7. Berry V., Mac Kay D., Khaliq S. et al. Connexin 50 mutation in a family with congenital «zonular nuclear» pulverulent cataract of Pakistani origin // Hum. Genet. — 1999. — Vol. 105. — P. 168—170.
8. Chang B., Wang X., Hawes N.L. et al. A Gja8 (Cx50) point mutation in semidominant cataracts of Lop10 mice // Hum. Mol. Genet. — 2002. — Vol. 11. — P. 507—513.

9. Devi R.R., Vijayalakshmi P. Novel mutations in GJA8 associated with autosomal dominant congenital cataract and microcornea // *Mol. Vis.* — 2006. — Vol. 12. — P. 190–195.
10. Francis P.J., Berry V., Bhattacharya S.S., Moore A.T. The genetics of childhood cataract // *J. Med. Genet.* — 2000. — Vol. 37. — P. 481–488.
11. Goodenough D.A., Goliger J.A., Paul D.L. Connexins, connexons, and intracellular communication // *Annu. Rev. Biochem.* — 1996. — Vol. 65. — P. 475–502.
12. Hansen, L., Mikkelsen, A., Nurnberg, P. et al. Comprehensive mutational screening in a cohort of Danish families with hereditary congenital cataract // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2009. — Vol. 50. — P. 3291–3303
13. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
14. <http://www.hmd.org> — 10.01.2014 r.
15. Hu S., Wang B., Zhou Z. et al. A novel mutation in GJA8 causing congenital cataract-microcornea syndrome in a Chinese pedigree // *Mol. Vis.* — 2010. — Vol. 16. — P. 1585–1592.
16. Kelsell D.P., Di W.L., Houseman M.J. Connexin mutations in skin disease and hearing loss // *Am. J. Hum. Genet.* — 2001. — Vol. 68. — P. 559–568.
17. Krutovskikh V., Yamasaki H. Connexin gene mutations in human genetic diseases // *Mutat. Res.* — 2000. — Vol. 462. — P. 197–207.
18. Kumar M., Agarwal T., Khokhar S. et al. Mutation screening and genotype phenotype correlation of α -crystallin, γ - and GJA8 gene in congenital cataract // *Molecular Vision.* — 2011. — Vol. 17. — P. 693–707.
19. Ma Z., Zheng J., Yang F. et al. Two novel mutations of connexin genes in Chinese families with autosomal dominant congenital nuclear cataract // *Br. J. Ophthalmol.* — 2005. — Vol. 89. — P. 1535–1537.
20. Minogue P.J., Tong J.J., Arora A. et al. A mutant connexin50 with enhanced hemichannel function leads to cell death // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2009. — Vol. 50. — P. 5837–5845.
21. Pal J.D., Berthoud V.M., Beyer E.C. et al. Molecular mechanism underlying a Cx50-linked congenital cataract // *Am. J. Physiol.* — 1999. — Vol. 276. — P. 1443–1446.
22. Polyakov A.V., Shagina I.A., Khlebnikova O.V., Evgrafov O.V. Mutation in the connexin 50 gene (GJA8) in a Russian family with zonular pulverulent cataract // *Clin. Genet.* — 2001. — Vol. 60. — P. 476–478.
23. Ressot C., Latour P., Blanquet-Grossard F. et al. X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMTX): new mutations in the connexin 32 gene // *Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 98. — P. 172–175.
24. Richard G., Rouan F., Willoughby C.E. et al. Missense mutations in the GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis deafness syndrome // *Am. J. Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 70. — P. 1341–1348.
25. Rouan F., White T.W., Brown N. et al. Trans-dominant inhibition of connexin-43 by mutant connexin-26: implications for dominant connexin disorders affecting epidermal differentiation // *J. Cell Sci.* — 2001. — Vol. 114. — P. 2105–2113.
26. Shiels A., Hejtmancik J.F. Genetics of human cataract // *Clin. Genet.* — 2013. — Vol. 84, №2. — P. 120–127.
27. Shiels A., MacKay D., Ionides A., Berry V. A missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant «zonularpulverulent» cataract, on chromosome 1q // *Am. J. Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 62. — P. 526–532.
28. Shmidt W., Klopp N., Illig T., Graw J. A novel GJA8 mutation causing a recessive triangular cataract // *Mol. Vis.* — 2008. — Vol. 14. — P. 851–857.
29. Sun W., Xiao X., Li S., Guo X., Zhang Q. Mutational screening of six genes in Chinese patients with congenital cataract and microcornea // *Mol. Vis.* — 2011. — Vol. 17. — P. 1508–1513.
30. Vanita V., Singh J.R., Singh D., Varon R., Sperling K. A novel mutation in GJA8 associated with jellyfish-like cataract in a family of Indian origin // *Mol. Vis.* — 2008. — Vol. 14. — P. 323–326.
31. Verselis V.K., Ginter C.S., Bargiello T.A. Opposite voltage gating polarities of two related connexins // *Nature.* — 1994. — Vol. 368. — P. 348–351.
32. Wang K., Zhou S., Yun B. et al. A novel GJA8 mutation (p.I31T) causing autosomal dominant congenital cataract in a Chinese family // *Mol. Vis.* — 2009. — Vol. 15. — P. 2813–2820.
33. Willoughby C. E., Arab S., Gandhi R. et al. A novel GJA8 mutation in an Iranian family with progressive autosomal dominant congenital nuclear cataract // *J. Med. Genet.* — 2003. — Vol. 40. — e.124.
34. Xu X., Ebihara L. Characterization of a mouse Cx50 mutation associated with the No2 mouse cataract // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 1999. — Vol. 40. — P. 1844–1850.
35. Yi J., Yun J., Li Z.K., Xu C.T. Epidemiology and molecular genetics of congenital cataracts // *Int. Ophthalmol.* — 2011. — Vol. 4 (4). — P. 422–432.

The analysis of the *GJA8* gene in patients with hereditary congenital cataract from Bashkortostan Republic

Khidiyatova I.I.¹, Aznabaev M.T.³, Khidiyatova I.M.^{1,2}, Avkhadeeva S.R.³, Dzhemileva L.U.¹, Zinchenko R.A.⁴, Khusnutdinova E.K.^{1,2}

¹ — Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, 450054, Russia; e-mail: imkhid@mail.ru

² — Bashkir State University, Ufa, Bashkortostan, 450000, Russia; e-mail: ekkh@mail.ru

³ — Bashkir State Medical University, Ufa, Bashkortostan, 450000, Russia; e-mail: indi-86@mail.ru

⁴ — Medical Genetic Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478, Russia; e-mail: renazinchenko@mail.ru

Mutations in the connexin 50 (*GJA8*) gene cause hereditary congenital cataract. The spectrum of mutations in the *GJA8* gene and phenotype features are identified in patients from Bashkortostan Republic. Three different heterozygous mutations are detected in 4 of 40 unrelated patients: c.68G>T (p.Arg23Thr), 179G>A (p.Gly60Asp) and c.133-142delTGGGGGGATG (p.Trp45SerfsX72), the latter two of which hadn't been described earlier. The contribution of hereditary congenital cataract caused by mutations in the *GJA8* gene to the structure of the disease is approximately 10%. Dominant transmission of congenital cataract is found in the families with the identified mutations. In two unrelated patients carrying p.Arg23Thr mutation nuclear and anterior polar forms are revealed. In the patient carrying p.Gly60Asp mutation zonular form in combination with microcornea and microphthalmia was found. The patient with c.133-142delTGGGGGGATG (p.Trp45SerfsX72) mutation demonstrated anterior polar cataract.

Key words: congenital hereditary cataract, connexin 50 (*GJA8*) gene, Bashkortostan Republic (Russia)

Комплексное исследование влияния нефтезагрязнения на генетическое здоровье детей

Джамбетова П.М.¹, Сычева Л.П.², Абилов С.К.³, Солтаева А.М.-Х.¹

¹ — ФГБУВПО «Чеченский государственный университет», г.Грозный, 364907, ул. А. Шерипова, 32; факс: (8712) 21-20-04; e-mail: mail@chesu.ru

² — ФГБУ «НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина», Москва, 119992, ул. Погодинская, д. 10, стр.1; факс: +7(499)245-03-14; e-mail: niisysin@mail.ru

³ — ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН, Москва, 117971, ул. Губкина, 3; факс: 8 (499) 135-62-13; e-mail: iogen@vigg.ru

Проведено комплексное исследование влияния загрязнения почвы нефтепродуктами в Чеченской Республике (ЧР) на генетическое здоровье детского населения с использованием неинвазивных методов: кариологического анализа и учёта частоты врождённых морфогенетических вариантов (ВМГВ). Выявлены ухудшение цитогенетического статуса детей и увеличение среднего числа ВМГВ в нефтезагрязнённых населённых пунктах. Анализ сопряжённости частоты кариологических показателей с полиморфными вариантами генов детоксикации ксенобиотиков, репарации и антиоксидантной защиты выявил достоверно значимую связь между основными цитогенетическими показателями и минорными аллелями генов *SOD2*, *CAT* и *OGG1* при высоком уровне загрязнения нефтепродуктами ($OR = 7,53$ при $p = 0,003$).

Ключевые слова: цитогенетические нарушения, нефтепродукты, врождённые морфогенетические варианты, полиморфизм генов

Введение

Окружающая среда в ЧР длительный период испытывает усиливающийся техногенный стресс как нефтедобывающий и нефтеперерабатывающий регион. В 2000—2004 гг. основными источниками загрязнения окружающей среды на территории Республики были пожары на нефтяных скважинах, нефтепроводах, нефтепарках, сжигание кубового остатка на мини-установках по кустарной переработке нефти и конденсата и т.д. [10]. У населения, проживающего в условиях высокого уровня загрязнения окружающей среды, отмечена повышенная частота хронических заболеваний, новообразований, врождённой патологии новорождённых [7].

На территории ЧР проведено комплексное эколого-генетическое исследование воздействия загрязнения почвы нефтепродуктами на здоровье детского населения, не имеющего отношения к производственной сфере с использованием высокоинформативных неинвазивных методов: кариологического анализа буккальных эпителиоцитов и анализа ВМГВ у детей, а также сопряжённость этих показателей с полиморфизмом 23 генов детоксикации ксенобиотиков, репарации и антиоксидантной защиты.

Материал и методы

Эколого-генетические исследования влияния загрязнения окружающей среды нефтепродуктами на детей проведены в 2007 г. в шести населённых пунктах ЧР:

в сёлах Долинск и Мескер-Юрт, где более 15 лет производилась первичная переработка нефти, а также в условно чистых сёлах Гойты, Червлёная, Зандак и Шатой. Исследование проведено у 319 детей в возрасте 7—10 лет, все они относятся к одной национальности — чеченцы. Родители детей, участвующих в обследовании, подписали формы информированного согласия.

Оценку цитогенетического статуса детей проводили посредством расширенного микроядерного теста буккальных клеток. Материалом служили клетки слизистых оболочек полости рта. Исследования (отбор материала, приготовление и анализ препаратов) проводили в соответствии с методическими рекомендациями «Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека» [2].

Для выявления, учёта и оценки ВМГВ у детей использовали перечень, разработанный на кафедре медицинской генетики Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова [3]. Во время полного наружного осмотра регистрировали наличие каждого из 87 ВМГВ, которые чётко распознаются, согласно международным критериям [13].

ДНК выделяли из крови, которую брали из безымянного пальца левой руки (200 мкл крови) в эппендорфы с K2ЭДТА, и хранили при -18°C . Выделяли ДНК с помощью универсальной пробоподготовки Diatom™ DNAprep 200 (фирма Изоген, Москва). Генотипирование проводили методом аллельспецифической тетрапраймерной ПЦР. Праймеры подбирали с использованием

ем программы Primer 3, находящейся в открытом доступе (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Описательную статистику для количественных и категориальных признаков и анализ сопряжённости полиморфных генетических вариантов с кариологическими показателями методом многомерного регрессионного анализа проводили посредством пакета программ SPSS Statistics 17.0.

Результаты исследования и их обсуждение

В наших исследованиях [4], проведённых ранее в ЧР, показано, что загрязнение почвы нефтепродуктами на уровне приблизительно 45 мг/кг приводит к индукции генных и хромосомных мутаций у бактериальных и растительных тест-объектов, а также у видов дикорастущей флоры.

Для оценки генотоксического действия нефтезагрязнений почвы на здоровье проживающих на этих территориях людей использована методология, включающая комплекс методов оценки генетических нарушений у детей как наиболее чувствительной к воздействию различных факторов части населения. Цитогенетический статус и частоту ВМГВ определяли неинвазивно. Для определения роли генотипа в чувствительности детей к загрязнению окружающей среды нефтепродуктами определяли полиморфизм генов ферментов детоксикации ксенобиотиков, антиоксидантной защиты и репарации ДНК.

1. Кариологический анализ

Оценка частоты клеток с микроядрами является основным общепринятым показателем цитогенетического воздействия исследуемых факторов и может служить биомаркером канцерогенного эффекта [9, 12]. При проведении кариологического анализа буккального эпителия у детей мы руководствовались классификацией Л.П. Сычевой [9], в соответствии с которой кариологические показатели делили на 4 группы: цитогенетические, пролиферации, ранней и поздней деструкции ядра. Все изученные показатели обнаружили достоверно высокую зависимость от уровня загрязнения нефтепродуктами (табл. 1).

Неблагоприятное действие нефтезагрязнений на цитогенетический статус детей статистически значимо выявлено по повышению частоты клеток с микроядрами — в 3,3 раза ($p = 1,3 \times 10^{-20}$), с протрузиями — в 2,8 раза ($p = 1,2 \times 10^{-8}$), клеток с двумя и более ядрами — в 1,3 раза ($p = 8,1 \times 10^{-5}$), клеток в апоптозе — в 1,7 раза ($p = 2,2 \times 10^{-9}$).

Сравнение исследованных показателей в с.Гойты (условно «чистом») и с.Мескер-Юрт и Долинск (более «загрязнённом») показывает, что средний уровень цитогенетических нарушений у детей в условиях нефтезагрязнения повышен в 3 раза; апоптоз, направленный на удаление генетически повреждённых клеток, активируется приблизительно на том же уровне — в 3,2 раза. Для восстановления клеточной популяции необходима активация пролиферативных процессов, что также отмечено при проведении кариологического анализа: доля клеток с двумя и более ядрами статистически достоверно в 1,54 раза выше у детей с.Мескер-Юрт.

2. ВМГВ

как индикаторы загрязнения окружающей среды

В процессе исследования учитывались ВМГВ у детей, проживающих в условиях разной нагрузки среды нефтепродуктами, как показатель, характеризующий генетическое здоровье на уровне целого организма, а также неблагоприятные изменения. Можно предположить, что к формированию ВМГВ могут приводить изменения, выявленные нами при кариологическом анализе у детей, проживающих на загрязнённых нефтепродуктами территориях (повышенная частота цитогенетических нарушений и сдвиги клеточной кинетики), если они возникают на ранних этапах эмбриогенеза.

Для оценки влияния различных факторов среды на процессы морфогенеза рекомендовано использование двух показателей ВМГВ: среднего числа на одного ребёнка и доли детей с пятью ВМГВ и более [5].

Средние значения числа ВМГВ у детей из населённых пунктов Гойты, Шатой, Зандак и Червлёная не различаются; а в нефтезагрязнённых сёлах Долинск и Мескер-Юрт данный показатель в 1,5 раза выше (табл. 2).

Средние значения кариологических показателей в регионах с высоким и низким содержанием нефтепродуктов в почве

Таблица 1

Районы (выборка)	Уровень загрязнения, мкг/г почвы	M ± m, ‰					
		Доля клеток с микроядрами	Доля клеток с протрузиями	Клетки с двумя и более ядрами	Доля клеток с ранним апоптозом	Доля клеток с поздним апоптозом	Все клетки в апоптозе
"Чистые" (231)	< 25	0,58 ± 0,05	1,05 ± 0,12	16,78 ± 0,63	41,18 ± 2,18	18,71 ± 1,33	59,89 ± 2,81
"Грязные" (198)	> 40	1,91 ± 0,12	2,92 ± 0,36	22,31 ± 1,25	62,95 ± 4,45	36,76 ± 3,95	99,70 ± 6,28
Значимость различий по тесту Манна—Уитни (p-value)		$1,3 \cdot 10^{-20}$	$1,2 \cdot 10^{-8}$	$8,1 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$2,0 \cdot 10^{-6}$	$2,2 \cdot 10^{-9}$

Важной популяционной характеристикой при изучении ВМГВ является распределение детей в зависимости от их количества на одного ребёнка. В данном исследовании этот показатель варьировал от 0 до 7 (табл. 3). Полученные результаты показывают значительные отличия по распределению детей в зависимости от количества ВМГВ на одного ребёнка. В «чистых» сёлах Зандак, Гойты, Шатой и Червлёная 56% детей имеют 0–2 ВМГВ, тогда как в сёлах Долинск и Мескер-Юрт таких детей не более 30%. В нефтезагрязнённых сёлах 3 и 4 ВМГВ на одного ребёнка имеют в 1,5 раза больше детей, чем в условно чистых сёлах.

У детей с пятью и более ВМГВ выявлена предрасположенность к развитию экологически обусловленной патологии и снижению адаптационных возможностей организма [5], в результате чего их можно отнести к группе риска. По полученным данным (табл. 3), группа риска из условно чистой зоны (села Гойты, Шатой, Зандак и Червлёная) включает 11 детей (5,97%), а в нефтезагрязнённых населённых пунктах (Долинск и Мескер-Юрт) — 25 детей.

Каждый пятый ребёнок (20,49%) в загрязнённых сёлах входит в число детей группы риска.

Показано, что появление ВМГВ обусловлено действием мутагенов и тератогенов окружающей среды [3]. Известно, что продукты трансформации нефти содержат повышенное содержание полициклических ароматических углеводородов и других веществ, обладающих мутагенным, эмбриотоксическим и канцерогенным действием, что, по-видимому, и привело к повышенной частоте изменения морфогенеза у детей, проживающих в населённых пунктах, различающихся по уровню загрязнения нефтепродуктами.

3. Исследование полиморфизма генов трансформации ксенобиотиков, репарации и оксидативной защиты

В настоящее время большое внимание уделяется изучению полиморфных вариантов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков, репарации ДНК и генов системы оксидантного равновесия, исследуется их вклад в формирование индивидуальной чувствительно-

Таблица 2

Частота ВМГВ у детей, проживающих в исследуемых населённых пунктах

Село	Уровень загрязнения, мкг/г почвы	Среднее число врождённых морфогенетических вариантов на одного ребёнка		
		N	M ± m	ДИ
Зандак	18,0	51	2,6 ± 0,18	2,15–3,14
Гойты	19,0	50	1,8 ± 0,15	1,52–2,10
Червлёная	21,7	55	2,4 ± 0,20	2,03–2,73
Шатой	24,7	50	2,0 ± 0,19	1,82–2,19
Мескер-Юрт	42,5	59	3,1 ± 0,21	2,87–3,41
Долинск	42,5	63	3,4 ± 0,26	2,93–3,67
Примечание. N — количество обследованных детей; M ± m — среднее значение и ошибка среднего; ДИ — доверительные интервалы				

Таблица 3

Распределение и средние значения врождённых морфогенетических вариантов в условно «чистых» и «загрязнённых» нефтепродуктами районах ЧР

Количество ВМГВ у одного ребёнка	Уровень загрязнения на территории населённых пунктов, мкг/г почвы			
	<25 («чистые» населённые пункты)		>40 («загрязнённые» населённые пункты)	
	Количество детей с ВМГВ			
	N	%	N	%
0	21	10,44	3	2,46
1	44	21,36	12	9,84
2	50	24,37	21	17,21
3	44	21,36	35	28,69
4	26	12,62	26	21,31
5	10	4,85	17	13,93
6	1	0,48	6	4,92
7	0	0	2	1,64
M ± m	2,34 ± 0,10		2,94 ± 0,15	
Различия распределений по χ^2 -критерию: p = 0,009				
Различия средних по тесту Манна—Уитни: p = 0,0005				

сти генома человека к действию мутагенных факторов окружающей и производственной среды, и выраженность генотоксических эффектов воздействия химических мутагенов [1, 8, 11].

Для анализа полиморфных вариантов были выбраны гены ферментов детоксикации ксенобиотиков (*CYP1A1* T3801C rs4646903, T606Grs2606345, A4889Grs1048943, *CYP1B1* G1294Crs1056836, *GSTM1*, *GSTT1*, NQ01 609C>T); антиоксидантной защиты (*SOD2* C47Trs4880, *CAT* T21Ars7943316, *GCLC* C129Trs17883901); ферментов репарации (*XRCC1* C589Trs1799782, *XRCC1* G1996Ars25487, *XPB* T2251Grs13181, *XPB* G862Ars1799793, *ERCC1* T354Crs11615, *OGG1* C977Grs1052133, *APEX1* T444Grs1130409, *ATM* G5557Ars664143) и гена — триггера *MTHFR* C677Trs1801133.

Анализ данных генов не выявил частотных различий полиморфных вариантов генов детоксикации ксенобиотиков, что подтверждается данными литературы, согласно которым не обнаружено различий между работниками нефтехимических производств с профессиональными заболеваниями по сравнению с контрольной группой по генам *CYP1A1*, *CYP1B1*, *GSTM1*, *GSTT1* [6].

Более чувствительными к загрязнению нефтепродуктами окружающей среды оказались дети, у которых обнаружены полиморфные варианты генов репарации и антиоксидантной защиты: аллели генов репарации *XRCC1* 580 C>T, *OGG1* 977C>G, *XPB* 862G>A, *XPB* 2251T>G и генов оксидативной защиты *SOD2* 47C>T и *CAT* 21T>A обнаружили значимую сопряженность со средним уровнем частоты клеток с микроядрами ($p = 0,01–0,05$).

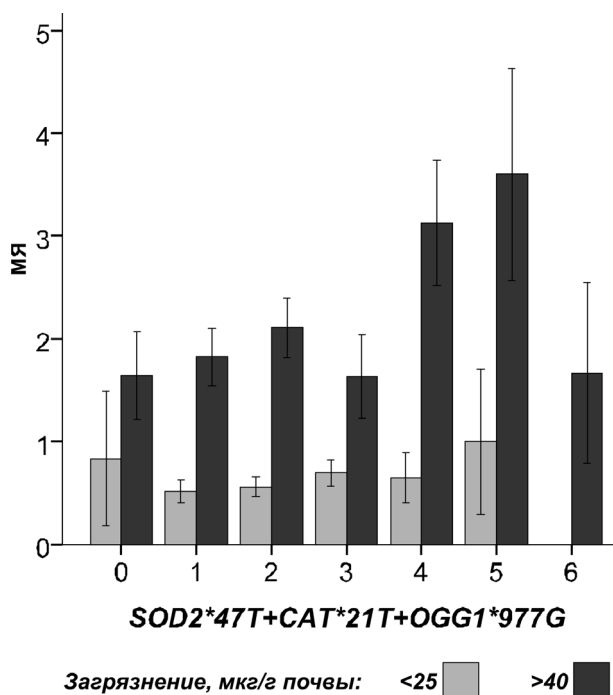
Многомерный регрессионный анализ выявил, что частота клеток с микроядрами ассоциирована только с носительством аллелей *XPB**2251T ($p = 0,003$). При этом генетическая изменчивость определяет лишь 1,6% изменчивости признака доли клеток с микроядрами, в то время как вклад уровня загрязнения составляет 20,6%. Значимая сопряженность клеток с протрузиями с локусами генов *OGG1* и *CAT* ($p = 0,01–0,05$) также не подтверждена регрессионным анализом. Уровень загрязнения значимо определяет 5,9% изменчивости частоты клеток с протрузиями ($p = 3,5 \times 10^{-7}$).

Регрессионный анализ подтвердил значимость ассоциации полиморфизма *XPB* 2251T>G с суммарной частотой клеток с микроядрами и протрузиями, однако коэффициент детерминации для этой сопряженности был предельно низок (0,8%). Уровень загрязнения окружающей среды нефтепродуктами определяет 14,6% изменчивости частоты суммарного числа микроядер и протрузий ($p = 3,0 \times 10^{-16}$).

Частота апоптозных клеток в значительной степени ассоциирована с носительством минорного аллеля *XRCC1**580T ($p = 0,005$) с коэффициентом детерминации 1,7%. Однако уровень загрязнения нефтепродуктами определяет 8,6% изменчивости частоты апоптозных клеток ($p = 3,8 \times 10^{-9}$).

Гены оксидативной защиты (*SOD2*, *CAT*, *GCLC*) и эксцизионной репарации оснований (*XRCC1*, *PARP1*, *APEX1*, *OGG1*) неоднократно обнаруживали тенденцию к сопряженности с различными кариологическими показателями. Результаты стандартного анализа таблиц сопряженности при высоком и низком уровнях загрязнения нефтепродуктами показали, что носительство аллелей генов *SOD2*, *CAT* и *OGG1* при высоком уровне загрязнения нефтепродуктами ассоциировано с повышенным уровнем числа клеток с микроядрами (OR = 7,53 при $p = 0,003$ по точному тесту Фишера) (рисунок).

Таким образом, проведенное нами комплексное исследование установило неблагоприятное воздействие нефтезагрязнений почвы населенных мест ЧР на генетическое здоровье детского населения, которое проявилось на индивидуальном и групповом уровнях в ухудшении среднего числа ВМГВ. Выявлены ген репарации ДНК и два гена антиоксидантной системы организма, ассоциированные с повышенной чувствительностью детей к генотоксическому действию нефтезагрязнения окружающей среды. Выявленные изменения служат неспецифическими биомаркерами, ассоциированными с риском развития новообразований, репродуктивной токсичности, врожденных пороков развития, преждевременного старения и ряда мультифакториальных заболеваний. Полученные результаты могут служить научным обоснованием необходимости принятия мер по «оздоровлению» территорий с нефтезагрязнением почвы, контролю и оздоровлению детей из группы риска.



Средние уровни числа клеток с микроядрами у носителей различного числа аллелей в сайтах генов *SOD2*, *CAT*, *OGG1*

Список литературы

1. Ахмадишина Л.З., Корытина Г.Ф., Кочетова О.В. и др. Полиморфизм генов семейства цитохрома P450 (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2E1*) и риск развития профессионального хронического бронхита // Экологическая генетика. — 2009. — Т. 3, №1. — С. 11–17.
2. Беляева Н.Н., Сычева Л.П., Журков В.С., Шамарин А.А. и др. Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека: Методические рекомендации. — М., 2005. — 37 с.
3. Бочков Н.П., Субботина Т.И. и др. Изучение врождённых морфогенетических вариантов у детей // Гигиена и санитария. — 1994. — №3. — С. 53–55.
4. Джембетова П.М., Реутова Н.В. Использование видов дикорастущей флоры для генетического мониторинга окружающей среды // Экология урбанизированных территорий. — 2012. — №4. — С. 73–77.
5. Котышева Е.Н. Врожденные морфогенетические варианты в эколого-генетических исследованиях: Монография. — Магнитогорск, 2007. — 222 с.
6. Макарова О.В., Викторова Т.В., Каримова Л.К. и др. Поиск генетических маркеров прогнозирования эффектов воздействия вредных факторов нефтехимических производств на организм рабочих // Казанский медицинский журнал. — 2003. — Т. 84, №4. — С. 311–314.
7. Муслуева Э.З., Куценко И.И. Анализ врожденных пороков развития у новорожденных в Чеченской Республике // Успехи современного естествознания». — 2006. — №2. — С. 64.
8. Ревазова Ю.А., Хрипач Л.В., Сидорова И.Е. и др. Генетический полиморфизм и частота спонтанных и индуцированных хромосомных aberrаций в лимфоцитах жителей Москвы // Медицинская генетика. — 2009. — №4. — С. 26–35.
9. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека // Медицинская генетика. — 2007. — №6 (11). — С. 3–11.
10. Шахтамиров И.Я., Амирова З.К., Делаев У.А. Мониторинг стойких органических соединений на территории Чеченской Республики. — Грозный: ФГУП «Грозненский рабочий», 2010. — 304 с.
11. Georgiadis P., Topinka J., Vlachodimitropoulos D. Interactions between *CYP1A1* polymorphisms and exposure to environmental tobacco smoke in the modulation of lymphocyte bulky DNA adducts and chromosomal aberrations // Carcinogenesis. — 2005. — №26 (1). — P. 93–101.
12. Holland N., Bolognesi C., Kirsch-Volders M., Bonassi S. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for bio-monitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps // Mutat. Res. — 2008. — Vol. 659 (1–2). — P. 93–108.
13. Spranger J., Benirschke K., Hall J.G. et al. Errors of morphogenesis: Concepts and terms. Recommendations of an International Working Group // J. Pediatr. — 1982. — Vol. 100, №1. — P. 160–165.

Comprehensive study of the impact of oil pollution on the genetic health of children

Dzhambetova P.M.¹, Sycheva L.P.², Abilev S.K.³, Soltaeva A.M.-H.¹¹ — FGBU VPO Chechen State University,

Grozny, 364907, st. A. Sheripova, 32; fax: (8712) 21-20-04, e-mail: mail@chesu.ru

² — FGBU A.N. Sysin Institute of Human Ecology and Environmental Hygiene,

Moscow, 119992, st. Pogodinskaya, 10, p.1, fax: +7 (499) 245-03-14; e-mail: niisysin@mail.ru

³ — FGBU N. Vavilov Institute of General Genetics of Sciences,

Moscow, 117971, st. Gubkin, 3, fax: 8 (499) 135-62-13, e-mail: iogen@vigg.ru

A comprehensive study of soil contamination with oil products in the Chechen Republic on the genetic health of the child population was conducted using non-invasive methods: karyological analysis and assessment of the incidence of congenital morphogenetic variants. It was revealed the deterioration of cytogenetic status of children and increase the average number of congenital morphogenetic variants in oil-polluted localities. We revealed a significant association between major cytogenetic biomarkers and minor alleles of genes xenobiotic detoxification, repair and antioxidant protection *SOD2*, *CAT* and *OGG1* at high level of oil pollution (OR = 7,53 at p = 0.003).

Key words: cytogenetic disorders, congenital morphogenetic variants, petroleum products, gene polymorphisms

Правила оформления статей в журнале «Медицинская генетика»

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

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

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

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

- указание на одобрение исследования локальным или центральным этическим комитетом.

В конце статьи должны быть подписи всех авторов и полностью указаны фамилия, имя, отчество, полный почтовый адрес, номер телефона, адрес электронной почты автора, осуществляющего связь с редакцией. Материалы, не отвечающие этим требованиям, не принимаются.

Печатать следует на одной стороне листа формата А4 через 2 интервала, шрифтом Times Roman, 12 пунктов без переносов и выравнивания по правому краю. Все поля страницы должны быть не менее 25 мм. Нумерация страниц, включая первую, приводится внизу по центру. Общий объём рукописи, включая аннотации на русском и английском языках, список литературы, таблицы, рисунки и подписи под рисунками, не должен превышать для оригинальных статей 16 страниц, для обзорных и теоретических — 32 страницы, для кратких сообщений — 8 страниц. Число таблиц и число рисунков не должно быть более пяти, за исключением особых случаев, одобренных редколлегией журнала. Размеры рисунков и таблиц не должны превышать одной страницы формата А4. Статьи большего объёма могут быть опубликованы в исключительных случаях по решению редакционной коллегии.

Структура статьи:

1. Название статьи, напечатанное строчными буквами без разрядки и выделения;
2. Фамилия(и) и инициалы автора(ов);
3. Место работы автора(ов): полное название учреждения (аббревиатуры недопустимы), город, почтовый адрес с индексом, адрес электронной почты (отметить арабскими цифрами соответствие авторов учреждениям, в которых они работают);
4. Аннотация (объёмом не более 0,5 стр.);
5. Ключевые слова (не более 5);
6. Экспериментальные оригинальные статьи должны иметь разделы: введение, материалы и методы, результаты, обсуждение. Два последних раздела могут быть объединены;
7. Теоретические и обзорные статьи могут иметь иные подразделы.
8. Краткие сообщения печатаются без подразделения на части.

9. В завершение рукописи в обязательном порядке должны быть упомянуты все лица и организации, оказавшие финансовую поддержку исследованию (в виде грантов, дарения или предоставления оборудования, реактивов, расходных материалов, лекарств или всего этого вместе), а также принявшие другое финансовое или личное участие, которое может привести к конфликту интересов, или декларируется отсутствие у авторов конфликта интересов.

10. В конце текста статьи могут быть выражены признательность отдельным лицам и (или) научным или иным фондам и организациям, оказавшим помощь в выполнении работы;

11. После текста статьи приводится список литературы;

12. Каждая таблица печатается на отдельной странице;

13. На отдельной странице приводятся подписи к рисункам, с указанием названия статьи и авторов;

14. По-английски на отдельной странице печатаются название статьи, фамилия (фамилии) и инициалы автора (авторов), название учреждения, его адрес, включая адрес электронной почты, перевод аннотации статьи (не более 0,5 стр.), ключевые слова (не более 5).

Названия разделов печатаются заглавными буквами на отдельной строке. Подзаголовки внутри разделов также печатаются на отдельной строке. На левом поле по тексту статьи указываются места расположения рисунков и таблиц. Сложные математические формулы печатаются на отдельной строке (следует использовать редактор формул, встроенный в текстовый редактор Word). Формулы нумеруются справа в круглых скобках в случае ссылок на них по ходу текста статьи

Данные рисунков не должны повторять материалы таблиц. Рисунки должны быть чёткими с минимальным количеством обозначений. Детали на рисунках обозначаются арабскими цифрами либо русскими буквами, которые расшифровываются в подписочных подписях. В подписях к микрофотографиям необходимо указать метод окраски, если препарат окрашен, и увеличение.

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

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

Ссылка на публикацию в периодическом издании должна содержать фамилии и инициалы авторов, название статьи, название журнала, год, том, номер и страницы.

Примеры оформления ссылок:

Сурин В.Л. Лабораторная диагностика острой перемежающейся порфирии // Генетика. — 2001. — Т. 2, №5. — С. 690—697.

Gu X.K. The porphyrias: recent advances // Clin. Chem. — 1986. — Vol. 32, №3. — P. 1255—1265.

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

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

Ссылка на материалы авторефератов диссертаций:

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

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

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

Датой поступления статьи считается день получения редакцией окончательного текста.

Отклонённые статьи не возвращаются.

Авторский гонорар не выплачивается.

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

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

Статьи следует направлять по адресу:

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

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