

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 молекулярной 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

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

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

Тираж 200 экз.

Медицинская ГЕНЕТИКА

Ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал

2015 г. Том 14. №8 (158)

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Прошлякова Т.Ю., Байдакова Г.В., Букина Т.М., Михайлова С.В., Ильина Е.С., Руденская Г.Е., Ключников С.А., Малахова В.А., Захарова Е.Ю.*
Биохимические маркеры при болезни Ниманна–Пика типа С 3
- Гончарова И.А., Кучер А.Н., Тарасенко Н.В., Макеева О.А., Слепцов А.А., Брагина Е.Ю., Марков А.В., Пузырев В.П.*
Разработка панели генетических маркёров фиброгенеза и оценка её информативности для русского населения г.Томска 7
- Барашков Н.А., Кларов Л.А., Терютин Ф.М., Соловьев А.В., Пшенникова В.Г., Конникова Э.Э., Николаева К.Ю., Романов Г.П., Готовцев Н.Н., Саввинова К.Е., Кожевников А.А., Васильева Л.М., Федотова Э.Е., Пак М.В., Леханова С.Н., Лугинов Н.В., Морозов И.В., Бондарь А.А., Соловьева Н.А., Рафаилов А.М., Сазонов Н.Н., Алексеев А.Н., Посух О.Л., Джемилева Л.У., Хуснутдинова Э.К., Федорова С.А.*
Новая нонсенс-мутация p.Trp325Ter (c.977G>A) в гене *POU3F4* в якутской семье с синдромом Gusher (DFNX2) 13
- Гараева С.З.*
Генетический скрининг наследственных гемоглинопатий у новорождённых с задержкой внутриутробного развития 25
- Амелина М.А., Степанова А.А., Поляков А.В., Амелина С.С., Зинченко Р.А.*
Спектр и частота встречаемости мутаций в гене *PAH* у больных фенилкетонурией Ростовской области 30

МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПОМОЩЬ

- Брюханова Н.О., Жилина С.С., Мutowин Г.Р., Зинченко Р.А.*
Московский региональный сегмент
Федерального регистра орфанных заболеваний 37

ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ

- Осадчук Т.В., Румянцева Н.В., Зобикова О.Л., Наумчик И.В.*
Молекулярно-генетическая диагностика
семейного случая синдрома LEOPARD в Беларуси 42

ИНФОРМАЦИЯ

- Резолюция Экспертного Совета
по оптимизации подходов к диагностике и лечению
редкого наследственного заболевания — гипофосфатазии 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.
RUBTZOVA 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

2015. Volume 14. №8 (158)

Content

ARTICLES

- Proshlyakova T.Y., Baydakova G.V., Bukina T.M., Mikhailova S.V., Ilina E.S., Rudenskaya G.E., Klyushnikov S.A., Malakhova V.A., Zakharova E.Y.*
Biochemical markers of Niemann–Pick disease type C3
- Goncharova I.A., Kucher A.N., Tarasenko N.V., Makeeva O.A., Sleptsov A.A., Bragina E.U., Markov A.V., Puzirev V.P.*
Development of the genetic markers of fibrogenesis panel and evaluating its informativity for Russian population (Tomsk)
- Barashkov N.A., Klarov L.A., Teryutin F.M., Solovyev A.V., Pshennikova V.G., Konnikova E.E., Nikolaeva K.Yu., Romanov G.P., Gotovtsev N.N., Savvinova K.E., Kozhevnikov A.A., Vasilieva L.M., Fedotova E.E., Pak M.V., Lekhanova S.N., Luginov N.V., Morozov I.V., Bondar A.A., Solovyeva N.A., Rafailov A.M., Sazonov N.N., Alexeev A.N., Posukh O.L., Dzhemileva L.U., Khusnutdinova E.K., Fedorova S.A.*
Novel mutation p.Trp325Ter (c.977G>A) in the *POU3F4* gene in Yakut family (Eastern Siberia) with perilymphatic Gusher-deafness syndrome (DFNX2).....13
- Garayeva S.Z.*
Genetic aspects of intrauterine growth restriction.....25
- Amelina M.A., Stepanova A.A., Polyakov A.V., Amelina S.S., Zinchenko R.A.*
Spectrum and frequency of mutations in *RAH* gene in patients with phenylketonuria from Rostov region30

GENETIC SERVICE

- Bryukhanova N.O., Zilina S.S., Mutovin G.R., Zinchenko R.A.*
Moscow regional segment of the Federal orphan diseases register. A report at the end of the second quarter of 2015.....37

CASE REPORT

- Asadchuk T.V., Rummyantseva N.V., Zobikova O.L., Naumchik I.V.*
Molecular genetic diagnostics of family case of LEOPARD syndrome in Belarus.....42

INFORMATION

- Resolution of the Expert Council by optimizing the diagnosis and treatment of a rare hereditary disease — hypophosphatasia47

Биохимические маркёры при болезни Ниманна—Пика типа С*

Прошлякова Т.Ю.¹, Байдакова Г.В.¹, Букина Т.М.¹, Михайлова С.В.²,
Ильина Е.С.², Руденская Г.Е.¹, Ключников С.А.³, Малахова В.А.¹, Захарова Е.Ю.¹

¹ — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1, e-mail: t.proshlyakova@mail.ru

² — ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России, 117513, Москва, Ленинский пр-т, д. 117

³ — ФГБНУ «Научный центр неврологии», 105064, Москва, ул. Обука, д.5, стр.1

Болезнь Ниманна—Пика типа С (НПС) — наследственное аутосомно-рецессивное прогрессирующее заболевание нервной системы из группы лизосомных болезней накопления (ЛБН). Продолжительное время единственным методом подтверждающей диагностики болезни НПС было молекулярно-генетическое исследование генов *NPC1* и *NPC2*, однако сейчас в литературе появляется все больше данных о новых биохимических маркёрах для этого заболевания. Цель исследования — оценка информативности биохимических маркёров хитотриозидазы и холестеран-3 β ,5 α ,6 β -триола (триола) при болезни НПС.

Ключевые слова: болезнь Ниманна—Пика типа С, биохимические маркёры, триол, хитотриозидаза

Введение

Болезнь Ниманна—Пика типа С (НПС) — наследственное аутосомно-рецессивное прогрессирующее заболевание нервной системы из группы лизосомных болезней накопления (ЛБН), возникающее в результате нарушения внутриклеточного распределения сфинголипидов.

Частота болезни НПС, по данным литературы, составляет 1 : 100 000 — 1 : 120 000 живорожденных [17]. Болезнь Ниманна—Пика типа С обусловлена мутациями в двух генах: *NPC1* (локус 18q11-q12) примерно в 95% случаев заболевания или *NPC2* (локус 14q24.3), примерно в 5% случаев [7]. В настоящий момент в гене *NPC1* описано 363 различных мутаций, в гене *NPC2* — 22 различных мутаций (The Human Gene Mutation Database www.hgmd.cf.ac.uk/), частоты которых широко варьируют в разных этнических группах.

Механизмы молекулярного развития болезни НПС пока еще не полностью изучены [14]. Известно, что ген *NPC1* относится к семейству генов, кодирующих мембраносвязанные стеролчувствительные белки, отвечающие за транспорт холестерина и липидов внутри клетки, белок NPC1 содержит 13 трансмембранных доменов [8]. Для выполнения своих функций он очень тесно взаимодействует с продуктом гена *NPC2*, представляющим собой белок, имеющий высокое сродство к холестерину, и являющийся его внутрилизосомным транспортером. При НПС накапливаемые метаболиты представляют не только сложные, но и разнообразные классы липидов — незэстерифицированный холестерин, сфингомиелин, гликосфинголипиды, сфингозин. Их накопление в лизосомах полностью нарушает встраивание в мембраны клетки, в результате чего происходит нарушение кле-

точной функции, и в конечном итоге запускается процесс апоптоза [11, 16].

Клиническая картина при болезни НПС весьма разнообразна: продолжительность жизни, спектр и тяжесть клинических проявлений значительно варьируют среди больных и могут значительно различаться даже внутри одной семьи. Пик манифестации приходится на детский и юношеский возраст [2]. На первый план выходят неврологические нарушения: моторная неловкость, неуклюжесть, частые падения, которые нередко сочетаются с изолированной гепато- или спленомегалией. Характерные неврологические симптомы в виде вертикального и горизонтального пареза взора, появляются вслед за развитием мозжечковых расстройств, смешанной дизартрии, дисфагии и интеллектуальных нарушений, а также медленно прогрессирующих психиатрических расстройств. Также описаны «висцеральные» формы болезни с прогрессирующей гепато- или спленомегалией [3, 4].

Для лечения заболевания недавно был разработан препарат Миглустат. Применение этого препарата в терапии НПС позволяет замедлить скорость прогрессирования заболевания. Поэтому ранняя диагностика очень важна для своевременного назначения субстрат-редуцирующей терапии [13].

Основным методом диагностики болезни НПС долгое время являлся гистохимический метод окрашивания филипином клеток культуры фибробластов. При таком исследовании в 80—85% случаев выявляются интенсивные флюоресцирующие области, сконцентрированные вокруг клеточного ядра, содержащие накопленный незэстерифицированный холестерин, и выглядящие как перинуклеарные пузырьки [10].

* Авторы благодарят за помощь в определении уровня триола Prof Marquardt Thorsten (Zentrum fuer Kinderheilkunde, Muenster, Germany) и Dr Sara Boenzi (Laboratory of Metabolic Biochemistry, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy), а также всех врачей и семьи пациентов за участие в данном исследовании.

Однако гистохимические исследования трудоемки, требуют проведения биопсии кожи и культивирования клеток. Именно поэтому проводятся исследования по поиску других биохимических маркёров и наиболее быстрых и экономичных способов выявления потенциально больных пациентов с НПС [1].

При подавляющем большинстве ЛБН биохимическими маркёрами являются ферменты, активность которых снижается или увеличивается в десятки раз или накапливаемые метаболиты в биологических жидкостях и тканях. Для болезни НПС свойствен нормальный уровень или незначительное снижение лизосомного фермента сфингомиелиназы, в отличие от очень низкого уровня активности, определяемого при болезни Ниманна—Пика типа А/В [18]. Однако этот маркёр не может быть надежным и информативным. Плазматическая хитотриозидаза повышается при многих ЛБН, чрезвычайно информативна в качестве скринингового маркёра при болезни Гоше (повышается в сотни раз), но также ее активность повышается и при болезни НПС [5, 14].

В ряде зарубежных работ показано, что в плазме крови пациентов с болезнью НПС происходит накопление производных холестерина — холестеран-3 β ,5 α ,6 β -триола — входящего в группу оксистеролов, который возможно измерить масс-спектрометрическими методами (ГХ-МС или ВЭЖХ-МС/МС) [12]. Уровень этого метаболита не повышается при других нейродегенеративных заболеваниях и лизосомных болезнях накопления [9].

Целью данного исследования был анализ информативности биохимических маркёров хитотриозидазы и триола в диагностике болезни НПС.

Материалы и методы

В исследование были включены 50 пациентов из Российской Федерации, подходившие по критериям отбора на болезнь НПС в возрасте от 3 мес. до 37 лет. По полу пациенты были распределены примерно поровну: М — 24, Ж — 26. Для биохимического анализа использовалась плазма венозной крови пациентов. От каждого пациента получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Измерение активности хитотриозидазы проводилось стандартным флюориметрическим методом на флюориметре LS55 Luminescence Spectrometer (Perkin Elmer, U.K.). Измерение концентрации холестеран-3 β ,5 α ,6 β -триола проводилось совместно с коллегами из Центра здоровья детей в Мюнстере на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором GCMS QP2010 (Shimadzu, Japan) [15], а также в лаборатории наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ «МГНЦ» на tandemном масс-спектрометре Sciex 3200QTrap (ABSciex, USA) с ВЭЖХ системой LC20 (Shimadzu, Japan).

Для оценки чувствительности, специфичности и других показателей информативности показателей использовали онлайн программу [\[ges.org/ctab2x2\]\(http://statpa-\). Оценку статистической значимости результатов проводили с использованием программы Statistica и методов непараметрической статистики. Анализ данных предшествовала проверка распределений значений показателей на соответствие критериям «нормальности». В отсутствие таковой использовался критерий Ньюмана—Кейлса.](http://statpa-</p>
</div>
<div data-bbox=)

Результаты и обсуждение

В данном исследовании измерение активности хитотриозидазы и концентрации триола была проведена для 50 пациентов. Все пациенты подходили по критериям отбора на болезнь НПС и имели минимум один ключевой симптом: гепато- или спленомегалия, вертикальный парез взора, катаплексия, атаксия и задержка психомоторного развития.

Используя данные молекулярно-генетического исследования генов *NPC1* и *NPC2* и информацию о выявленных мутациях и подтвержденных диагнозах, всех пациентов разделили на 4 группы:

1-я группа — пациенты с установленным диагнозом НПС — $n = 7$;

2-я группа — пациенты с сомнительным результатом (одна замена в гене *NPC1* или *NPC2* в гетерозиготном состоянии) — $n = 8$;

3-я группа — пациенты, у которых установлен другой диагноз (Gm1-ганглиозидоз, синдром Алажиля, синдром Ли, синдром Кернс—Сейера, синдром истощения мт-ДНК) — $n = 5$;

4-я группа — пациенты без выявленных мутаций в генах *NPC1* и *NPC2*, с неизвестным диагнозом — $n = 30$.

Активность хитотриозидазы

Повышение активности хитотриозидазы было выявлено у 12 пациентов: у 86% группы 1 (6/7), у 0% (0/8) — группы 2, у 20% (1/5) — группы 3 и у 17% (5/30) группы 4. У трёх пациентов активность хитотриозидазы была крайне низкая, что указывало на мутации в гене хитотриозидазы и они были исключены из дальнейшей обработки данных. В контрольную группу пациентов были отобраны условно здоровые родители-носители ($n = 25$), у которых не было выявлено повышение активности хитотриозидазы (рис. 1).

Для анализа информативности биохимического маркёра были рассчитаны основные показатели метода. Чувствительность теста составила 86% (ДИ 95% 46—99%). Специфичность теста — 83% (ДИ 95% 75—86%). Положительная прогностическая ценность — 50% (ДИ 95% 27—58%). Отрицательная прогностическая ценность — 97% (ДИ 95% 87—99%). Диагностическая точность — пропорция правильных результатов (положительных и отрицательных) среди всех обследованных — 83% (ДИ 95% 70—88%).

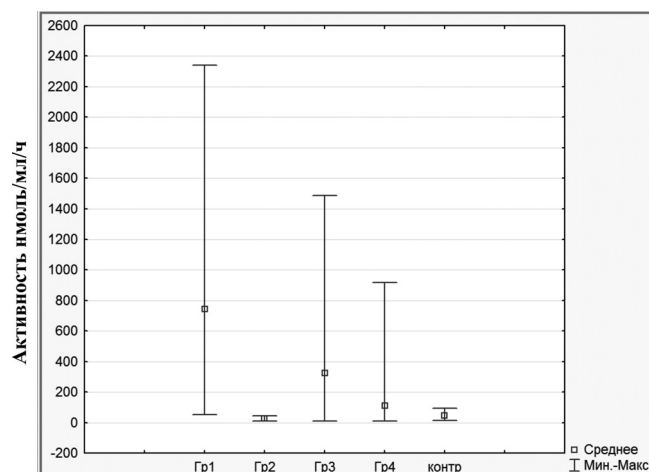


Рис. 1. Распределение показателей активности хитотриозидазы по группам пациентов.

Подводя итоги анализа информативности и значимости биохимического метода измерения активности хитотриозидазы, можно говорить о необходимости использования этого метода на первом этапе диагностики болезни НПС. Показаны достаточно высокие показатели чувствительности и специфичности, однако, низкая положительная прогностическая ценность. Наиболее информативной и значимой получилась отрицательная прогностическая ценность. Таким образом, для пациентов, с показателями активности хитотриозидазы в норме, необходимо проводить исследование по поиску заболевания вне группы ЛБН, в том числе не на болезнь НПС.

Концентрация холестерин- 3β , 5α , 6β -триола

Верхняя граница нормы, описанная в литературе для показателя концентрации триола — <0.05 нг/мкл [6]. Повышенный показатель был обнаружен у 13 пациентов: у 100% группы 1 (7/7), у 0% (0/8) — группы 2 у 0% (0/5) — группы 3 и у 20% (6/30) группы 4 (рис. 2).

Для метода определения концентрации триола рассчитаны основные показатели информативности с использованием онлайн программы <http://statpages.org/ctab2x2>. Чувствительность теста составила 100% (ДИ 95% 60—100%). Специфичность теста — 83%

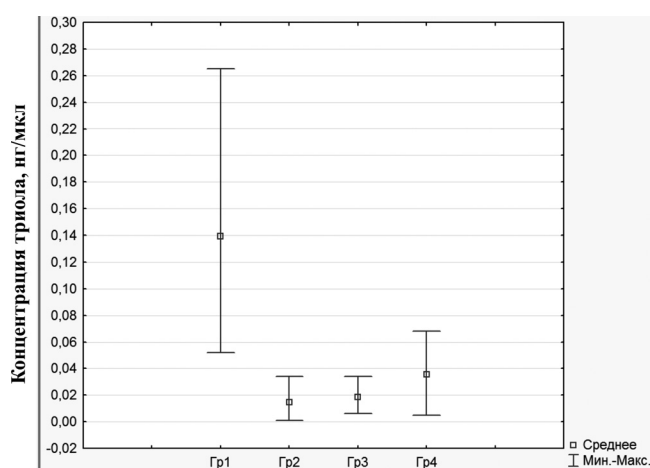


Рис. 2. Распределение показателей концентрации триола по группам пациентов

(ДИ 95% 75—83%). Положительная прогностическая ценность — 54% (ДИ 95% 33—54%). Отрицательная прогностическая ценность — 100% (ДИ 95% 90—100%). Диагностическая точность — пропорция правильных результатов (положительных и отрицательных) среди всех обследованных — 86% (ДИ 95% 73—86%).

Результаты проверки распределений всех значений в четырёх сравниваемых группах на нормальность показали, что у всех параметров нормальность распределения отсутствует, поэтому последующая статистическая обработка данных проводилась с использованием непараметрических методов анализа. Оценка межгрупповых различий с использованием критерия Ньюмана—Кейлса приведена в таблице.

Статистически достоверные различия между четырьмя исследованными группами были обнаружены только с болезнью НПС ($p < 0,05$). Показатели концентрации триола у этих пациентов достоверно отличаются от всех остальных групп пациентов.

Для биохимического метода измерения концентрации триола показана высокая чувствительность и специфичность, но низкая положительная прогностическая ценность. Данный биохимический маркер очень чувствителен к транспортировке и при нарушении холо-

Анализ межгрупповых различий концентрации триола по критерию Ньюмана—Кейлса

Таблица

	Критерий Ньюмана—Кейлса. Отмечены разности, значимые при $p < 0,0500$			
	Группа 1, $M = 0,0355$	Группа 2, $M = 0,01450$	Группа 3, $M = 0,13929$	Группа 4, $M = 0,01880$
Группа 1		0,4449	0,000119	0,33472
Группа 2	0,44409		0,00017	0,80298
Группа 3	0,000119	0,00017		0,00013
Группа 4	0,334725	0,80298	0,00013	

дового режима его концентрация может повышаться. Наиболее информативной и значимой является отрицательная прогностическая ценность, так же, как и в результате анализа активности хитотриозидазы. Таким образом, отбор пациентов для дальнейшего молекулярно-генетического анализа, необходимо проводить с учетом концентрации триола.

Совместный анализ биохимических маркёров

Повышение двух параметров одновременно наблюдалось только в группе 1 у 86% (6/7), в других трех группах не было выявлено повышение активности хитотриозидазы совместно с повышением концентрации триола.

При суммарном анализе биохимических маркёров: чувствительность составила — 86% (ДИ 95% 51–86%), специфичность — 100% (ДИ 95% 94–100%), положительная прогностическая ценность — 100% (ДИ 95% 59–100%), отрицательная прогностическая ценность — 98% (ДИ 95% 92–98%), диагностическая точность — 98% (ДИ 95% 82–98%).

Полученные результаты свидетельствуют о высокой информативности одновременного определения двух биомаркёров при проведении селективного скрининга на НПС.

Список литературы

1. Михайлова С.В., Захарова Е.Ю. Болезнь Ниманна—Пика типа С // Метод. Пособ. — М.: ГЭОТАР-Медиа. — 2013. — 48 с.
2. Михайлова С.В., Захарова Е.Ю., Букина Т.М. Болезнь Ниманна—Пика, тип С. Клинические примеры // Педиатрическая фармакология: научно-практический журнал Союза педиатров России. — 2010. — Т. 7, №5. — С. 48–53.
3. Михайлова С.В., Захарова Е.Ю., Петрухин Ф.С. Нейрометаболические заболевания у детей и подростков. — М.: Литература. — 2011. — С. 352.
4. Руденская Г.Е., Букина Т.М., Захарова Е.Ю. Болезнь Ниманна—Пика тип С: взрослая форма с преобладанием психических расстройств // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2011. — Т. 111, №7. — С. 71–75.
5. Руденская Г.Е., Захарова Е.Ю., Букина Т.М. Болезнь Ниманна—Пика типа С (ювенильный дистонический липидоз) // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2008. — №5. — С. 76–79.
6. Boenzi Sara et al. A new simple and rapid LC-ESI-MS/MS method for quantification of plasma oxysterols as dimethylaminobutyrate esters. Its successful use for the diagnosis of Niemann—Pick type C disease // Clin. Chim. Acta. — 2014.
7. Carstea E.D., Polymeropoulos M.H., Parker C.C., Deterra-Wadleigh S.D., O'Neill R.R., Patterson M.C., Goldin E., Xiao H., Straub R.E., Vanier M.T. Linkage of Niemann—Pick disease type C to human chromosome 18 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1993. — Vol. 90. — P. 2002–2004.
8. Greer W.L., Dobson M.J., Girouard G.S. Mutations in NPC1 highlight a conserved NPC1-specific cysteine-rich domain // A. J. Hum. Genet. — 1999. — Vol. 65. — P. 1252–1260.
9. Jiang X., Sidhu R., Porter F.D. A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann—Pick C1 disease from human plasma // J. Lipid. Res. — 2011. — Vol. 52. — P. 1435–1445.
10. Josephs K. Van Gerpen M., Van Gerpen J. Adult-onset Niemann—Pick disease type C presenting with psychosis // J. Neurosurg. Psychiat. — 2003. — Vol. 74. — P. 528–529.
11. Millat G., Marçais C., Tomasetto C. Lipid and cholesterol trafficking in NPC // Biochim. Biophys. Acta. — 2004. — Vol. 1685. — P. 28–37.
12. Mengel E., Hans-Hermann Klunemann H.-H., Lourenco C.M. Niemann—Pick disease type C symptomatology: an expert-based clinical description // Orph. J. Rare. Dis. — 2013. — 8. — P. 166.
13. Patterson M., Vecchio D., Prady H. Miglustat for treatment of Niemann—Pick C disease: a randomized controlled study // Lancet. Neurol. — 2007. — 6. — P. 765–772.
14. Patterson M.C., Hendriks C.J., Walterfang M., Sedel F., Vanier M.T., Wijburg F. Recommendations for the diagnosis and management of Niemann—Pick type C // Mol. Genet. Metab. — 2012. — Vol. 106. — P. 330–344.
15. Richard W.D. Welford, Marco Garzotti, Charles Marques Lourenco, Eugen Mengel, Thorsten Marquardt, Janine Reunert, Yasmina Amraoui, Stefan A. Kolb, Olivier Morand, Peter Groenen. Plasma Lysosphingomyelin Demonstrates Great Potential as a Diagnostic Biomarker for Niemann—Pick Disease Type C in a Retrospective Study // Plos One. — 2014. — 10.1371. 0114669
16. Sleat D.E., Wiseman J.A., El-Banna M., Price S.M., Verrot L. et al. Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — P. 5886–5891.
17. Vanier M.T. Niemann—Pick disease type C // Orphanet J. Rare Dis. — 2010. — Vol. 5. — P. 16.
18. Walterfang M., Fahey M., Desmond P. White and gray matter alterations in adults with Niemann—Pick disease type C: a cross-sectional study // Neurology. — 2010. — Vol. 75. — P. 49–56.

Biochemical markers of Niemann—Pick disease type C

Proshlyakova T.Y.¹, Baydakova G.V.¹, Bukina T.M.¹, Mikhailova S.V.², Ilina E.S.², Rudenskaya G.E.¹, Klyushnikov S.A.³, Malakhova V.A.¹, Zakharova E.Y.¹

¹ — FSBI Research Centre for Medical Genetics, 115478, Moscow, Moskvorechie, 1, e-mail: t.proshlyakova@mail.ru

² — FSBI Russian Children's Clinical Hospital of Ministry of Health of Russia, 117513, Moscow, Leninsky Prospect, 117

³ — FGBNU Research Center of Neurology, 105064, Moscow, street Obukha 5-1

Niemann—Pick disease type C (NPC) is an inherited autosomal recessive progressive disease of the nervous system, from the group of lysosomal storage diseases (LSD). Molecular genetic testing of *Npc1* and *Npc2* loci for a long time was the only method to confirm the NPC diagnosis. However, there is a growing body of published evidence for the possibility of the use of various selective biochemical markers for the screening of this disorder. The purpose of our study was an estimation of the information value of two biochemical markers, chitotriosidase and cholestane-3 β ,5 α , 6 β -triol (triol) in the NPC diagnostics.

Key words: Niemann—Pick disease type C, biochemical markers, triol, chitotriosidase

Разработка панели генетических маркёров фиброгенеза и оценка её информативности для русского населения г.Томска

Гончарова И.А.^{1,2}, Кучер А.Н.¹, Тарасенко Н.В.¹, Макеева О.А.^{1,2},
Слепцов А.А.¹, Брагина Е.Ю.¹, Марков А.В.¹, Пузырев В.П.¹

1 — ФГБНУ НИИ медицинской генетики, Томск, Россия

2 — ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

Разработана панель из 58 SNP генетических маркеров, включающая две мультиплексные реакции, состоящие из 27SNP («27-плекс») и 31SNP («31-плекс»). В панель вошли маркеры генов, ассоциированные: с заболеваниями сердечно-сосудистого континуума, инфарктом миокарда, нестабильностью атеросклеротической бляшки; с заболеваниями печени, прогрессированием фиброза и развитием цирроза печени; с фиброзом различных органов (печень, почки и легкие); с сахарным диабетом первого и второго типа. Генотипирование с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии с применением Sequenom MassARRAY iPLEX платформы (США) и оценка популяционно-генетических параметров полиморфных вариантов, было проведено в популяционной выборке жителей г.Томска русской национальности численностью 300 чел. Маркеры генов *OAS1* (rs111902215), *CD79A* (rs112385835), *IFNGR2* (rs41356148), *COL1A1* (rs62062995), являются мономорфными, а в генах *CD79A* (rs112543324) и *GAS6* (rs77469272) частота минорного аллеля — 0,95% и 0,92% соответственно. Все остальные маркеры являются высокополиморфными с частотой регистрации минорного аллеля от 7,9% для rs4986790 (*TLR4*) до 51,3% для rs1007856 (*ITGB5*). Распределение генотипов по большинству высокополиморфных SNP соответствует распределению Харди—Вайнберга, за исключением локусов rs17181457 (*IFNGR1*), rs9325154 (*IGFBP6*), rs12979860 (*IL28B*) (для всех случаев $p < 0,05$). Таким образом, из 58 SNP 86,2% являются высокополиморфными маркерами, информативными для русских г.Томска и пригодными для проведения ассоциативных исследований в группах лиц с патологиями, сопровождающимися фиброзом различных органов.

Ключевые слова: гены фиброгенеза, SNP, генетический полиморфизм, MALDI-TOF масс-спектрометрия

Заболевания, связанные с фиброзом различных органов, являются причиной 45% смертельных исходов в развитых странах мира [3]. Фиброз — дегенеративный процесс, который может привести к терминальной стадии болезни и потере функции различных органов. При фиброгенезе, вне зависимости от поражаемой ткани (органа), прослеживается общность путей и биологических процессов, в том числе активация TGF- β , MAPK (митоген-активированный киназо подобный протеин) и PDGF (тромбоцитарный фактор роста бета), эпителиально-мезинхимальный переход, активация металлопротеаз (MMP), механическое напряжение, окислительный стресс, воспаление [1]. Это свидетельствует о существовании универсальных фундаментальных молекулярных механизмов развития фиброза, и их выявление имеет важное значение для установления генов, продукты которых вовлечены в процессы фиброгенеза, что, в свою очередь, может послужить основой для поиска новых терапевтических мишеней.

Одним из подходов, направленных на выявление вовлеченности генов в патологический процесс, является поиск ассоциативных связей однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNP) этих генов с исследуемой патологией. К настоящему времени разработано и активно применяется большое количество высокопроизводительных технологий генотипирования SNP, в том числе

MALDI-TOF спектрометрия с помощью Sequenom MassARRAY технологии. Данный способ генотипирования имеет ряд преимуществ, среди которых — точность анализа, возможность мультиплексирования реакции, универсальные условия ПЦР для всех анализируемых SNP, небольшие объемы реагентов и высокая пропускная способность (более 100 000 генотипов в день) [2]. Программное обеспечение Genotyping Assay Design, разработанное производителями Sequenom MassARRAY технологии, автоматически генерирует возможные варианты мультиплексных сочетаний SNP, подбирает праймеры и зонды необходимые для проведения генотипирования.

После создания мультиплексной панели интересующих SNP-маркёров необходимо оценить ее информативность для той популяции (этноса), где в дальнейшем планируется проведения ассоциативных исследований. Апробация мультиплексной панели включает несколько этапов:

- генотипирование образцов ДНК не менее 100 индивидов;
- оценка частот аллелей и генотипов для каждого локуса;
- тестирование на соответствие наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди—Вайнберга (PXB);

• сравнение частот аллелей с данными, полученными для популяций сходного этнического происхождения и представленными в базах данных NCBI [4], Ensembl [5] и других.

Выполнение данного алгоритма исследования позволит выявить информативные для данной популяции маркёры и SNP, и исключить непригодные для проведения дальнейших исследований. К категории непригодных относятся SNP, для которых:

- не установлен полиморфизм;
- зарегистрировано значительное отклонение распределения генотипов от PXB;
- имеет место несоответствие частот аллелей данным, полученным для популяций сходного этнического состава в других исследованиях.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования было формирование и апробация двух панелей SNP-маркёров, локализованных в генах, продукты которых принимают участие в процессах фиброгенеза.

Для формирования мультиплексных панелей SNP на основании данных научных публикаций были выбраны SNP-маркёры, локализованные в генах, для которых показаны изменение уровня экспрессии при заболеваниях, связанных с фиброзом различных органов, а также в генах, ассоциированных с фиброзом печени; атеросклерозом и стабильностью атеросклеротической бляшки; эндотелиальной дисфункцией; с сахарным диабетом первого и второго типов, как заболеваний, характеризующихся фибротическими изменениями почек при диабетической нефропатии. Также в исследование включены как «поисковые» некоторые полиморфные варианты, локализованные в маркёрах генов иммунного ответа, поскольку одним из ключевых процессов, протекающих на начальных этапах фиброгенеза, является воспаление. Для ряда генетических вариантов последней группы в доступных базах данных не было представлено информации по частотам аллелей.

При выборе SNP по локализации в пределах нуклеотидной последовательности гена преимущество отдавалось следующим вариантам: несинонимичные замены, локализованные в экзонах и меняющие аминокислотную последовательность белка; SNP, расположенные в регуляторных областях 5'- и 3'UTR, которые потенциально могут оказывать влияние на функциональную активность гена. Кроме того, к исследованию были привлечены маркёры, хорошо охарактеризованные ранее, показавшие ассоциации с вышеперечисленными патологиями и локализованные в интронах и межгенных участках. В общей сложности были выбраны для анализа 100 маркёров.

С помощью программного обеспечения Genotyping Assay Design из отобранных на первом этапе исследования маркёров было выбрано 58 SNP и создано две мультиплексные панели 27SNP («27-плекс») и 31SNP («31-плекс»).

В мультиплексные панели вошли маркёры генов, ассоциированные:

• с заболеваниями сердечно-сосудистого континуума, инфарктом миокарда, нестабильностью атеросклеротической бляшки — *ELN* (rs8326), *LIPC* (rs1800588), *MMP1* (rs514921), *MMP9* (rs17576; rs3918242), *LDLR* (rs2738446), *TGFBI* (rs1800469), (rs11515), (rs10087305; rs3765124), *ABCA1* (rs3890182), *KIAA1462* (rs3739998), (rs2277698), *CETP* (rs708272), *KDR* (rs2071559), (rs2075555; rs1107946), *APOA2* (rs5082), *CDKN2B-AS1* (rs1333049), *TAS2R38* (rs1726866), *LIG1* (rs20579), *MTAP* (rs7023329);

• с заболеваниями печени, прогрессированием фиброза и развитием цирроза печени — *KRT19* (rs56051972), (rs17740066), *DDX5* (rs1991401), *OAS1* (rs111902215), *AQP2* (rs2878771), *IL28B* (rs12979860), *IGFBP7* (rs6841086), *LOC101927143* (rs4290029), *MMP3* (rs679620), *IGFBP7* (rs11133482), *IGFBP6* (rs9325154), *TLR4* (rs4986790), *PARP4* (rs4986819), *OAS1* (rs1131454), *MMP3* (rs626750), *TREM1* (rs1817537);

• с фиброзом различных органов (печень, почки и легкие) — (rs62062995), *ITGB5* (rs6778643), *CUX1* (rs11540899), *ITGA4* (rs1143674), *ITGB5* (rs1007856), *CCL8* (rs1133763), *GAS6* (rs77469272), (rs803064), *CD247* (rs6668182);

• с сахарным диабетом первого и второго типа — *CAMK2D* (rs3733619), *NUP155* (rs12054703), *HTR3B* (rs4938056), *ACSL1* (rs1996546), *DNMT3A* (rs7590760);

• «поисковые» маркёры генов иммунного ответа — *CD79A* (rs112385835; rs3810153; rs112543324), *IFNGR1* (rs17181457), *IFNGR2* (rs41356148), *IL28A* (rs12980602).

Включенные в панели гены оказались локализованными практически на всех хромосомах, за исключением хромосом 14, 18, 22, X и Y. Наибольшее количество маркёров (по 8 SNP) располагается на 17-й и 19-й хромосомах (табл. 1, 2). Из числа вошедших в панели маркёров 27,6% составили SNP, локализованные в экзонах и связанные с изменением аминокислотной последовательности белка; 32,7% располагались в интронах, 32,7% — в регуляторных областях (5'-UTR, 3'-UTR) и 7% — в межгенных регионах.

Мультиплексное генотипирование с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии с применением Sequenom MassARRAY iPLEX платформы (США) и оценка популяционно-генетических параметров полиморфных вариантов, включенных в сформированные панели маркёров, было проведено в популяционной выборке жителей г.Томска русской национальности численностью 300 чел.

Было показано, что в популяционной выборке русских жителей г.Томска включенные в панели SNP-маркёры, локализованные в генах *OAS1* (rs111902215), *CD79A* (rs112385835), *IFNGR2* (rs41356148), *COL1A1* (rs62062995), являются мономорфными, а в генах *CD79A* (rs112543324) и *GAS6* (rs77469272) характеризуются низким уровнем полиморфизма (частота минор-

ного аллеля — 0,95% и 0,92% соответственно). Для полиморфного варианта rs3918242 гена *MMP9* получить экспериментальные данные высокого качества не удалось. Все остальные маркёры являются высокополиморфными с частотой регистрации минорного аллеля от 7,9% для rs4986790 (*TLR4*) до 51,3% для rs1007856 (*ITGB5*). Для наибольшего (37,5%) числа локусов частота минорного аллеля находилась в пределах 40—50%. Распределение генотипов по большинству высокополиморфных SNP соответствовало распределению Харди—Вайнберга, за исключением локусов rs17181457 (*IFNGR1*), rs9325154 (*IGFBP6*), rs12979860 (*IL28B*) (для всех случаев $p < 0,05$).

Наибольшим уровнем полиморфизма характеризовались SNP генов *ADAMDEC1* (rs3765124), *APOA2* (rs5082), *CUX1* (rs803064), *ITGA4* (rs1143674), *ITGB5* (rs6778643; rs1007856), *MTAP* (rs7023329), *TAS2R38* (rs1726866), для каждого из которых ожидаемая гетерозиготность составила 50%; наименьшим — варианты генов *CD247* (rs6668182) и *TLR4* (rs4986790), где ожидаемая гетерозиготность была на уровне 15%.

Сравнение частот аллелей, включенных в панели маркёров, было проведено с данными, представленными в базах NCBI и Ensembl для популяций CEU (популяционная группа европеоидного происхожде-

Таблица 1

SNP-маркёры мультиплексной панели «27-плекс»

SNP ID	Ген	Хромосома	Локализация SNP	Белок
rs9325154	<i>IGFBP6</i>	17q25	1интрон, A/G	Инсулиноподобный фактор роста
rs3739998	<i>KIAA1462</i>	10p11.23	2 экзон, Thy1002Gly	KIAA1462
rs2277698	<i>TIMP2</i>	17q25	2 экзон, Ser101Ser	Ингибитор металлопротеаз
rs708272	<i>CETP</i>	16q21	1интрон, C/T	Переносчик эфиров холестерина
rs17181457	<i>IFNGR1</i>	6q23.3	5'UTR, C/T	Рецептор к интерферону гамма
rs2071559	<i>KDR</i>	4q11-q12	5'UTR, C/T	Рецептор киназного домена (рецептор тирозинкиназы III-типа)
rs2075555	<i>COL1A1</i>	17q21.33	11 интрон, A/C	Альфа-цепь коллагена 1-го типа
rs4938056	<i>HTR3B</i>	11q23.1	2 интрон, C/T	5-гидрокситриптомин (серотонин) рецептор 3B
rs112543324	<i>CD79A</i>	19q13.2	2 экзон, His36Arg	Иммуноглобулин A
rs1007856	<i>ITGB5</i>	3q21.2	1 интрон, C/T	Интегрин бета 5
rs1133763	<i>CCL8</i>	17q11.2	1 экзон, Gln69Lys	Хемокиновый лиганд8
rs4986790	<i>TLR4</i>	9q33.1	3 экзон, Asp299Cly	Toll-подобные рецепторы
rs20579	<i>LIG1</i>	19q13.2	5'UTR, C/T	Лигаза 1
rs77469272	<i>GAS6</i>	13q34	12 экз., Ala673Val	Growth arrest-specific 6
rs4986819	<i>PARP4</i>	13q11	18 интрон, C/G	Поли(АДФ-Рибоза) полимеразы 4
rs5082	<i>APOA2</i>	1q23.3	5'UTR, C/T	Аполипопротеин A-2
rs1333049	<i>CDKN2B-AS1</i>	9p21.3	Вблизи 3'UTR гена, G/C	CDKN2B антисмысловая RNA 1
rs3918242	<i>MMP9</i>	20q11.2	5'UTR, C/T	Металлопротеаза 9
rs1107946	<i>COL1A1</i>	17q21.33	5'UTR, A/C	Коллаген
rs803064	<i>CUX1</i>	7q22.1	14 экзон, Thr464Ala	Cut-подобный гомеобокс 1
rs7023329	<i>MTAP</i>	9p21	2 интрон, A/G	Метиладенозин фосфорилаза
rs12054703	<i>NUP155</i>	5p13.1	1 интрон, C/G	Нуклеопорин 155
rs1143674	<i>ITGA4</i>	2q31.3	16 экзон, Thr3Thr	Интегрин альфа-4
rs1131454	<i>OAS1</i>	12q24.2	3 экзон, Gly162Ser	2'-5'-олигоденилат синтетаза 1
rs3765124	<i>ADAMDEC1</i>	8p21.2	11 экзон, Ser365Asn	ADAM-подобный дицеклин 1
rs626750	<i>MMP3</i>	11q22.3	Вблизи 3'UTR гена, C/T	Металлопротеаза 3
rs1817537	<i>TREM1</i>	6p21.1	3 интрон, C/G	Триггерный рецептор миелоидных клеток

ния, включающая жителей штата Юта, Северной и Западной Европы) и PGA-EUROPEAN-PANEL (образцы ДНК лиц европеоидного происхождения, полученные из банка Coriell Cell Repository (CCR), изученных в рамках проектов НаpMap и 1000Genome. Маркёры *OAS1* (rs111902215), *CD79A* (rs112385835),

IFNGR2 (rs41356148), *COL1A1* (rs62062995), являющиеся мономорфными в популяционной выборке жителей г.Томска, характеризуются также отсутствием полиморфизма в европеоидных популяциях и его низким уровнем у представителей других этносов (частота минорного аллеля — менее 1%) (табл. 3).

Таблица 2

SNP-маркёры мультиплексной панели «31-плекс»

SNP ID	Ген	Хромосома	Локализация SNP	Белок
rs56051972	<i>KRT19</i>	17q21.2	5'UTR, C/G	Кератин 19
rs8326	<i>ELN</i>	7q11.23	3'UTR, G/C	Эластин
rs17740066	<i>STXBP5L</i>	3q13.33	15 экзон, Ile855Val	Синтаксин-связывающий белок
rs7590760	<i>DNMT3A</i>	2p23	6 интрон, C/G	Цитозин(C5)-ДНК-метилтрансфераза 3 альфа
rs1800588	<i>LIPC</i>	15q21-q23	5'UTR, C/T	Печеночная липаза
rs1991401	<i>DDX5</i>	17q21	5'UTR, A/G	Asp-Glu-Ala-Asp) бокс хеликазы 5
rs3733619	<i>CAMK2D</i>	4q26	3' UTR, A/G	Кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа
rs514921	<i>MMP1</i>	11q22.3	5'UTR, A/G	Металлопротеаза 1
rs112385835	<i>CD79A</i>	19q13.2	5'UTR, C/T	Иммуноглобулин А
rs62062995	<i>COL1A1</i>	17q21.33	39 экзон, Ter993Gly	Коллаген типа 1, альфа 1
rs17576	<i>MMP9</i>	20q11.2-q13.1	6 экзон, Gly279Arg	Металлопротеаза 9
rs1726866	<i>TAS2R38</i>	7q34	3 интрон, C/T	Вкусовой рецептор
rs111902215	<i>OAS1</i>	12q24.2	2 экзон, Leu135Val	2'-5'-олигоаденилат синтетаза1
rs6668182	<i>CD247</i>	1q24.2	6 интрон, A/G	CD247 молекула
rs2738446	<i>LDLR</i>	19p13.2	11 интрон, C/G	Малый рецептор липопротеинов низкой плотности
rs1800469	<i>TGFB1</i>	19q13.1	5'UTR, C/T	Трансформирующий фактор роста
rs3810153	<i>CD79A</i>	19q13.2	3'UTR, A/G	Иммуноглобулин А
rs6778643	<i>ITGB5</i>	3q21.2	3 интрон, C/T	Интегрин бета 5
rs2878771	<i>AQP2</i>	12q12-q13	3'UTR, C/T	Аквапорин 2
rs11515	<i>CDKN2A</i>	9p21	3'UTR, C/G	Ингибитор циклин-зависимых киназ
rs12979860	<i>IL28B</i>	19q13.13	1 интрон, C/T	Интерферон лямбда
rs6841086	<i>IGFBP7</i>	4q12	2 интрон, A/G	Инсулиноподобный фактор роста
rs41356148	<i>IFNGR2</i>	21q22.11	3' UTR, C/T	Рецептор к интерферону гамма
rs10087305	<i>ADAMDEC1</i>	8p21.2	5'URT, C/G	ADAM-подобный дицеклин 1
rs4290029	<i>LOC101927143</i>	1q42.11	ncRNA, C/G	?
rs1996546	<i>ACSL1</i>	4q35	2интрон, A/C	Ацил-Со-А синтазы длинной цепи семейства член 1
rs679620	<i>MMP3</i>	11q22.3	2 экзон, Lys45Gly	Металлопротеаза 3
rs3890182	<i>ABCA1</i>	9q31.1	3 интрон, C/T	АТФ-связывающая кассета, подсемейство А, член 1
rs11133482	<i>IGFBP7</i>	4q12	1интрон, A/G	Инсулиноподобный фактор роста
rs11540899	<i>CUX1</i>	7q22.1	12 экзон, Pro/Pro	Cut-подобный гомеобокс 1
rs12980602	<i>IFNL2</i>	19q13.13	Вблизи 5'URT гена, C/T	Интерферон, лямбда 2

Таблица 3

**Частоты минорных аллелей исследованных SNP-маркёров у жителей г.Томска
и в других популяционных группах европеоидного происхождения**

Маркёры мультиплексной панели 31-плекс				Маркёры мультиплексной панели 27-плекс			
SNP_ID	Минорный аллель	Частота (%)		SNP_ID	Минорный аллель	Частота (%)	
		Томск	Европеоиды*			Томск	Европеоиды*
rs10087305	C	13,0	10-12	rs1007856	C	51,3	40-65
rs11133482	G	41,3	42-44	rs1107946	A	16,5	13-15
rs11515	G	11,6	12-15	rs1131454	G	38,6	43-45
rs11540899	A	41,1	38-43	rs1133763	C	16,2	13-15
rs12980602	C	21,5	22-24	rs1143674	G	49,2	42-52
rs1726866	C	49,1	43-45	rs12054703	G	19,8	19-22
rs17576	G	35,4	37-39	rs1333049	C	44,2	47-49
rs17740066	A	11,0	9-10	rs1817537	C	42,4	43-48
rs1800469	T	31,2	23-31	rs20579	T	18,5	11-12
rs1800588	T	24,0	21-26	rs2071559	C	44,0	47-50
rs1991401	G	37,7	37-39	rs2075555	A	14,8	13-16
rs1996546	A	14,9	13-15	rs2277698	A	13,0	13-16
rs2738446	G	30,6	43-45	rs3739998	C	41,9	47-57
rs2878771	C	20,9	18-19	rs3765124	G	48,9	42-43
rs3733619	G	11,7	11-13	rs4938056	T	43,8	38-42
rs3810153	G	44,1	45-49	rs4986790	G	7,9	3-6
rs3890182	A	9,8	8-12	rs4986819	G	12,9	11-16
rs4290029	C	14,4	14-18	rs5082	C	48,6	39-40
rs514921	G	22,5	18-32	rs626750	T	22,8	17-20
rs56051972	G	38,4	37-38	rs7023329	G	50,2	47-52
rs6668182	A	8,2	9-12	rs708272	T	44,7	42-49
rs6778643	C	49,4	40-54	rs803064	C	46,0	44-46
rs679620	A	43,7	46-59	rs112543324	G	0,95	нет
rs6841086	A	42,8	43-48	rs77469272	C	0,92	нет
rs7590760	G	44,5	44-46	rs17181457	T	15,8	6-11
rs8326	C	11,6	9-11	rs9325154	A	41,4	11-19
rs12979860	T	83,3	21-40	rs3918242	—	—	16-21
rs112385835	T	100,0	100				
rs41356148	C	100,0	100				
rs62062995	C	100,0	100				
rs111902215	G	100,0	100				

Примечание. * — данные о частотах аллелей получены из баз данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ensembl (<http://www.ensembl.org/>), проектов HapMap-CEU, PGA-EUROPEAN-PANEL, 1000 Genome. Жирным шрифтом выделены локусы, исключенные из исследования.

Для локусов *CD79A* (rs112543324) и *GAS6* (rs77469272), показавших низкий уровень полиморфизма в настоящем исследовании, в привлеченных для сравнения базах данных результатов не представлено. Маркёры *IFNGR1* (rs17181457), *IGFBP6* (rs9325154), *IL28B* (rs12979860), показавшие отклонение от PXB в томской популяции, также значительно различались по частотам аллелей у евро-

пеоидов, данные по которым представлены в вышеуказанных базах, что может быть связано с проблемами в точности генотипирования этих маркёров. Эти маркёры и генетические варианты, для которых не зарегистрировано полиморфизма, относятся к категории неинформативных для анализа и не могут быть включены в дальнейшие ассоциативные исследования.

Для большинства изученных высокополиморфных маркёров частота минорного аллеля сопоставима с таковой у европеоидов, сведения по которым представлены в базах данных. Только для rs2738446 (*LDLR*) частота минорного аллелей маркёра у жителей г.Томска более чем на 10% отличалась от частот, характерных для европеоидных популяций (табл. 3), что может быть специфично для жителей сибирского региона.

Таким образом, из 58 SNP, вошедших в сформированные в настоящем исследовании мультиплексные панели, 86,2% являются высокополиморфными маркёрами, информативными для русских г.Томска и пригодными для проведения ассоциативных исследований

в группах лиц с патологиями, сопровождающимися фиброзом различных органов.

Список литературы

1. Friedman S.L. Evolving challenges in hepatic fibrosis // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. — 2010. — Vol. 7, №8. — P. 425–436.
2. Gabriel S., Ziaugra L., Tabbaa D. SNP Genotyping Using the Sequenom MassARRAY iPLEX Platform // Curr. Protoc. Hum. Genet. — 2009. — Vol. 60. — P. 2.12.1–2.12.18.
3. Wynn T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis // J. Pathol. — 2008. — P. 214, №2. — P. 199–210.
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
5. <http://www.ensembl.org/>

Development of the genetic markers of fibrogenesis panel and evaluating its informativity for Russian population (Tomsk)

Goncharova I.A.^{1,2}, Kucher A.N.¹, Tarasenko N.V.¹, Makeeva O.A.^{1,2}, Sleptsov A.A.¹, Bragina E.U.¹, Markov A.V.¹, Puzirev V.P.¹

¹ — Research Institute for Medical Genetics, 634050, Tomsk, Russia

² — Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 650002, Kemerovo, Russia

The panel consisted of 58 SNP genetic markers was developed. The panel includes 27SNP («27-plex») and 31SNP («31-plex»). The panel contains markers that are linked: with diseases of the cardiovascular continuum, myocardial infarction, unstable atherosclerotic plaque; liver disease, progression and development of cirrhosis; fibrosis of various organs (liver, kidneys and lungs); diabetes T1D and T2D. Genotyping was performed using MALDI-TOF mass spectrometry on MassARRAY iPLEX Sequenom platform (USA). Estimation of population genetic parameters of polymorphic variants was conducted using a population sample of residents of Tomsk Russian (n = 300). Gene markers *OAS1* (rs111902215), *CD79A* (rs112385835), *IFNGR2* (rs41356148), *COL1A1* (rs62062995) were monomorphic. The markers *CD79A* (rs112543324) и *GAS6* (rs77469272) had minor allele frequency — 0,95% and 0,92%, respectively. All others are highly polymorphic markers with minor allele frequency of 7.9% for rs4986790 (*TLR4*) to 51.3% for rs1007856 (*ITGB5*). The distribution of genotypes for most SNP corresponds to the Hardy–Weinberg equilibrium, except loci rs17181457 (*IFNGR1*), rs9325154 (*IGFBP6*), rs12979860 (*IL28B*) (in all cases $p < 0.05$). Thus, among the 58 studied SNP — 86,2% are highly polymorphic markers informative for Russian population of Tomsk and suitable for association studies with fibrosis of various organs.

Key words: fibrosis genes, SNP, genetic polymorphism, MALDI-TOF mass spectrometry

Новая нонсенс-мутация p.Trp325Ter (с.977G>A) в гене *POU3F4* в якутской семье с синдромом Gusher (DFNX2)*

Барашков Н.А.^{1,2}, Кларов Л.А.^{1,3}, Терютин Ф.М.^{1,2}, Соловьев А.В.^{1,2}, Пшенникова В.Г.^{1,2},
Конникова Э.Э.^{2,3}, Николаева К.Ю.², Романов Г.П.^{1,2}, Готовцев Н.Н.^{1,2}, Саввинова К.Е.²,
Кожевников А.А.³, Васильева Л.М.⁴, Федотова Э.Е.⁴, Пак М.В.^{2,4}, Леханова С.Н.², Лугинов Н.В.^{2,3},
Морозов И.В.^{5,6}, Бондарь А.А.⁵, Соловьева Н.А.^{1,2}, Рафаилов А.М.², Сазонов Н.Н.²,
Алексеев А.Н.⁷, Посух О.Л.^{6,8}, Джемилева Л.У.⁹, Хуснутдинова Э.К.^{9,10}, Федорова С.А.^{1,2}

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», 677010, г. Якутск, Сергеляхское ш., д. 4, тел./факс: 8-(4112) 32-19-81, e-mail: barashkov2004@mail.ru

² — Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова», 677010, г.Якутск, ул. Кулаковского, д. 46, тел.: 8-(4112) 49-68-42, e-mail: nelloann@mail.ru

³ — Государственное бюджетное учреждение Республики Саха (Якутия) «Республиканская больница №2 — Центр экстренной медицинской помощи», 677005, г.Якутск, ул. П.Алексеева, д. 83 «А», тел.: 8-(4112) 43-29-53; e-mail: eizonix@gmail.ru

⁴ — Государственное бюджетное учреждение Республики Саха (Якутия) «Республиканская больница №1 — Национальный центр медицины», 677010, г.Якутск, Сергеляхское ш., д. 4, тел.: 8-(4112) 39-53-20; e-mail: sakhasurdo@mail.ru

⁵ — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г.Новосибирск, 630090, пр-т Лаврентьева, д. 8, тел.: (383) 363-51-59, e-mail: mor@niboch.nsc.ru

⁶ — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», 633090, г.Новосибирск-90, ул. Пирогова, д. 2, тел./факс: 8-(383) 363-43-33, e-mail: posukh@bionet.nsc.ru

⁷ — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт гуманитарных исследований и проблем малочисленных народов Севера Сибирского отделения Российской академии наук, 677007, г.Якутск, ул. Петровского, д. 1, тел./факс: 8-(4112) 39-00-36, e-mail: secretar@igi.ysn.ru

⁸ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г.Новосибирск, 630090, пр-т Лаврентьева, д. 10, тел.: 8-(383) 333-28-13, факс: 8-(383) 333-12-78, e-mail posukh@bionet.nsc.ru

⁹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, 450054, г.Уфа, пр-т Октября, д. 71, тел./факс: 8-(347) 235-60-88, e-mail: dzhemilev@mail.ru

¹⁰ — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный университет», 450076, г.Уфа, ул. З.Валиди, д. 32, тел./факс: 8-(347) 272-63-70, 8-(374) 229-96-16, e-mail: ekkh

Доля случаев врожденной глухоты с X-сцепленным типом наследования составляет не более 1-2%. Впервые в якутской семье с аномалиями внутреннего уха, характерными для синдрома Gusher (DFNX2, OMIM 304400), в гемизиготном состоянии выявлена ранее не описанная замена с.977G>A в гене *POU3F4* у двух полусибсов мужского пола (пораженные индивиды), у их матери и сестры — в гетерозиготном состоянии (здоровые члены семьи). Показано, что обнаруженная транзигация с.977G>A приводит к образованию преждевременного стоп-кодона (p.Trp325Ter) в консервативном, функционально значимом гомеодомене белка POU4 (Brain 4) и сегрегирует с патологическими фенотипами в исследованной якутской семье по X-сцепленному рецессивному типу наследования. В статье также представлено детальное клинично-генетическое описание (компьютерная томография, аудиологический анализ, магнитно-резонансная томография, компьютерная стабилометрия) членов данной семьи. У двух пробандов с гемизиготной мутацией p.Trp325Ter выявлено: двухсторонняя деформация и расширение внутреннего слухового отверстия в латеральной части, увеличенные размеры полукружных каналов, флуктуирующая и/или прогрессирующая двусторонняя смешанная тугоухость, а также умеренное нарушение координации движений в виде вертикальной нестабильности в обеих фазах пробы Ромберга. У матери пробандов, гетерозиготной по мутации p.Trp325Ter, также выявлены изменения формы внутреннего слухового прохода (слева), увеличенные размеры полукружных каналов (с обеих сторон), небольшое двухстороннее снижение остроты слуха по смешанному типу и легкие поструральные нарушения. Результаты молекулярно-генетического скрининга показали, что кроме обследованной якутской семьи, мутация p.Trp325Ter не была обнаружена ни в выборке *GJB2*-негативных пациентов с потерей слуха (n = 68), ни в контрольной выборке индивидов женского пола из популяции якутов (n = 123). Таким образом, наиболее вероятно, что выявленный случай синдрома Gusher обусловлен присутствием мутации p.Trp325Ter в гене *POU3F4*, возникшей в одной якутской семье *de novo*.

Ключевые слова: аномалии развития внутреннего уха, синдром «Gusher», X-сцепленная рецессивная глухота, локус Xq21.1, ген *POU3F4*, мутация с.977G>A (p.Trp325Ter)

* Авторы выражают искреннюю признательность всем участникам исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (14-04-01741_A), госзаказа Министерства образования и науки РФ «Генетическая история народов Восточной Сибири и эндемичные формы наследственно-обусловленных нарушений слуха» (ГК№6.656.2014/К), Интеграционного проекта СО РАН №92. «Этногенез автохтонных народов Сибири и Северной Азии: компаративный, исторический, этносоциальный и геномный анализ», Гранта Президента Республики Саха (Якутия) им. А.И. Иванова для молодых ученых, специалистов и студентов за 2015 г. (медицинские науки) (РП №80 от 05.02.2015), а также Гранта НОФМУ «Научные исследования» РС(Я) — №2013020100612 на 2014 г.

Введение

Врожденная глухота у человека встречается примерно у 1 из 1000 новорожденных [9, 11]. Около половины всех этих случаев являются наследственными и передаются в ряду поколений по аутосомно-рецессивному (70—80%) или аутосомно-доминантному типу (10—20%) [12]. Более редкими являются случаи потери слуха с X-сцепленным и митохондриальным типами наследования (1—2%) [12].

Первые сообщения о X-сцепленной рецессивной потере слуха, сочетанной с аномалиями внутреннего уха, датируются концом 1960-х годов, когда группа исследователей под руководством I. Shine и J.R. Watson, 1967 [21], при хирургической операции по стапедопластике у пациента из китайской семьи с кондуктивной потерей слуха обнаружила «эффект фонтана» — бурное излитие перилимфатической жидкости из внутреннего уха [21]. При вскрытии височной кости оказалось, что во внутреннем ухе пациента было очень высокое давление, и перилимфатическая жидкость буквально «разливалась фонтаном», поэтому данная патология, впервые стала известна отохирургам как «синдром Gusher» (фонтан) [21]. В последующем подобное, явление «фонтана» было замечено W. Nance [16], при стапедопластике у европейских пациентов с кондуктивной потерей слуха [16].

Несмотря на редкость встречаемости X-сцепленной рецессивной формы глухоты, это первое в мире заболевание органа слуха, для которого методом позиционного картирования были идентифицированы мутации в гене *POU3F4* (DFNX2, OMIM 304400), сегрегирующие с фенотипом (потеря слуха) в изученных семьях [5]. В 1995 г. Y.J. de Kok и др. [5] опубликовали результаты исследований по идентификации точковых мутаций и одной протяженной делеции захватывающей ген *POU3F4*, локализованном на расстоянии 500 kВ от локуса Xq21, в пяти не связанных между собой родством семьях с предположительно X-сцепленным рецессивным типом наследования заболевания [5]. Ген *POU3F4*

кодирует транскрипционный фактор POU4 (Brain 4), который, как было показано на модельных животных (крыса), экспрессируется в головном мозге, нервной трубке и слуховом пузырьке на эмбриональной стадии развития (15,5—17,5 дней после зачатия) [5, 6]. У большинства обследованных пациентов наблюдались выраженные аномалии развития внутреннего уха (расширение внутреннего слухового прохода и аномалии улитки), которые к тому времени уже возможно было визуализировать с помощью неинвазивных, радиологических методов исследования [13]. Последующие молекулярно-генетические исследования, проведенные в различных регионах мира, подтвердили ключевую роль мутаций гена *POU3F4* в развитии синдрома Gusher [2—4, 8, 10, 14, 18, 20—23, 27, 28].

Было показано, что в Республике Саха (Якутия) основной молекулярно-генетической причиной врожденной глухоты у коренного населения (форма аутосомно-рецессивной глухоты 1А типа — DFNB1A) являются мутации в гене *GJB2* (Cx26) [1]. Тем не менее, приблизительно в 50% случаев этиология ранней детской или доречевой тугоухости в популяции якутов остается неизвестной. В связи с этим, актуальным является поиск мутаций в других генах, которые могут быть причиной потери слуха. Учитывая, что в мире около 10—20% случаев врожденной глухоты связаны с аномалиями внутреннего уха [13], мы провели компьютерную томографию пирамиды височной кости у *GJB2*-негативных пациентов (не имеющих мутаций в гене *GJB2*) и обнаружили аномалии внутреннего уха, характерные для синдрома Gusher у двух полусибсов из якутской семьи.

Материалы и методы

Клинико-генетическое исследование семьи с синдромом Gusher

Клинико-генетическое исследование было проведено у четырех членов якутской семьи: у двух пробандов (III:1 и III:2), их матери и у отца пробанда III:2. Фрагмент родословной представлен на рис. 1. Исследование включало в себя компьютерную томографию, аудиологический анализ, магнитно-резонансную томографию мостомозжечковых углов, а также компьютерную стабилометрию.

Компьютерная томография пирамиды височной кости

Оценка состояния пирамиды височной кости была проведена на 4-срезовом компьютерном томографе «Somatom Sensation 4» (Siemens, Германия) в аксиальной проекции с толщиной томографического слоя 1 мм, шаг продвижения стола 1 мм, инкремент реконструкции 1 мм (программа InnerEarSpi), напряжение 120 кВ, сила тока 70 мА. При визуализации структур пирамиды височной кости использовали 2D изображения в нативных аксиальных плоскостях.

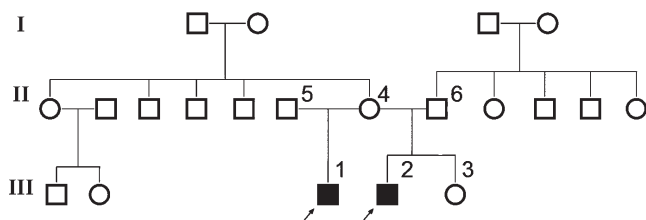


Рис. 1. Фрагмент родословной якутской семьи с X-сцепленной-рецессивной формой глухоты. Индивиды с потерей слуха выделены черным цветом, пробанды отмечены стрелками.

Аудиологическое исследование

Тональная пороговая аудиометрия проводилась с помощью аудиометра «MAICO ST 20» (Германия) по воздушному проведению на частотах 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 кГц и по костному проведению на частотах 0,25, 0,5, 1,0, 4,0 кГц с шагом 5,0 дБ. Импедансометрия с ипсилатеральной рефлексометрией проводилась с использованием импедансометра «AA222» (Interacoustics, Дания). Степень потери слуха оценивалась по классификации, рекомендованной ВОЗ, по порогам слуха в речевом диапазоне частот 0,5, 1,0, 2,0 и 4,0 кГц (РДЧ_{0,5, 1,0, 2,0, 4,0 кГц}): I степень — 20—40 дБ, II степень — 41—55 дБ, III степень — 56—70 дБ, IV степень — 71—90 дБ, глухота >90 дБ.

Магнитно-резонансная томография
мостомозжечковых углов

Состояние мостомозжечковых углов было оценено с помощью магнитно-резонансной томографии на магнитно-резонансном томографе «Magnetom Espree» (Siemens, Германия), последовательность 3d ciss, толщина среза 0,9 мм. При объемной визуализации области мостомозжечковых углов была использована аксиальная MIP-реформация слэбом 20 мм.

Компьютерная стабилотметрия

Для регистрации абсолютного и относительного перемещения проекции общего центра массы тела в положении «стоя» пациентам с выявленными аномалиями внутреннего уха и их родителям была проведена компьютерная стабилотметрия. Исследование функции равновесия проводили при помощи теста Ромберга на стабилотметре «ST-150» (Биомера, Москва) в вертикальной стойке с европейской установкой «стоп» в положениях «стоя» с открытыми и закрытыми глазами.

Молекулярно-генетический анализ

Ресеквенирование
белок-кодирующей области гена *POU3F4*

Для молекулярно-генетического исследования были взяты образцы ДНК пяти членов семьи с синдромом Gusher: у двух пробандов (III:1 и III:2), их матери (II:4), сестры (III:5) и у отца пробанда III:2 (II:6), а также образцы ДНК 68 индивидов мужского пола из банка ДНК больных ЯНЦ КМП (г.Якутск), у которых не было выявлено мутаций в гене *GJB2*. Исследование было проведено на основе полного ресеквенирования белок-кодирующей области гена *POU3F4* (экзон 1). Амплификацию фрагментов, перекрывающих белок-кодирующую область гена *POU3F4* (экзон 1), проводили с помощью ПЦР на программируемом термоблокере («Bio-Rad», USA), с использованием олигонуклеотидных праймеров (табл. 1). Разделение продуктов ПЦР проводили в горизонтальных электрофорезных камерах (15 x 15 см) в 2,5%-ном агарозном геле. Визуализацию электрофореграмм проводили с помощью системы гель-видеоокументации «Bio-Rad» (USA). Определение нуклеотидной последовательности гена *POU3F4* в исследуемых образцах проводили на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3130XL» (Applied Biosystems, USA) с помощью набора реагентов BigDye® Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Перед постановкой реакции секвенирования по Сэнгеру продукты ПЦР очищали от компонентов ПЦР на магнитных частицах AMPure XP. Невключившиеся флуоресцентные BigDye терминаторы удаляли гель-фильтрацией через колонку с сорбентом Sephadex G-50 DNA grade (GE Healthcare, Germany). Для просмотра и расшифровки секвенограмм использовали пакет компьютерных программ Chromas (Version 2:0) и Sequence analysis v5.4. Поиск мутаций проводили, сравнивая полученные секвенограммы ис-

Таблица 1

Последовательность праймеров, фланкирующих область гена *POU3F4*

№	Прямой праймер (F) 5'---3'	Обратный праймер (R) 5'---3'	Температура отжига (°C)	Размер продукта (п.н.)
Праймеры для ресеквенирования белок-кодирующего района гена <i>POU3F4</i>				
1	F-5'-TCCGGAGCTTCACCAGCCT-3'	R5'-GAGGTCCGCTTCTTGCGCT-3'	62	1065
2	F5'-TTGCCAGGATCACTCCGACGA-3'	R5'-ATAACCAAGGCGCTGAAAGGT-3'	64	1168
Последовательность праймеров для ПДРФ анализа мутации с.977G>A (p.Trp325Ter) с помощью эндонуклеазы рестрикции <i>HinfI</i> (G/ANTC)				
3	F5'-CTCCATCGAGGTGAGTGTCA-3'	F5'-GGAGCCAGGAATATGAGATCC-3'	58	670
<i>POU3F4</i> -генотипы		Ж: с.[=];[=]; М: с.[=];[0]	510 161	
		Ж: с.[977G>A];[=]	510 161 126	
		Ж: с.[977G>A];[977G>A]; М: с.[977G>A];[0]	510 126	
Примечание. Ж — индивиды женского пола; М — индивиды мужского пола.				

следуемых фрагментов ДНК с референсной последовательностью гена *POU3F4* человека из базы данных GenBank (NCBI Reference Sequence: NG_009936.2).

*Скрининг мутации с.977G>A (p.Trp325Ter)
в гене POU3F4*

Молекулярно-генетический скрининг мутации с.977G>A проводили в контрольной выборке лиц женского пола с нормальным слухом из популяции якутов ($n = 123$) методом ПДРФ, с помощью эндонуклеазы рестрикции *HinfI*, по протоколу, рекомендованному производителем (ООО «СибЭнзим», г.Новосибирск). Продукты гидролиза разделялись в 3%-ном агарозном геле. Визуализация осуществлялась в УФ-свете, с помощью системы гель-видеодокументации «Bio-Rad» (USA).

Этический контроль

Обследования, предусмотренные рамками настоящей работы, проводились при письменном информированном согласии участников или их родителей. Данная научно-исследовательская работа была одобрена локальным комитетом по биомедицинской этике при ЯНЦ КМП (г.Якутск, протокол №16 от 16 апреля 2009 г.).

Результаты

Обнаружение синдрома Gusher в якутской семье

При проведении КТ-сканирования пирамиды височной кости у двух глухих индивидов III:1 и III:2 из якутской семьи были обнаружены идентичные анома-

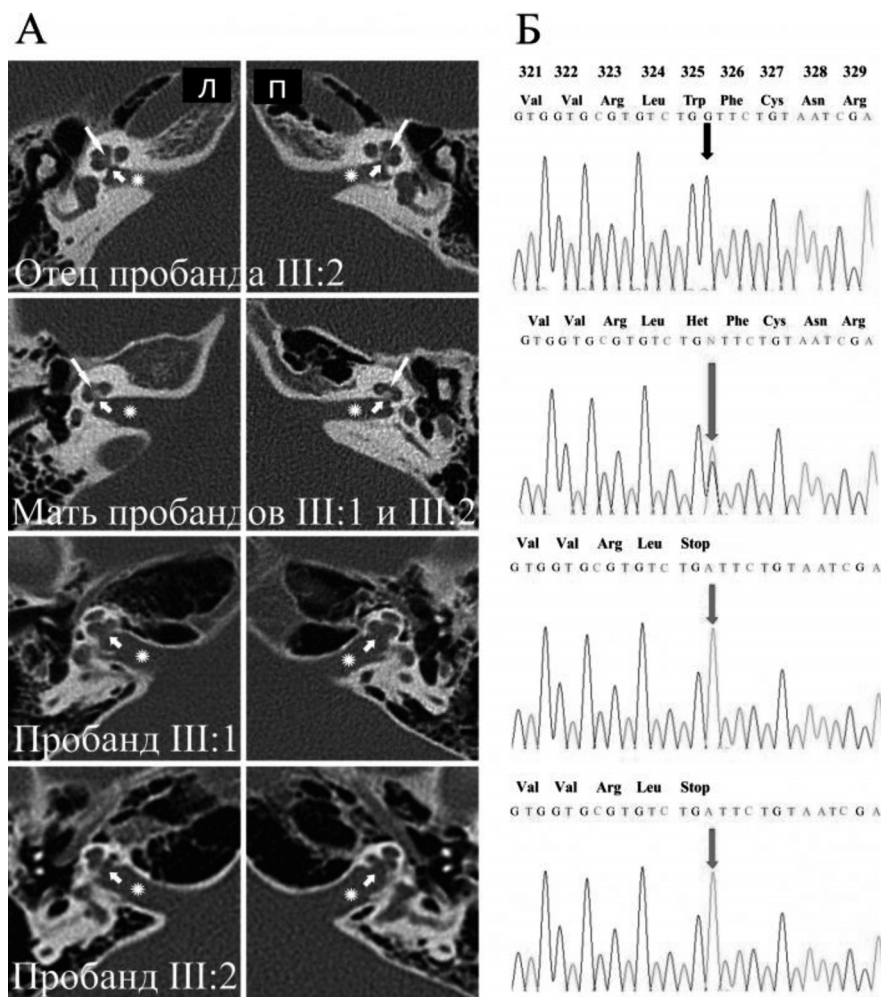


Рис. 2. Визуализация аномалий развития внутреннего уха с помощью компьютерной томографии пирамиды височной кости («штопорообразная» улитка: расширение внутреннего слухового прохода, отсутствие модиолюса) и идентификация нонсенс-мутации с.977G>A (p.Trp325Ter) в гене *POU3F4* методом прямого ресеквенирования по Сенгеру у двух полусибсов из якутской семьи в гомозиготном состоянии и у их матери — в гетерозиготном состоянии:

А — серия КТ-снимков пирамиды височной кости в аксиальной проекции (толщина томографического слоя 1 мм). Л — левая височная кость, П — правая височная кость. Короткая стрелка — улитка, длинная стрелка — модиолюс, звездочка — внутренний слуховой проход; Б — секвенс-нограмма фрагмента гена *POU3F4* (сверху вниз): гомозигота по норме — с.[=];[0]; гетерозигота — с.[977G>A];[=]; гомозигота по мутации с.[977G>A];[0].

шение внутреннего слухового отверстия и структур внутреннего уха. У матери и отца пробанда III:2 модиолус сохранен. Улитка у пробандов деформирована за счет более углубленного контура завитков и умеренного расширения, наружный и задний полукружные каналы увеличены в размерах (рис. 2А).

Поиск мутаций в гене *POU3F4* в семье с синдромом Gusher

Учитывая, что выявленные аномалии височной кости являются характерными для синдрома Gusher и четко сегрегируют с потерей слуха (X-сцепленный рецессивный тип наследования), у обоих братьев (III:1 и III:2), их матери и сестры (III:3), а также у отца пробанда III:2,

был проведен молекулярно-генетический скрининг мутаций в гене *POU3F4*, известном в ассоциации с X-сцепленной формой глухоты (Xq21.1). Ресеквенирование белок-кодирующей области гена *POU3F4* (экзон 1) выявило замену с.977G>A в гомизиготном состоянии у обоих пробандов (III:1 и III:2), в гетерозиготном состоянии — у их матери и сестры (III:5), а у отца пробанда III:2 эта мутация не была идентифицирована (рис. 2Б).

Выявленная нами замена с.977G>A в 325 кодоне приводит к образованию стоп-кодона UGA (Opal) (p.Trp325Ter), что вызывает преждевременную терминацию в функционально значимом гомеодомене транскрипционного фактора POU4 (Brain 4) (рис. 3). Выравнивание в области 321–329 аминокислотной последовательности

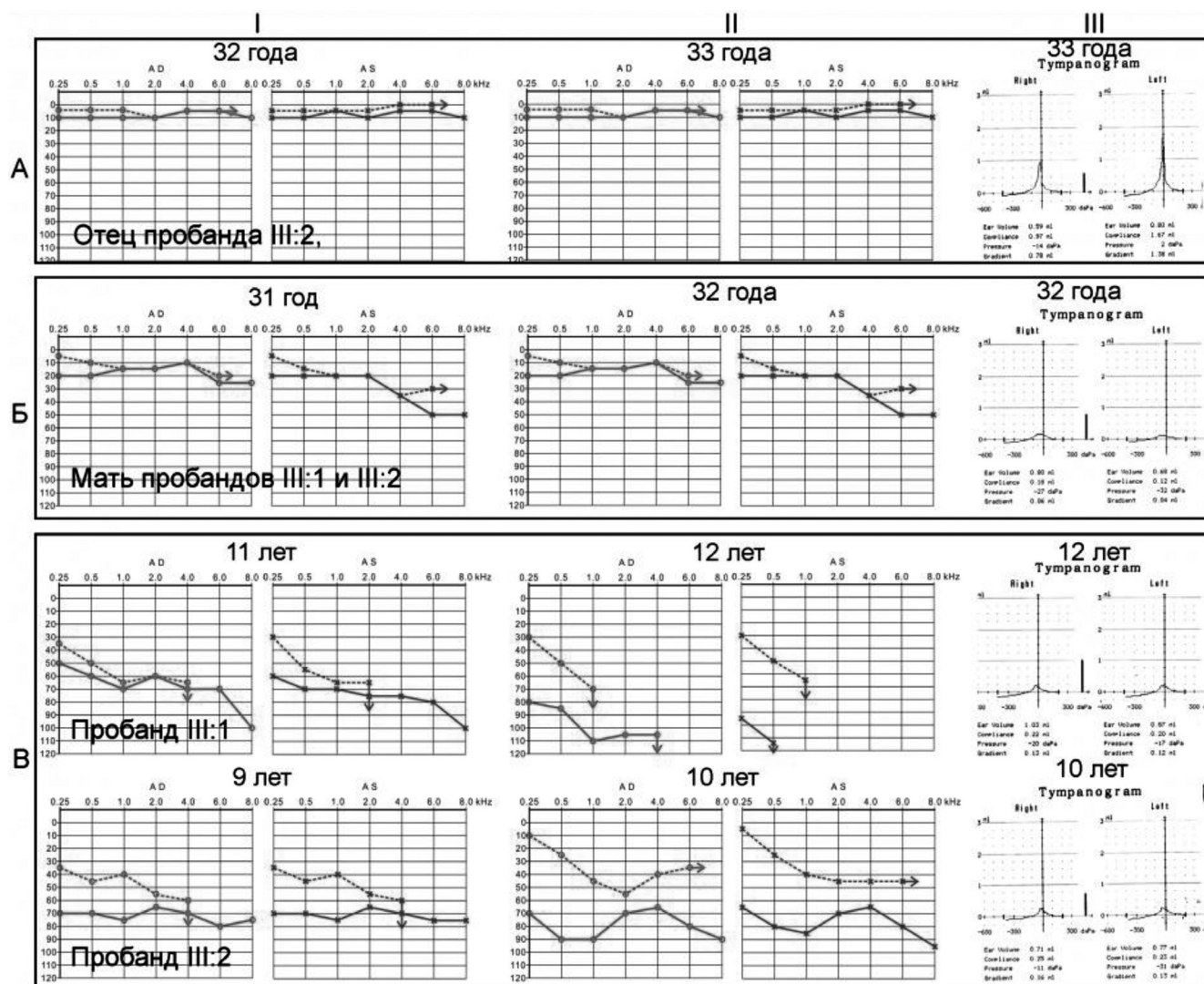


Рис. 4. Результаты аудиологического исследования состояния слуха у обследованных индивидов:

А — отец пробанда III:2 (генотип с.[=];[0]), Б — мать пробандов III:1 и III:2 (генотип с.[977G>A];[=]), В — пробанды III:1 и III:2 (генотип с.[977G>A];[0]); I — данные аудиограммы (AD — правое ухо, AS — левое ухо), II — аудиограммы через 1 год (AD — правое ухо, AS — левое ухо), III — тимпанограммы (Right — правое ухо, Left — левое ухо).

у гомологов белка POU показало эволюционную консервативность этого участка полипептидной цепи среди позвоночных организмов (от кистеперой рыбы до человека), представленных в базе данных GenBank, NCBI.

Результаты клинического исследования четырёх членов семьи с синдромом Gusher

Аудиологический анализ

Пороговая тональная аудиометрия проводилась у всех обследованных двукратно с интервалом 12 мес.

(рис. 4). У пробанда III:1 в возрасте 11 лет была выявлена двусторонняя сенсоневральная тугоухость: справа III степени (65,0 дБ), слева IV степени (72,5 дБ), а в возрасте 12 лет — двусторонняя глухота с кондуктивным компонентом. У пробанда III:2 в возрасте 9 лет была выявлена двусторонняя смешанная тугоухость III степени (70,0 дБ), а в возрасте 10 лет — двусторонняя смешанная тугоухость IV степени (справа 78,0 дБ, слева 75,0 дБ). У отца пробанда III:2 в возрасте 32 года и 33 года был зарегистрирован нормальный слух. У матери пробандов I и II в возрасте 31 год и 32 года были зарегистрированы

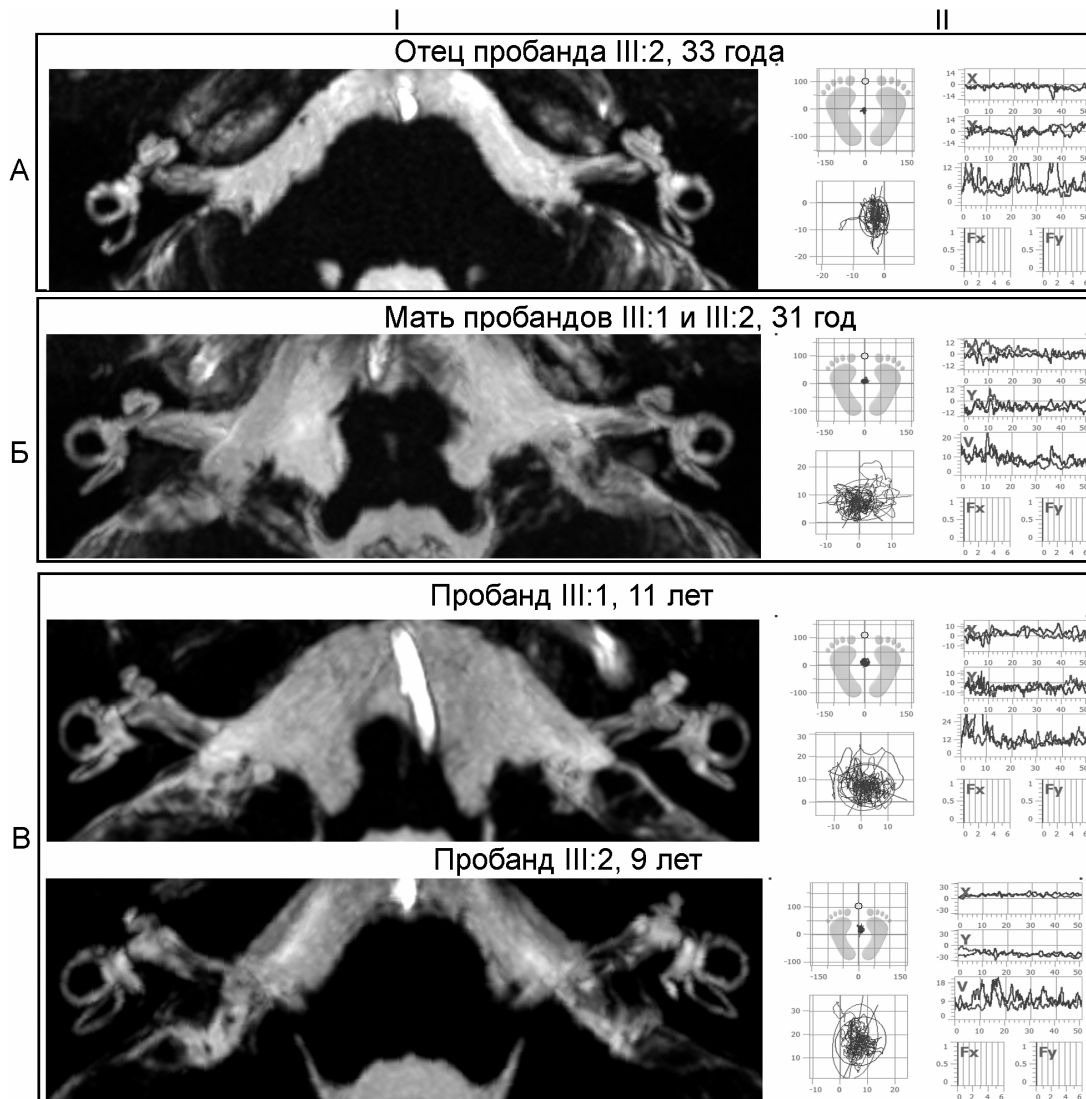


Рис. 5. Визуализация области мостомозжечковых углов с помощью магнитно-резонансной томографии головного мозга (полукружных каналов) и результаты компьютерной стабилометрии.

Справа (I) — серия снимков магнитно-резонансной томографии, MIP-реформация области мостомозжечковых углов. А — полукружные каналы у отца пробанда III:2 имеют нормальные размеры (не увеличены в диаметре); Б — полукружные каналы матери пробандов III:1 и III:2 (по сравнению с отцом пробанда III:2 увеличены в диаметре); В — полукружные каналы у пробандов III:1 и III:2 (увеличенные в диаметре). Слева (II) — результаты стабилометрии. У пробандов III:1 и III:2 выявлено умеренное снижение энергоэффективности стратегии поддержания основной стойки в положениях с открытыми и закрытыми глазами ($E_{iO} = 4,67$ Дж; $E_{iZ} = 7,48$ Дж). Проприоцептивный контроль баланса превышает зрительный ($QR = 74,8$).

нормальные пороги слуха с некоторым отклонением по смешанному типу: справа на частотах 0,25–0,5 кГц — 20,0 дБ, на 6,0–8,0 кГц — 25,0 дБ, слева на 0,25–2,0 кГц — 20,0 дБ, на 6,0–8,0 кГц — 35,0–50,0 дБ (рис. 4Б). В целом, две аудиометрические сессии с интервалом 12 мес. показали значительную отрицательную динамику остроты слуха за счет костного и воздушного проведения у пробанда III:1 и незначительную за счет костного проведения — у пробанда III:2, статичные пороги слуха у отца пробанда III:2 и матери пробандов. При этом у всех обследованных наблюдалась нормальная отоскопическая картина, однако, нормальный тип «А» тимпанограммы был зарегистрирован только у отца пробанда III:2, а у матери и двух ее сыновей регистрировался тип «As» тимпанограммы (повышение акустического импеданса).

МРТ головного мозга

Для получения более подробной информации о характере выявленной аномалии височной кости у членов наблюдаемой семьи была выполнена магнитно-резонансная томография (МРТ) области мосто-мозжечковых углов. На МРТ-снимках также подтверждается «штопорообразная» форма улитки у обоих пробандов (рис. 5, I.B). Кроме того, благодаря полученным МРТ-снимкам стало очевидным, что у обоих пробандов полукружные каналы увеличены в размерах с обеих сторон. У матери пробандов размеры полукружных каналов также имеют относительно большие размеры (рис. 5 I.B), чем у отца пробанда III:2 (рис. 5 I.A), но существенно меньше, чем у самих пробандов (рис. 5B).

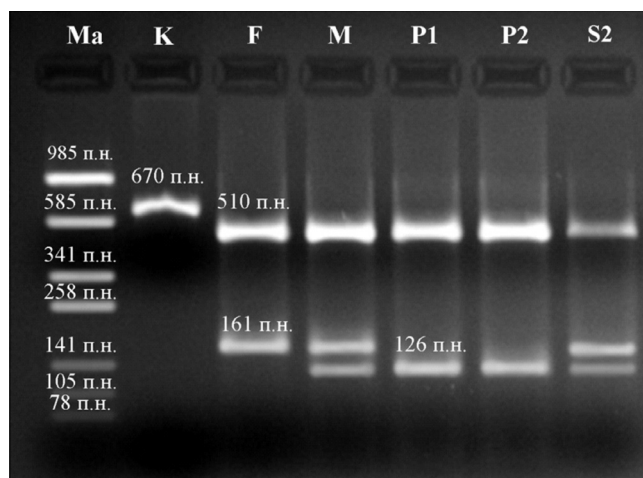


Рис. 6. Детекция мутации с.977G>A (p.Trp325Ter) методом ПДРФ (эндонуклеаза рестрикции *HinfI*, 3%-ный агарозный гель): Ma — маркер молекулярного веса PUC19/*Kzo9I*, K — контрольный образец (ПЦР-продукт, не обработанный эндонуклеазой рестрикции *HinfI*) — 670 п.н.; F — отец пробанда III:2 (генотип с.[=];[0]) — 510 и 161 п.н.; M — мать пробандов III:1 и III:2 (генотип с.[977G>A];[=]) — 510 п.н., 161 п.н. и 126 п.н.; P1 и P2 — пробанды III:1 и III:2 (генотип с.[977G>A];[0]) — 510 п.н. и 126 п.н.; S — сестра пробандов III:1 и III:2 (генотип с.[977G>A];[=]) — 510 п.н., 161 п.н. и 126 п.н.

Компьютерная стабилометрия

Учитывая аномально крупные размеры полукружных каналов у пробандов, нами дополнительно была проведена компьютерная стабилометрия у всех членов исследуемой семьи. Регистрация абсолютного и относительного перемещения проекции общего центра массы тела в положении «стоя» показала, что оба исследуемых пробанда, впрочем, также как и их мать, показали худшие результаты, чем отец пробанда III:2, который продемонстрировал наилучший результат устойчивости в положении «стоя» (рис. 5, II). У матери пробандов выявлены легкие постуральные нарушения (рис. 5, II.B). У пробандов III:1 и III:2 с аномалией развития внутреннего уха выявлены постуральные нарушения в виде умеренной вертикальной нестабильности в обеих фазах пробы Ромберга (рис. 6 II.B). У обоих пробандов была повышена скорость перемещения центра давления, увеличена площадь статокинезиограммы, снижена энергоэффективность баланса в положениях с открытыми и закрытыми глазами.

Ресеквенирование гена *POU3F4* у 68 *GJB2*-негативных пациентов с врожденной глухотой

Прямое ресеквенирование белок-кодирующей области гена *POU3F4* у 68 *GJB2*-негативных глухих пациентов мужского пола не выявило мутаций в гене *POU3F4* ни у одного из исследованных пациентов.

Скрининг на гетерозиготное носительство мутации с.977G>A (p.Trp325Ter) в гене *POU3F4* в популяции якутов

Для определения частоты гетерозиготного носительства идентифицированной мутации с.977G>A в популяции якутов нами был выполнен молекулярно-генетический скрининг этой мутации в контрольной выборке лиц женского пола с нормальным слухом ($n = 123$). Электрофореграмма детекции мутации с.977G>A в 3%-ном агарозном геле с применением ПЦР-ПДРФ анализа (гидролиз с помощью эндонуклеазы рестрикции *HinfI*) представлена на рис. 6. Мутация с.977G>A не была обнаружена в популяции якутов (0/123).

Обсуждение

Впервые в якутской семье с аномалиями внутреннего уха, характерными для синдрома Gusher (DFNX2, OMIM 304400), в гемизиготном состоянии выявлена ранее не описанная замена с.977G>A в гене *POU3F4* у двух полусибсов (пораженные индивиды), у их матери и сестры — в гетерозиготном состоянии (здоровые члены семьи). Ранее в доступной литературе о транзиции с.977G>A не сообщалось. В настоящее время в гене *POU3F4* известно более 40 изменений нуклеотидной последовательности: 20 точковых миссенс- и нонсенс-мутаций, 8 внутригенных делеций, 1 дупликация, а также более 10 комплексных перестроек и протяженных деле-

Таблица 2

Мутации в гене *POU3F4*

Миссенс/нонсенс-мутации				
№	Кодон	Аминокислота	Номер кодона	Литература
1	TGG-TAG	Trp-Stop	67	[3]
2	TCG-TAG	Ser-Stop	98	[10]
3	CGA-TGA	Arg-Stop	167	[22]
4	AAA-TAA	Lys-Stop	202	[5]
5	TTG-TAG	Leu-Stop	208	[18]
6	GGG-GAG	Gly-Glu	216	[19]
7	TCG-TTG	Ser-Leu	228	[27]
8	ACC-ATC	Thr-Ile	230	[8]
9	CCT-TCT	Pro-Ser	303	[3]
10	ATC-AAC	Ile-Asn	308	[10]
11	TCC-CCC	Ser-Pro	309	[28]
12	GCA-GTA	Ala-Val	312	[2]
13	TTG-TGG	Leu-Trp	317	[5]
14	CGT-GGT	Arg-Gly	323	[3]
15	TGG-AGG	Trp-Arg	325	[20]
	TGG-TGA	Trp-Stop	325	Данная работа
16	AAT-ACT	Asn-Thr	328	[3]
17	CGA-CCA	Arg-Pro	329	[18]
18	CGA-GGA	Arg-Gly	329	[8]
19	AGA-AGT	Arg-Ser	330	[7]
20	AAA-GAA	Lys-Glu	334	[5]

Делеции			
1	CGCCTGG~(115)GGGgCCAGCCCGGC		[18]
2	ACGTCA~(127)AGCGgCCAACCCCTC		[18]
3	CCAAA~(200)CAATTcaaaCAAAGAAGAA		[5]
4	CGCCAAA~(200)CAAttcaaaCAAAGAAGAA		[14]
5	AGGCC~(214)GACGTgGGGTTGGCGC		[5]
6	CATCGAG~(287)GTGagtgTCAAGGGCGT		[2]
7	GCATTTC~(298)CTCaAGTGTCCCAA		[5]
8	AGGAG~(388)ATCTCctcGCTGGCAGAC		[18]

	Перекрестные инсерции/дупликации		
1	Дупликация 150 kb, 170 kb перед геном (described at genomic DNA level)		[5]
	Комплексные перестройки		
1	100-300 kb 5' gene + 1 Mb proximal		[26]
2	6 делеций: 2.6 kb, 6.5 kb, 2.7 kb, 6.5 kb, 7 kb, 4.4kb		[6]

Перекрестные делеции		
1	~650 kb incl. entire gene (described at genomic DNA level)	[27]
2	1-1.5Mb located 90kb upstream of gene (described at genomic DNA level)	[23]
3	120 kb, upstream of gene (described at genomic DNA level)	[6]
4	15-17Mb incl entire gene, RSK4 & several others (described at genomic DNA level)	[23]
5	200 kb, upstream of gene (described at genomic DNA level)	[6]
6	220 kb, upstream of gene (described at genomic DNA level)	[6]
7	30 kb, upstream of gene (described at genomic DNA level)	[6]
8	3902 bp, upstream of gene (described at genomic DNA level)	[15]
9	5.6Mb incl entire gene (described at genomic DNA level)	[10]
10	8 kb, upstream of gene (described at genomic DNA level)	[6]
11	entire gene (described at genomic DNA level)	[6]

Примечание. Оригинальная номенклатура мутаций дана в соответствии с The Human Gene Mutation Database — <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

ций (The Human Gene Mutation Database — <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), ассоциированных со смешанной и/или сенсоневральной потерей слуха и аномалиями развития внутреннего уха (табл. 2). В настоящем исследовании показано, что обнаруженная транзигация с.977G>A приводит к образованию преждевременного стоп-кодона (p.Trp325Ter) в эволюционно-консервативном, функционально значимом гомеодомене белка POU4 (Brain 4) и сегрегирует с патологическими фенотипами в исследованной якутской семье по X-сцепленному рецессивному типу наследования.

Поскольку мутация с.977G>A была выявлена впервые, нами было проведено комплексное клинико-генетическое обследование четырех членов этой семьи, включая исследования, необходимые для диагностики аномалий внутреннего уха, а также дополнительные исследования, такие как магнитно-резонансная томография и компьютерная стабилометрия. Результаты комплексного клинико-генетического обследования у двух пробандов с гемизиготной мутацией p.Trp325Ter свидетельствуют о двустороннем смешанном характере потери слуха, флуктуирующем и/или прогрессирующем за счет кондуктивного компонента. При импедансометрии у обоих пробандов тимпаногамма имела тип As — повышение акустического импеданса, вероятно, за счет повышения сопротивления эндолимфы улитки.

Кроме того, у обоих братьев выявлены постуральные нарушения в виде умеренной вертикальной нестабильности в обеих фазах пробы Ромберга. Полученные данные стабилометрии свидетельствуют о нарушениях координации движений и, вероятно, объясняются аномалиями полукружных каналов, которые были зарегистрированы на КТ и МРТ-снимках.

У матери пробандов, гетерозиготной по мутации p.Trp325Ter, также выявлены изменения формы внутреннего слухового прохода: слева — цилиндрическая форма (справа конусообразная форма); худшие пороги слуха по смешанному типу (на лучше слышащее ухо — до 20,0 дБ на низких частотах и до 25,0 дБ — на высоких частотах); размеры полукружных каналов имели относительно большие размеры, чем, например, у отца пробанда III:2, у которого мутация p.Trp325Ter не было выявлена. Кроме того, у матери, также как и у пораженных сыновей, имелись легкие постуральные нарушения в обеих фазах пробы Ромберга и регистрировался тип тимпаногаммы As. Полученные клинико-генетические характеристики подтверждают результаты ранее проведенных исследований о том, что клинические признаки синдрома Gusher могут проявляться и у гетерозигот по мутации гена *POU3F4* [2, 17].

Учитывая, что для популяции якутов, в целом, характерен эффект основателя в распространении многих моногенных заболеваний, и в предположении, что синдром Gusher может присутствовать и у других якутских пациентов с врожденной глухотой, нами было проведено прямое ресеквенирование гена *POU3F4* у *GJB2*-нега-

тивных пациентов (не имеющих мутаций в гене *GJB2*) мужского пола и скрининг обнаруженной мутации p.Trp325Ter (методом ПЦР-ПДРФ) в контрольной выборке из популяции якутов. Результаты этого молекулярно-генетического анализа показали, что кроме обследованной якутской семьи, мутация p.Trp325Ter не была обнаружена ни в выборке *GJB2*-негативных пациентов с потерей слуха (n = 68), ни в контрольной выборке индивидов женского пола из популяции якутов (n = 123). Таким образом, наиболее вероятно, что выявленный случай синдрома Gusher в одной якутской семье обусловлен присутствием мутации p.Trp325Ter в гене *POU3F4*, возникшей в этой семье *de novo*.

Список литературы

1. Barashkov N.A., Dzhemileva L.U., Fedorova S.A., Teryutin F.M., Posukh O.L., Fedotova E.E., Lobov S.L., Khusnutdinova E.K. Autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A) in Yakut population isolate in Eastern Siberia: extensive accumulation of the splice site mutation IVS1+1G>A in GJB2 gene as a result of founder effect // J. Hum. Genet. — 2011. — Sep. — Vol. 56(9). — P. 631–639. doi: 10.1038/jhg.2011.72. Epub 2011 Jul 21.
2. Bitner-Glindzicz M., Turnpenny P., Hoglund P., Kaariainen H., Sankila E.M., van der Maarel S.M., de Kok Y.J., Ropers H.H., Cremers F.P., Pembrey M. et al. Further mutations in Brain 4 (*POU3F4*) clarify the phenotype in the X-linked deafness, DFN3 // Hum. Mol. Genet. — 1995. — Aug. — Vol. 4(8). — P. 1467–1469.
3. Cremers F.P., Cremers C.W., Ropers H.H. The ins and outs of X-linked deafness type 3 // Adv. Otorhinolaryngol. — 2000. — Vol. 56. — P. 184–195.
4. Choi J.W., Min B., Kim A., Koo J.W., Kim C.S., Park W.Y., Chung J., Kim V., Ryu Y.J., Kim S.H., Chang S.O., Oh S.H., Choi B.Y. De Novo Large Genomic Deletions Involving *POU3F4* in Incomplete Partition Type III Inner Ear Anomaly in East Asian Populations and Implications for Genetic Counseling // Otol. Neurotol. — 2015. — Jan. — Vol. 36(1). — P. 184–190. doi: 10.1097/MAO.0000000000000343.
5. de Kok Y.J., van der Maarel S.M., Bitner-Glindzicz M., Huber I., Monaco A.P., Malcolm S., Pembrey M.E., Ropers H.H., Cremers F.P. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene *POU3F4* // Science. — 1995. — Feb. 3. — Vol. 267(5198). — P. 685–688.
6. de Kok Y.J., Vossenaar E.R., Cremers C.W., Dahl N., Laporte J., Hu L.J., Lacombe D., Fischel-Ghodsian N., Friedman R.A., Parnes L.S., Thorpe P., Bitner-Glindzicz M., Pander H.J., Heilbronner H., Graveline J., den Dunnen J.T., Brunner H.G., Ropers H.H., Cremers F.P. Identification of a hot spot for microdeletions in patients with X-linked deafness type 3 (DFN3) 900 kb proximal to the DFN3 gene *POU3F4* // Hum. Mol. Genet. — 1996. — Sep. — Vol. 5(9). — P. 1229–1235.
7. de Kok Y.J., Cremers C.W., Ropers H.H., Cremers F.P. The molecular basis of X-linked deafness type 3 (DFN3) in two sporadic cases: identification of a somatic mosaicism for a *POU3F4* missense mutation // Hum. Mutat. — 1997. — Vol. 10(3). — P. 207–211.
8. Friedman R.A., Bykhovskaya Y., Tu G., Talbot J.M., Wilson D.F., Parnes L.S., Fischel-Ghodsian N. Molecular analysis of the *POU3F4* gene in patients with clinical and radiographic evidence of X-linked mixed deafness with perilymphatic gusher // Ann Otol Rhinol Laryngol. 1997 Apr. — Vol. 106(4). — P. 320–325.
9. Marazita M.L., Ploughman L.M., Rawlings B., Remington E., Arnos K.S., Nance W.E. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population // Am. J. Med. Genet. — 1993. — Jun. 15. — Vol. 46(5). — P. 486–491.

10. Marlin S., Moizard M.P., David A., Chaissang N., Raynaud M., Jonard L., Feldmann D., Loundon N., Denoyelle F., Toutain A. Phenotype and genotype in females with POU3F4 mutations // *Clin. Genet.* — 2009. — Dec. — Vol. 76(6). — P. 558–563. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01215.x
11. Mehl A.L., Thomson V. The Colorado newborn hearing screening project, 1992–1999: on the threshold of effective population-based universal newborn hearing screening // *Pediatrics.* — 2002. — Jan. — Vol. 109(1). — E7.
12. Morton C.C., Nance W.E. Newborn hearing screening — silent revolution // *N. Engl. J. Med.* — 2006. — May 18. — Vol. 354(20). — P. 2151–2164.
13. Jackler R.K., Luxford W.M., House W.F. Congenital malformations of the inner ear: a classification based on embryogenesis // *Laryngoscope.* — 1987. — Mar. — Vol. 97(3 Pt 2 Suppl. 40). — P. 2–14.
14. Hagiwara H., Tamagawa Y., Kitamura K., Kadera K. A new mutation in the POU3F4 gene in a Japanese family with X-linked mixed deafness (DFN3) // *Laryngoscope.* — 1998. — Oct. — Vol. 108(10). — P. 1544–1547.
15. Naranjo S., Voeselek K., de la Calle-Mustienes E., Robert-Moreno A., Kokotas H., Grigoriadou M., Economides J., Van Camp G., Hilgert N., Moreno F., Alsina B., Petersen M.B., Kremer H., Gomez-Skarmeta J.L. Multiple enhancers located in a 1-Mb region upstream of POU3F4 promote expression during inner ear development and may be required for hearing // *Hum. Genet.* — 2010. — Oct. — Vol. 128(4). — P. 411–419. doi: 10.1007/s00439-010-0864-x. Epub. 2010 Jul. 29.
16. Nance W.E., Settleff R., McLeod A., Sweeney A., Cooper C., McConnell F. X-linked mixed deafness with congenital fixation of the stapedial footplate and perilymphatic gusher // *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* — 1971. — Mar. — Vol. 07(4). — P. 64–69.
17. Lee H.K., Lee S.H., Lee K.Y., Lim E.J., Choi S.Y., Park R.K., Kim U.K. Novel POU3F4 mutations and clinical features of DFN3 patients with cochlear implants // *Clin. Genet.* — 2009. — Jun. — Vol. 75(6). — P. 572–575. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01181.x. Epub 2009 May 5.
18. Lee H.K., Song M.H., Kang M., Lee J.T., Kong K.A., Choi S.J., Lee K.Y., Venselaar H., Vriend G., Lee W.S., Park H.J., Kwon T.K., Bok J., Kim U.K. Clinical and molecular characterizations of novel POU3F4 mutations reveal that DFN3 is due to null function of POU3F4 protein // *Physiol. Genomics.* — 2009. — Nov. 6. — Vol. 39(3). — P. 195–201. doi: 10.1152/physiolgenomics.00100.2009. Epub. 2009. Aug. 11.
19. Li J., Cheng J., Lu Y., Lu Y., Chen A., Sun Y., Kang D., Zhang X., Dai P., Han D., Yuan H. Identification of a novel mutation in POU3F4 for prenatal diagnosis in a Chinese family with X-linked nonsyndromic hearing loss // *J. Genet. Genomics.* — 2010. — Dec. — Vol. 37(12). — P. 787–793. doi: 10.1016/S1673-8527(09)60096-5.
20. Schild C., Prera E., Lublinghoff N., Arndt S., Aschen-dorff A., Birkenhager R. Novel mutation in the homeobox domain of transcription factor POU3F4 associated with profound sensorineural hearing loss // *Otol. Neurotol.* — 2011. — Jun. — Vol. 32(4). — P. 690–694. doi: 10.1097/MAO.0b013e318210b749.
21. Shine I., Watson J.R. A new syndrome of sex-linked congenital conductive deafness. Presentation 132. Scientific Program // *The American Society of Human Genetics.* — Canada, 1967.
22. Stankovic K.M., Hennessey A.M., Herrmann B., Mankariou L.A. Cochlear implantation in children with congenital X-linked deafness due to novel mutations in POU3F4 gene // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* — 2010. — Dec. — Vol. 119(12). — P. 815–822.
23. Song M.H., Lee H.K., Choi J.Y., Kim S., Bok J., Kim U.K. Clinical evaluation of DFN3 patients with deletions in the POU3F4 locus and detection of carrier female using MLPA // *Clin. Genet.* 2010. — Dec. — Vol. 78(6). — P. 524–532. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01426.x.
24. Talbot J.M., Wilson D.F. Computed tomographic diagnosis of X-linked congenital mixed deafness, fixation of the stapedial footplate, and perilymphatic gusher // *Am. J. Otol.* — 1994. — Mar. — Vol. 15(2). — P. 177–182.
25. Olson N.R., Lehman R.H. Cerebricprinal fluid otorrhea and the congenitally fixed stapes // *The Laryngoscope.* — 1967. — P. 352–360.
26. Oh N., Kupka S., Mirghomizadeh F., Arold R., Zimmermann R., Blin N., Zenner H.P., Pfister M. [Clinical and molecular genetic analysis of monozygotic twins displaying stapes gusher syndrome (DFN3)] // *HNO.* — 2003. — Aug. — Vol. 51(8). — P. 629–633. Epub. 2003 Apr. 11.
27. Vore A.P., Chang E.H., Hoppe J.E., Butler M.G., Forrester S., Schneider M.C., Smith L.L., Burke D.W., Campbell C.A., Smith R.J. Deletion of and novel missense mutation in POU3F4 in 2 families segregating X-linked nonsyndromic deafness // *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* — 2005. — Dec. — Vol. 131(12). — P. 1057–1063.
28. Wang Q.J., Li Q.Z., Rao S.Q., Zhao Y.L., Yuan H., Yang W.Y., Han D.Y., Shen Y. A novel mutation of POU3F4 causes congenital profound sensorineural hearing loss in a large Chinese family // *Laryngoscope.* — 2006. — Jun. — Vol. 116(6). — P. 944–950.

Novel mutation p.Trp325Ter (c.977G>A) in the *POU3F4* gene in Yakut family (Eastern Siberia) with perilymphatic Gusher-deafness syndrome (DFNX2)

Barashkov N.A.^{1,2}, Klarov L.A.^{1,3}, Teryutin F.M.^{1,2}, Solovyev A.V.^{1,2}, Pshennikova V.G.^{1,2}, Konnikova E.E.^{2,3}, Nikolaeva K.Yu.², Romanov G.P.^{1,2}, Gotovtsev N.N.^{1,2}, Savvinova K.E.², Kozhevnikov A.A.³, Vasilieva L.M.⁴, Fedotova E.E.⁴, Pak M.V.^{2,4}, Lekhanova S.N.², Luginov N.V.³, Morozov I.V.^{5,6}, Bondar A.A.⁵, Solovyeva N.A.^{1,2}, Rafailov A.M.², Sazonov N.N.², Alexeev A.N.⁷, Posukh O.L.^{6,8}, Dzhemileva L.U.⁹, Khusnutdinova E.K.^{9,10}, Fedorova S.A.^{1,2}

¹ — Yakut Scientific Center of Complex Medical Problems, 4, Sergelyakhskoe shosse, Yakutsk, Sakha Republic, 677010, Russian Federation, phone/fax: +7 (4112) 32-19-81; e-mail: barashkov2004@mail.ru

² — M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, 46, ul. Kulakovskogo, Yakutsk, Russian Federation, Sakha Republic, 677010, phone/fax: +7 (4112) 49-68-42; e-mail: nelloann@mail.ru

³ — Republican Hospital # 2 — Center of Emergency Medicine, Ministry of Public Health of the Sakha Republic, 83 «А», ul. P.Alekseeva, Yakutsk, Sakha Republic, 677005, Russian Federation, phone/fax: +7 (4112) 43-29-53; e-mail: eizonix@gmail.ru

⁴ — Republic hospital №1 — National Center of Medicine, Sergelyakhskoe shosse 4, Yakutsk, Sakha Republic, 677010, Russian Federation, phone/fax: +7 (4112) 32-19-81

⁵ — Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 8, prosp. Lavrentieva, Novosibirsk, 630090, Russian Federation, phone/fax: +7 (383) 36-35-169; e-mail: mor@niboch.nsc.ru

⁶ — Novosibirsk National Research State University, 2, ul. Pirogova, Novosibirsk-90, 633090, Russian Federation, phone/fax: +7 (383) 363-43-33; e-mail: posukh@bionet.nsc.ru

⁷ — Institute of Humanitarian Research and Indigenous Peoples of the North, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 1, ul. Petrovskogo, Yakutsk, Sakha Republic, 677007, Russian Federation, phone/fax: +7 (4112) 39-00-36; e-mail: sekretar@igi.ysn.ru

⁸ — Federal Research Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 8, prosp. Lavrentieva, Novosibirsk, 630090, Russian Federation, phone/fax: +7-(383) 333-12-78; e-mail: posukh@bionet.nsc.ru

⁹ — Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Centre, Russian Academy of Sciences, 71, prosp. Octyabrya, Ufa, Bashkortostan Republic, 450054, Russian Federation, phone/fax: +7 (347) 235- 60-88; e-mail: dzhemilev@mail.ru

¹⁰ — Bashkir State University, 32, ul. Z.Validi, Ufa, Bashkortostan Republic, 450076, Russian Federation, phone/fax: +7 (347) 272-63-70, +7 (374) 229-96-16; e-mail: ekkh@anrb.ru

The proportion of genetic deafness with X-linked mode of inheritance (DFNX) is not more than 1-2%. For the first time, we revealed novel transition c.977G>A in the *POU3F4* gene in hemizygous state in two deaf half-brothers from Yakut family with identical abnormalities of inner ear specific for the perilymphatic Gusher-deafness syndrome (DFNX2, MIM304400), and in heterozygous state in their healthy mother and sister. Transition c.977G>A leads to stop codon (p.Trp325Ter) in the POU-homeodomain of human transcription factor (Brain 4) and segregates with hearing loss in studied Yakut family according to recessive X-linked pattern of inheritance. Computed tomography examination of both half-brothers demonstrated an abnormal dilatation of the internal acoustic canal (IAC) as well as an abnormally wide communication between the IAC and the inner ear compartment. Segregation of inner ear malformations and novel mutation c.977G>A (p.Trp325Ter) in the *POU3F4* gene with deafness in studied Yakut family confirmed association of the *POU3F4* gene with clinical phenotype of the Gusher syndrome. Molecular genetic screening showed that mutation p.Trp325Ter was not detected in other *GJB2*-negative patients with hearing loss (n = 68) nor in the control sample of females from the Yakut population (n = 123). Most likely that the Gusher syndrome in studied Yakut family was caused by novel *de novo* mutation p.Trp325Ter in the *POU3F4* gene.

Key words: inner ear abnormalities, Gusher-deafness syndrome, X-linked recessive deafness, Xq 21.1, *POU3F4* gene, mutation c.977G>A (p.Trp325Ter)

Генетический скрининг наследственных гемоглобинопатий у новорождённых с задержкой внутриутробного развития

Гараева С.З.

Азербайджанский медицинский университет, кафедра детских болезней II лечебно-профилактического факультета, Азербайджан, Баку, ул.Бакиханова, 23, AZ1022; doktor_sabina@mail.ru

Изучена взаимосвязь между задержкой внутриутробного развития (ЗВУР) ребёнка с наследственными гемоглобинопатиями. У детей с задержкой внутриутробного развития установлены гетерозиготное носительство альфа-талассемии, бета-талассемии и гена серповидноклеточности, а также гомозиготное и компаундное состояние генов бета-талассемии и гена серповидноклеточности. У детей с симметричным вариантом ЗВУР отмечалась более высокая частота встречаемости гемоглобинопатий в сравнении с асимметричным вариантом. Определение фетального гемоглобина HbF и гемоглобиновых фракций HbA₁, HbA₂ в сыворотке крови детей с ЗВУР при рождении могут иметь диагностическое значение для выявления наследственных гемоглобинопатий.

Ключевые слова: задержка внутриутробного развития, талассемия, серповидноклеточность, наследственные гемоглобинопатии

Введение

На сегодняшний день накоплено большое количество данных о роли генетических факторов в онтогенезе, их значении в этиологии наследственных и многих мультифакторных заболеваний. Причинами поломок и искажения программы индивидуального развития могут быть мутации, когда вероятность заболеваний близка к 100% (наследственные болезни), или генетический полиморфизм, когда вероятность развития болезни зависит от сочетания функционально неполноценных генов — предрасположенности и состояния неблагоприятных факторов внешней среды. Генетический полиморфизм определяют как наличие двух альтернативных вариантов гена и более, встречающихся в популяции с частотой не менее 1–5% [1]. О медицинской и социальной значимости профилактики возникновения наследственных и врождённых пороков развития свидетельствуют факты, свидетельствующие об уровне детской инвалидности, в частности, 0,5% детей имеют при рождении патологические состояния, определяющие тяжёлую инвалидизацию [4, 5, 6, 9].

Задержка внутриутробного развития плода (ЗВУР) — мультифакторное состояние, частота возникновения и тяжесть проявления которого обусловлены влиянием множества антенатальных факторов риска, имеющих различную степень значимости. ЗВУР обобщённо отражает неблагоприятное пренатального периода и указывает на необходимость проведения дифференциальной диагностики в отношении наследственных болезней [3, 6]. Нарушение внутриутробного и постнатального роста могут быть как обособленными состояниями, так и составляющими в структуре одного из синдромов наследственных болезней [11].

У новорождённых с ЗВУР в 1,73 раза чаще встречались aberrации хромосомного типа, среди них парные фрагменты в 1,60, кольцевые хромосомы в 2,0 раза по сравнению с группой здоровых новорождённых [4]. Подобная генетическая нестабильность соматических клеток предполагает глубокое влияние на генную экспрессию, что приводит к генетическим и эпигенетическим изменениям, а в дальнейшем к дегенерации и атрофии клеток, тканей. По данным исследований, проведённых в последние десятилетия, наследственные болезни обнаруживаются у 1,5% новорождённых. Проблема ранней диагностики наследственных и врождённых пороков развития, особенно профилактики её возникновения, остаётся крайне актуальной [7, 8].

Каждый практически здоровый родитель может оказаться гетерозиготным носителем 4–5 наследственных заболеваний. При наличии патологического рецессивного гена в роду у супружеской пары с кровным родством риск рождения больного — гомозиготного ребёнка возрастает в 25–30 раз [10, 12].

Проблема наследственных заболеваний крови, которая до настоящего времени не потеряла своей актуальности, особенно для населения побережья Средиземного моря и стран Ближнего и Среднего Востока, Африки, Индии и Юго-Восточной Азии, регионов эндемичных по наследственным аномалиям эритронов. Особенно актуальна данная проблема для Азербайджана, где частота встречаемости гемоглобинопатии составляет 7–8%. Высокая частота распространения гетерозиготного носительства гена β -талассемии в Республике, способствует рождению большого количества больных детей с тяжёлой гомозиготной формой β -талассемии, требующей применения гемотрансфузий на протяжении всей жизни. По предварительным подсчётам, каждый 12-й

житель Азербайджана является гетерозиготным носителем -талассемии [2]. Если учесть, что среди населения Азербайджана наблюдаются довольно высокие частоты встречаемости носительства наследственных гемоглобинопатий, альфа-талассемии, бета-талассемии (в среднем до 8%), гена серповидноклеточности (0,3—0,5%), дефицита фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (до 23%) и т.д. нередко случаи гомозиготности или же компаундного состояния этих патологических генов [7, 8, 12].

Внутриутробная задержка развития является одним из основных последствий беременности женщин, носителей наследственных гемоглобинопатий, связанным с возможностью сосудистого застоя в маточно-плацентарном кровотоке [10].

Цель исследования: изучение взаимосвязи задержки внутриутробного развития ребёнка с носительством наследственных гемоглобинопатий у матерей.

Материалы и методы

Были исследованы 103 доношенных новорождённых детей с задержкой внутриутробного развития (основная группа), среди них 50 детей — с симметричным вариантом и 53 ребёнка — с асимметричным вариантом. Контрольную группу составили 50 доношенных новорождённых детей с нормальными антропометрическими показателями при рождении.

Материалом для исследований была кровь новорождённых и их матерей, где определялись концентрации фетального гемоглобина HbF и гемоглобиновых фракций HbA₁, HbA₂ в крови доношенных новорождённых детей при рождении. Забор крови производили в специальные контейнеры, содержащие антикоагулянты ЭДТА или же гепарин. Для всех новорождённых с ЗВУР и их матерей проводили диагностику наследственных гемоглобинопатий, включающие альфа-талассемию, бета-талассемию, структурно-аномальные гемоглобины типа HbS, HbD, HbC, HbE. В случае выявления компаундного и гомозиготного состояния ге-

моглобинопатий мы проводили обследование крови отцов.

Для диагностики наследственных гемоглобинопатий использовали один из разновидностей электрофореза — метод аналитического изоэлектрофокусирования (ИЭФ) гемоглобинов на полиакриламидно-амфотинных гелях (ПААГ). Для каждого новорождённого была проведена ИЭФ гемоглобинов на ПААГ с последующим количественным измерением гемоглобиновых фракций A₁, A₂ и фетального гемоглобина. Количественное определение гемоглобиновой фракции A₂ проводили по методу Morengo-Rowe, фетального гемоглобина по методу Betre. Идентификацию аномального гемоглобина S проводили с использованием теста на серповидность эритроцитов. Были рассчитаны фенотипические, генные частоты гемоглобинопатий.

Статистическая обработка данных проводилась методом вариационной статистики при помощи программного обеспечения MS Excel-2010. Различия считались статистически значимыми при значении уровня различий сравниваемых величин $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Для установления связи между задержкой внутриутробного развития и гемоглобиновыми фракциями были проанализированы результаты обследования пуповинной крови новорождённых основной и контрольной групп (табл. 1).

В контрольной группе уровни гемоглобиновых фракций A₁, A₂ и фетального (зародышевого) гемоглобина HbF составили: $35,3 \pm 0,8\%$, $0,038 \pm 0,001\%$ и $64,8 \pm 0,8\%$ соответственно. Уровень фетального гемоглобина у детей с ЗВУР статистически достоверно был ниже, чем в контрольной группе $p_1 < 0,001$ ($40,7 \pm 0,4\%$ и $64,8 \pm 0,8\%$ соответственно). Наиболее значимое различие установлено при симметричном варианте ЗВУР — $39,0 \pm 0,6\%$, по сравнению с асимметричным вариантом ЗВУР — $42,2 \pm 0,6\%$ ($p_2 < 0,001$).

У новорождённых в норме уровень фетального гемоглобина варьирует от 50% до 80% и в течение шести ме-

Таблица 1

Анализ пуповинной крови новорождённых

Биохимические показатели	Основная группа (n = 103)	Варианты задержки внутриутробного развития		Контрольная группа (n = 50)
		Асимметричный (n = 53)	Симметричный (n = 50)	
HbF	$40,7 \pm 0,4$ (32,8—48) ***	$42,2 \pm 0,6$ (32,8—48) ***	$39,0 \pm 0,6$ (32,8—48) ***###	$64,8 \pm 0,8$ (53,6—77)
HbA ₁	$59,3 \pm 0,4$ (51,8—67,2) ***	$57,7 \pm 0,6$ (51,8—67,2) ***	$61,0 \pm 0,6$ (52—67,2) ***###	$35,3 \pm 0,8$ (23—47,8)
HbA ₂	$0,107 \pm 0,010$ (0,02—0,4) ***	$0,102 \pm 0,013$ (0,02—0,4) ***	$0,111 \pm 0,015$ (0,02—0,4) ***	$0,038 \pm 0,001$ (0,02—0,06)
Примечание. Статистическая значимая разница с показателями: 1 — контрольной группы: * — $p_1 < 0,05$; ** — $p_1 < 0,01$; *** — $p_1 < 0,001$; 2 — группы асимметричной ЗВУР: # — $p_2 < 0,05$; ## — $p_2 < 0,01$; ### — $p_2 < 0,001$				

сцев снижается и составляет до 2,5% от общего гемоглобина. Характерное свойство фетального гемоглобина заключается в том, что он имеет большое сродство с кислородом и тем самым обеспечивает нормальный обмен кислорода между матерью и плодом. Низкое содержание фетального гемоглобина приводит к кислородному голоданию у плода и развитию хронической внутриутробной гипоксии.

По-видимому, низкий уровень фетального гемоглобина является одним из основных факторов, приводящих к задержке физического развития у плода. Нельзя исключить также наличия одного или двух и более патологических генов гемоглобинопатий у новорождённого с ЗВУР. Каждый патологический ген гемоглобинопатий в отдельности влияет на физическое состояние новорождённого и нередко случаи их сочетанных вариантов у ребёнка. У населения нашей страны часто встречаются сочетания генов альфа- и бета-талассемий, а также сочетания альфа- и бета-талассемии у каждого в отдельности с одним из четырёх типов стабильных аномальных гемоглобинов типа HbS, HbD, HbE и HbC.

Уровни HbA₁ в контрольной группе ($35,3 \pm 0,8\%$) статистически достоверно отличались от группы новорождённых с ЗВУР ($59,3 \pm 0,4\%$; асимметричный — $57,7 \pm 0,6\%$ и симметричный — $61,0 \pm 0,6\%$).

Количество минорной гемоглобиновой фракции A₂ в контрольной группе составило $0,038 \pm 0,001\%$, что значительно ниже, чем в группе детей с ЗВУР — $0,107 \pm 0,010\%$ (асимметричный — $0,102 \pm 0,013\%$ и симметричный — $0,111 \pm 0,015\%$).

Статистически достоверное снижение фетального гемоглобина и повышение гемоглобиновых фракций A₁ и A₂ в группе детей с ЗВУР наводит на мысль о наличии у них патологических генов гемоглобинопатий. Для верификации полученных нами данных мы проводили мониторинговое наблюдение за детьми в течение первых 6 мес. жизни.

В первом случае при повторном обследовании детей с ЗВУР после шести месяцев развития у 13 из них (12,62%) выявили наличие гетерозиготного носительства гемоглобинопатий: 3 случая (2,91%) альфа-талассемии, 8 случаев (7,77%) бета-талассемии и 2 случая (1,94%) серповидноклеточности. В двух случаях (1,94%) выявлено гомозиготное состояние гена бета-талассемии и в одном случае (0,97%) идентифицировано двойное гетерозиготное состояние гена бета-талассемии с геном серповидноклеточности. Всего у 16 новорождённых идентифицированы различные формы гемоглобинопатий.

В случае с альфа-талассемией на изоэлектрофореграмме анодные HbA₁ были чётко видны минорные фракции гемоглобина Varts и HbH, характерные для данной патологии. Все дети были гетерозиготными носителями гена альфа-талассемии.

В случае с бета-талассемией на изоэлектрофореграмме наблюдали увеличение минорной гемоглобиновой

фракции A₂ более чем на 3,5%, при варьировании от 4,06% до 6,23% (в среднем 5,18%). Уровень фетального гемоглобина только у восьми детей (7,77%) превышал норму и варьировал в пределах 2,71–4,22% при норме до 2,5%.

В двух случаях у детей с ЗВУР после шести месяцев были установлены высокие уровни фетального гемоглобина: 44,83% и 86,38%, что соответствовало гомозиготной бета-талассемии. При ИЭФ гемоглобинов у этих детей был получен различный гемоглобиновый спектр. В первом случае (HbF 44,83%) идентифицировано восемь гемоглобиновых фракций: HbA₂, metHbA, промежуточный metHbA (в двух фракциях), фетальный гемоглобин (HbF), HbA₁, HbA_{1c} и HbA₃. Наличие гемоглобиновых фракций metHbA, промежуточный metHbA, HbA_{1c} и HbA₃, являющиеся производными HbA₁, свидетельствуют о биосинтезе бета-полипептидных цепей глобина. Наличие биосинтеза бета-полипептидных цепей глобина, входящих в состав взрослого гемоглобина A₁ свидетельствует о бета⁺-фенотипе талассемии.

В отличие от первого больного ребёнка, во втором случае (HbF 86,38%) во время ИЭФ не была установлена фракция HbA₁ и его производных. Изоэлектрофореграмма представлена тремя гемоглобиновыми фракциями: HbA₂, metHbF и HbF, что свидетельствует о полном нарушении биосинтеза бета-полипептидных цепей глобина. Подобный дефект в биосинтезе бета-полипептидных цепей глобина свидетельствует о бета⁰-фенотипе талассемии.

У двух детей выявили аномальный гемоглобин с изоэлектрической точкой pH — 6,48, что соответствовал аномальным гемоглобинам типа S (ген серповидноклеточности) и D. Для идентификации этих аномальных гемоглобинов с одинаковой электрофоретической подвижностью и изоэлектрической точкой на изоэлектрофореграмме, использовали тест на серповидность эритроцитов. Все образцы крови с аномальным гемоглобином дали положительный ответ на HbS. Итак, все дети имели гетерозиготное носительство HbS.

В одном случае у новорождённого с ЗВУР после шести месяцев также наблюдали повышенное значение фетального гемоглобина — HbF — 44,9% от общего гемоглобина. При ИЭФ идентифицирован аномальный HbS с высоким уровнем фетального гемоглобина при полном отсутствии основной фракции HbA₁. Полное отсутствие HbA₁, и высокое содержание HbF (44,9%) в присутствии аномального HbS свидетельствует о компаундном состоянии двух аллелей одного бета-глобинового гена. Данное сочетание также называют двойным гетерозиготным состоянием генов бета-талассемии и гена серповидноклеточности.

В контрольной группе только у двух детей наблюдали гетерозиготное состояние, в одном случае — гена альфа-талассемии, в другом — бета-талассемии с частотой *встречаемости* по 2% каждый.

В табл. 2 представлены частоты *встречаемости* гемоглобинопатий у детей с задержкой внутриутробного развития.

Как видно из табл. 2, наиболее высокие фенотипические и соответственно генные частоты установлены для гетерозигот по бета-талассемии — 7,77% и 0,0776 в долях ед. На втором месте находится альфа-талассемия — 2,91% и 0,0291. Серповидноклеточное носительство и гомозиготная бета-талассемия выявлено у двух детей, у которых фенотипические и генотипические частоты были одинаковыми и составили 1,94% и 0,0194 соответственно. Только у одного новорождённого с ЗВУР было идентифицировано двойное гетерозиготное состояние по двум аллелям одного бета-глобинового гена с фенотипической (0,97%) и генотипической частотами (0,0097).

При распределении носителей и больных детей с различными типами гемоглобинопатий между симметричным и асимметричным вариантами ЗВУР выявили отличающую картину. Результаты представлены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, из 16 детей с гемоглобинопатиями десять были выявлены в группе детей с симметричным вариантом ЗВУР: одна гетерозигота по β -талассемии, одна гетерозигота по гемоглобину S, две гетерозиготы по α -талассемии, две гомозиготы по β -талассемии и один компаунд с генотипом β -T/HbS. Всего фенотипическая частота и частота генов гемоглобинопатий в этой группе больных составила 18,87% и 0,1087 единиц.

В группе с асимметричным вариантом ЗВУР фенотипическая частота и частота гена гемоглобинопатий со-

ставляла 12,0% и 0,0541 единиц соответственно. По одному случаю с гетерозиготным состоянием α -талассемии и гена серповидноклеточности, 4 случая с гетерозиготной β -талассемией, т.е. всего шесть гетерозигот. Следовательно, частоты фенотипа и гена гемоглобинопатий, в среднем, в 2 раза превышали те же показатели в группе больных с симметричным вариантом ЗВУР.

При анализе крови матерей детей с ЗВУР у пяти из них обнаружили ген альфа-талассемии, у 18 — ген бета-талассемии, у четырёх — ген серповидноклеточности.

Наиболее высокие фенотипические частоты определены для матерей с гетерозиготным носительством бета-талассемии — 17,47%, тогда как по стране гетерозиготное носительство бета-талассемии, в среднем, составляет 8%. Фенотипические частоты альфа-талассемии и гена серповидноклеточности составили 4,85% и 3,88% соответственно, что также высоки по сравнению со средней популяционной частотой по Азербайджану (9). В среднем частота гемоглобинопатий в данной группе высокая и составила — 26,2%.

Частота гена бета-талассемии, альфа-талассемии и гена серповидноклеточности составили 0,0874, 0,0121 и 0,0194 соответственно.

Итак, анализируя кровь матерей и новорождённых, у которых диагностировали ЗВУР, наблюдались отличающиеся от популяционных значений, высокие фенотипические и генные частоты гемоглобинопатий, что, несомненно, влияет на уровень неонатальной заболеваемости.

Таблица 2

Частоты встречаемости гемоглобинопатий у детей с ЗВУР

Типы ГП	Фенотипическая частота (%)	Частота гена (в долях ед.)
Альфа-талассемия	2,91	0,0073
Бета-талассемия	7,77	0,0388
Серповидноклеточное носительство	1,94	0,0097
Гомозиготная бета-талассемия	1,94	0,0197

Таблица 3

Распределение случаев гемоглобинопатий в зависимости от клинических вариантов ЗВУР

Гемоглобинопатии	Симметричный вариант ЗВУР		Асимметричный вариант ЗВУР	
	Фенотипическая частота (%)	Частота гена (доли единиц)	Фенотипическая частота (%)	Частота гена (доли единиц)
α -T/N	3,77 (n = 2)	0,0094	2,0 (n = 1)	0,0047
β -T/N	7,55 (n = 4)	0,0377	8,0 (n = 4)	0,0400
HbS/N	1,89 (n = 1)	0,0094	2,0 (n = 1)	0,0094
β -T/ β -T	3,77 (n = 2)	—	—	—
β -T/HbS	1,89 (n = 1)	—	—	—
Ген α -T	—	0,0094	—	0,0047
Ген β -T	—	0,0849	—	0,0400
Ген S	—	0,0189	—	0,0094

Выводы

У детей с задержкой внутриутробного развития установлены гетерозиготное носительство альфа-талассемии, бета-талассемии и гена серповидноклеточности, а также гомозиготное и компаундное состояние генов бета-талассемии и гена серповидноклеточности. Причём у детей с симметричным вариантом ЗВУР отмечалась высокая доля фенотипической и генотипической частоты гемоглобинопатий в сравнении с асимметричным вариантом.

Дети с задержкой внутриутробного развития составляют группу риска по развитию наследственных гемоглобинопатий. Низкая концентрация фетального гемоглобина HbF и, наоборот, повышенные концентрации гемоглобиновых фракций HbA₁, HbA₂ в крови доношенных новорождённых с ЗВУР могут свидетельствовать о наличии патологических генов гемоглобинопатий, а также срыве внутриутробных компенсаторно-защитных механизмов.

Таким образом, изучение фетального гемоглобина HbF и гемоглобиновых фракций HbA₁, HbA₂ в сыворотке крови детей с ЗВУР при рождении могут иметь диагностическое значение в выявлении наследственных гемоглобинопатий. Проведённые исследования подтверждают высокий риск наследственных гемоглобинопатий при задержке внутриутробного развития и, вследствие этого, необходимость проведения организационных форм профилактики наследственных заболеваний, в частности, ранней постнатальной диагностики и медико-генетического консультирования.

Список литературы

1. Баранов В.С., Ивашенко Т.Э., Наседкина Т.В., Глов А.С. ДНК-микрочипы для диагностики наследственных и мультифакториальных заболеваний у детей // Российский педиатрический журнал. — 2008. — №2. — С. 43—46.

2. Байтаева Д.А., Бессмельцев С.С. Новый подход к терапии больных с наследственной патологией эритронов, как альтернативы гемотрансфузионной терапии // Гематология и трансфузиология. — 2012. — №3. — С. 95.

3. Василькова Н.Ю., Лисиченко О.В., Максимова Ю.В., Белаусова Т.И. Генетически обусловленные формы задержки внутриутробного развития // Мат. Ежегод. научн.-практич. Конф. «Медицина и образование в XXI веке». — Новосибирск, 2004. — С. 27—19.

4. Кочерга З.Р. Нестабильность генома у новорожденных с задержкой внутриутробного развития различных экологических районов Прикарпатья // Фундаментальные исследования. — 2013. — №9—6. — С. 1019—1023.

5. Пилинская М.А., Дыбский С.С., Шеметун О.В., Талан О.О. Уровень спонтанных хромосомных aberrаций у детей с экологически чистого региона, определенных при цитогенетическом анализе равномерно окрашенных метафазных хромосом // Цитология и генетика. — 2004. — №6. — С. 45—48.

6. Радзинский В.Е., Верясов В.Н., Галина Т.В. и др. Генетические и иммунологические аспекты задержки роста плода при недонашивании беременности // Вестник Российского университета дружбы народов. — 2005. — №4. — С. 66—71.

7. Amooee S., Samsami A., Jahanbakhsh J., Karimi M. The pregnancy outcome in patients with minor β -thalassemia // Iranian Journal of Reproductive Medicine. — 2011. — 9(1). — P. 9—14.

8. El-Hazmi M.A.F., Al-Hazmi A.M., Warsy A.S. Sickle cell disease in Middle East Arab countries // The Indian Journal of Medical Research. — 2011. — Vol. 134(5). — P. 597—610.

9. Hayati A.R., Cheah F.C., Yong J.F. et al. The role of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) in neonatal outcome // J. Clin. Pathol. — 2004. — Vol. 57. — P. 1299—1301.

10. Rappaport V.J., Velazquez M., Williams K. Hemoglobinopathies in pregnancy // Obstet. Gynecol. Clin. N. Am. — 2004. — Vol. 31. — P. 287—317.

11. Schechter A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine // Blood. — 2008. — Vol. 112(10). — P. 3927—3938.

12. Sonati M.F., Costa F.F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies // J. Pediatr. (Rio J.). — 2008. — Vol. 84 (4 Suppl.). — S40—51.

Genetic aspects of intrauterine growth restriction

Garayeva S.Z.

Azerbaijan Medical University, Department of children diseases,
Bakixanov str, 23, AZ1022, Baku, Azerbaijan; doktor_sabina@mail.ru

Investigated the relationship between intrauterine growth restriction (IUGR) with carriage of genetic disease in the parents, in particular hereditary hemoglobinopathies. In children with intrauterine growth restriction established heterozygous carriers of alpha-thalassemia, beta-thalassemia and sickle cell gene and homozygous and compound states gene beta-thalassemia and sickle cell gene. Moreover, children with symmetric forms was a high proportion of phenotypic and genotypic frequencies of hemoglobinopathies in comparison with asymmetric forms of IUGR. Determination of fetal hemoglobin and hemoglobin fractions HbF HbA₁, HbA₂ in the serum of children with IUGR at birth may have diagnostic value in detecting hereditary hemoglobinopathies.

Key words: intrauterine growth restriction, thalassemia, sickle cell, hereditary hemoglobinopathies

Спектр и частота встречаемости мутаций в гене *PAH* у больных фенилкетонурией Ростовской области*

Амелина М.А.¹, Степанова А.А.², Поляков А.В.², Амелина С.С.^{1,3}, Зинченко Р.А.^{2,4,5}

¹ — ФГАОУ ВО Академия биологии и биотехнологии Южного федерального университета, 344006, г.Ростов-на-Дону, проспект Стачки 194/1, e-mail: samelina@mail.ru

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

³ — ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава России, Россия, 344022, г.Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

⁴ — ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» МЗРФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

⁵ — ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» МЗРФ, Москва, 127473, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

В рамках генетико-эпидемиологического исследования населения Ростовской области (РО) определены спектр и частоты мутаций в гене *PAH* у больных фенилкетонурией (ФКУ). В ходе исследования проанализированы результаты ДНК-диагностики, проведенной у 126 больных ФКУ. В этническом отношении рассматриваемая выборка больных в основном представлена русским населением (~72%). Диагностическая эффективность составила 100%. Спектр выявленных мутационных изменений представлен 40 мутациями. Наиболее частой мутацией является R408W (63,10%). Частота других мутаций не превышала 5%. С частотой выше 1% выявлены следующие мутации: IVS12+1G>A (3,97%), IVS10-11G>A(3,97%), R261Q (3,57%), P281L (2,78%), R158Q (2,00%), R252W (2,00%), EX5DEL (2,00%) R261X (1,20%). Восемь мутаций — IVS11 + 1G> C, F39del, E280K, A300S, R297H, IVS4+5G>T, IVS10-3C>T, K363>Nfs — 0,79%. Суммарная частота остальных 20 мутаций (A342T, A403V, c.1298dupT, E390G, F299C, I306V, IVS2+13T>G, IVS7+1G>A, IVS7-5T>C, IVS9+5G>A, L48S, N133_Q134>Rfs, R176X, R243X, R261G, R408Q, S16>XfsX1, T372S, V245A, V399V, Y268C, Y387H, Y414C), представленных единичными случаями, составила 9,13% в общей сложности. Проведен анализ частоты встречаемости мутаций в гене *PAH* в зависимости от этнической принадлежности пациента.

Ключевые слова: фенилкетонурия, мутация, ген *PAH*, фенилаланин

Введение

Фенилкетонурия (ФКУ; MIM #261600) — наследственное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, относящееся к группе ферментопатий и обусловленное нарушением метаболизма аминокислоты фенилаланина. Впервые описано в 1934 г. норвежским врачом И.А. Феллингом как заболевание центральной нервной системы с задержкой умственного развития со специфическим «мышинным» запахом [15]. Фенилкетонурия относится к частым наследственным заболеваниям и встречается у народов всех рас и национальностей с вариабельной частотой. Средняя частота классической ФКУ составляет 1 : 10 000 новорожденных, наибольшие частоты зарегистрированы в Турции (1 : 2600), наименьшие — в Японии (1 : 143 000) и в Финляндии (1 : 200 000) [32].

В настоящее время в большинстве стран мира проводится неонатальный скрининг, направленный на раннее выявление пациентов с ФКУ, для своевременного назначения диеты с исключением продуктов, содержащих фенилаланин. Раннее назначение лечения позволяет избежать развития клинической картины заболевания и в значительной степени повышает качество жизни пациента.

Ген фенилаланингидроксилазы (phenylalanine hydroxylase, *PAH*, MIM *612349), отвечающий за развитие

ФКУ, идентифицирован в 1985 г. на длинном плече хромосомы 12 в области q22-24.1 [22, 29]. Мутации в гене *PAH* приводят к снижению активности фермента и развитию классической фенилкетонурии (ФКУ) и гиперфенилаланинемии (ГФА).

Впервые мутация в гене *PAH* обнаружена у больных ФКУ в Дании в 1986 г., определена первая мутация — IVS12+1g>A (612349,0001), точковая замена (GT-на-AT) в сайте сплайсинга 12 интрона [11, 17]. В следующем, 1987 г., определена вторая мутация в гене *PAH* — p.Arg408Trp (612349,0002), миссенс-мутация, замена C — T, локализованная в первом положении 408 кодона, расположенного в экзоне 12 [12]. В последующие годы резко возросло число идентифицированных мутаций в гене *PAH*, что явилось следствием прогресса в разработке молекулярно-генетических методов диагностики. Так, в 1989 г. зарегистрировано уже 6 новых мутаций, в 1990 г. — 8, а в 90-е годы число вновь выявляемых мутаций в гене *PAH* человека достигало 25—30 в год. Исследования мутаций в гене *PAH* продолжают и по настоящее время. Благодаря технологическому прогрессу исследование стало менее трудоемким и более доступным. В настоящее время в базе данных описано более 500 мутаций в гене *PAH* [31].

* Работа выполнена при частичном финансировании РФФИ (14-04-00525, 15-04-01859).

Молекулярно-генетические исследования, посвященные выявлению мутаций в гене *PAH* у больных ФКУ, показали наличие дифференциации в частотах и спектре отдельных мутаций, как в популяциях России, так и в странах мира. Проведенные исследования позволили определить «мажорные» мутации, описать новые мутации, а также выявить особенности спектра и частоты мутаций в гене *PAH* у больных ФКУ в различных популяциях [9, 34]. Настоящее сообщение посвящено изучению спектра и частот мутаций в гене *PAH* у больных ФКУ в Ростовской области.

Материалы и методы

Молекулярно-генетическое исследование мутаций в гене *PAH* проведено 126 пациентам с диагнозом ФКУ (из 222 входящих в регистр больных ФКУ в Ростовской области), родители которых были заинтересованы в ДНК-диагностике. В этническом отношении выборка больных в основном представлена русским населением 72,2% [1]. Также в группу обследуемых вошли пациенты других национальностей: турки (3,97%), армяне (3,97%), даргинцы (1,59%), евреи (0,79%). Моноэтнические браки в семьях больных ФКУ составили 82,5%, межнациональные — 17,5%. При проведении анализа среди межнациональных браков преобладали пациенты, рожденные в семьях русская и украинец (6,35%), русская и армянин (1,59%). Одна семья представлена украинкой и татаринном (0,79%).

Исследование мутаций в гене *PAH* проведено на базе лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» (зав. лабораторией д.б.н. профессор А.В. Поляков). В ходе исследования использованы следующие методы ДНК-анализа — ПЦР, прямое автоматическое секвенирование, MLPA анализ.

Все пациенты при обследовании подписали письменное информированное согласие (в случае несовершеннолетних детей информированное согласие получено у их родителей) на добровольное участие в обследовании, на забор биологического материала (кровь) и на публикацию данных о них в печати. Настоящее исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ».

Результаты и обсуждение

По результатам неонатального скрининга, проводимого с 1993 г. в Ростовской области, частота ФКУ составила 1 : 4978.

В результате проведенной подтверждающей ДНК-диагностики 126 пациентам из РО с диагнозом ФКУ выявлено 40 мутаций в гене *PAH*. Диагностическая эффективность составила 100%. Спектр мутационных изменений в гене *PAH*, выявленных у больных фенилкетонурией в РО, представлен в табл. 1.

Как следует из данных, представленных в табл. 1, наиболее частой является миссенс-мутация R408W, частота которой составила 63,10% от общего числа мутантных аллелей (159/252 хромосом). Исследования, проведенные на территории России на 8 частых мутаций в гене *PAH* показали, что мутация R408W является ведущей и встречается в Краснодарском крае с частотой 51,9% [5,6], в Башкортостане — 53% [3], в Новосибирской области — 56% [7], в Санкт-Петербурге — 72,1% [4], в Архангельской области — 64,6%, в Вологодской области — 62,5%, в Воронежской области — 64,1%, в Курской области — 71,7%, в Московской области — 54,3%, в Свердловской области — 75,7%, в Самарской области — 50,0%, в Республике Удмуртии — 75,0% [8].

Анализ данных европейских исследователей показал, что частота встречаемости мутации R408W у европейцев сильно варьирует и составляет: в Испании 0%, в Турции 1,2% [14], в Хорватии — 37% [35], в Германии 40,1 [33], в Ирландии 42% [26], в Словакии 45,9% [19], в Румынии 47,72% [27], в Молдове 50% [2], в Чехии 55,3% [20], в Польше 63% [18], в Украине 63% [25], в Белоруссии 70% [30], в Литве 73,5% [21], в Латвии 76% [28], в Эстонии 84% [23].

Следующими по частоте встречаемости у больных ФКУ в Ростовской области определены мутации в сайтах сплайсинга IVS10-11G>A (3,97%) и IVS12+1G>A (3,97%).

Мутация IVS10-11G>A (IVS10nt546) характерна для жителей южной Европы и стран Средиземноморья, частота мутации в Италии составляет 12,4%, в Испании 14,7%, у испанских цыган 87,5% [10]. Данная мутация является частой и в странах Южной Америки — Чили, Аргентине, Мексике и составляет 10-13% [16]. Высокие частоты мутации IVS10-11G>A в Иране (19,3%), Турции (74,5%) среди цыган Южной Словакии [19, 20]. В России частота мутации IVS10-11G>A составила: в Краснодарском крае 1% [5, 6], Санкт-Петербурге 1,2% [4], Архангельской области 4,2%, Воронежской области 4,4%, Курской области 2,2%, Московской области 4,3%, Самарской области 8,7%, Свердловской области 4,6% [8], Новосибирской области 7,3% [7] у жителей Вологодской области и Республики Удмуртии не выявлена [2].

В России мутация сайта сплайсинга IVS12+1G>A (IVS12nt1) выявлена в Вологодской области у больных ФКУ в 10,0%, Самарской — 6,5%, в Удмуртии — 5,4%, Архангельской — 4,0%, Курской — 2,2% и Краснодарском крае 2,4%. В Московской, Свердловской и Воронежской областях данная мутация составляет менее 1,5% [2].

Частота мутаций R261Q, P281L и R261X у больных ФКУ Ростовской области составила 3,57%, 2,78% и 1,19% соответственно. Указанные мутации относятся к редким, и в большинстве работ описаны в компаунд-гетерозиготном состоянии с другими редкими мутациями. По данным российских исследователей частота мутации P281L в Московской области мутация со-

ставляет 6,5%, в Краснодарском крае — 3,3%. В Свердловской и Вологодской областях у больных ФКУ данная мутация не обнаружена [6, 8]. В исследовании Zschocke J. частота встречаемости мутации P281L в ге-

не *PAH* у больных ФКУ в Хорватии составила 11%, что позволило авторам высказать предположение о возможном происхождении данной мутации в Юго-Восточной Европе [35].

Таблица 1

Спектр и частота мутаций в гене *PAH*, выявленных у больных фенилкетонурией в Ростовской области

п/п	Название мутации	Систематическое название	Общее число	Частота, %	Тип мутации
1	R408W	c.1222C> T	159	63,10	Миссенс
2	IVS10-11G>A	c.1066-11G>A	10	3,97	Сайта сплайсинга
3	IVS12+1G>A	c.1315+1G>A	10	3,97	Сайта сплайсинга
4	R261Q	c.782G>A	9	3,57	Миссенс
5	P281L	c.842C> T	7	2,78	Миссенс
6	EX5del	c.442-?_509+?del	5	1,98	Крупная делеция
7	R158Q	c.473G>A	5	1,98	Миссенс
8	R252W	c.754C>T	5	1,98	Миссенс
9	R261X	c.781C> T	3	1,19	Миссенс
10	A300S	c.898G>T	2	0,79	Миссенс
11	E280K	c.838G>A	2	0,79	Миссенс
12	F39del	c.115_117delTTC	2	0,79	Делеция
13	K363>Nfs	c.1089del G	2	0,79	Делеция
14	R297H	c.890G>A	2	0,79	Миссенс
15	IVS4+5G>T	c.441 + 5G> T	2	0,79	Сайта сплайсинга
16	IVS10-3C>T	c.1066-3C> T	2	0,79	Сайта сплайсинга
17	IVS11+1G>C	c.1199 + 1G> C	2	0,79	Сайта сплайсинга
18	A342T	c.1024G>A	1	0,40	Миссенс
19	A403V	c.1208C> T	1	0,40	Миссенс
20	c.1298dupT	c.1298dupT	1	0,40	Инсерция
21	E390G	c.1169A> G	1	0,40	Миссенс
22	F299C	c.896T> G	1	0,40	Миссенс
23	I306V	c.916A>G	1	0,40	Миссенс
24	IVS2+13T>G	c.168+13T>G	1	0,40	Сайта сплайсинга
25	IVS7+1G>A	c.842+1G>A	1	0,40	Сайта сплайсинга
26	IVS7-5T>C	c.843-5T>C	1	0,40	Сайта сплайсинга
27	IVS9+5G>A	c.969+5G>A	1	0,40	Сайта сплайсинга
28	L48S	c.143T>C	1	0,40	Миссенс
29	N133_Q134>Rfs	c.398_401delATCA	1	0,40	Делеция
30	R176X	c.526C>T	1	0,40	Нонсенс
31	R243X	c.727C> T	1	0,40	Нонсенс
32	R261G	c.781C>G	1	0,40	Миссенс
33	R408Q	c.1223G>A	1	0,40	Миссенс
34	S16>XfsX1	c.47_48delCT	1	0,40	Делеция
35	T372S	c.1114A>T	1	0,40	Миссенс
36	V245A	c.734T>C	1	0,40	Миссенс
37	V399V	c.1197A>T	1	0,40	Миссенс
38	Y268C	c.803A>G	1	0,40	Миссенс
39	Y387H	c.1159T> C	1	0,40	Миссенс
40	Y414C	c.1241A>G	1	0,40	Миссенс
Всего:			252	100,00	

Таблица 2

Генотипы мутантных аллелей у больных фенилкетонурией в Ростовской области с учётом национальности

Мутация / 1 аллель	Мутация / 2 аллель	Русские	Рус./ азерб.	Рус./ ар-мяне	Рус./ бело-рус.	Рус./ груз.	Рус./ немцы	Рус./ рус.-кор.	Рус./ укр.	Рус./ узбеки	Рус./ укр.-бело-рус.	Рус./ цыгане	Рус.-арм./ укр.	Рус.-тукрм.	Рус./ туркм.-кор.	Ар-мяне	Даргинцы	Ев-реев	Турки	Укр./ тата-ры	Все-го:
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
R408W	R408W	50/39,68	0	0	0	0	0	1/0,79	5/3,97	0	0	0	0	0	0	0	0	1/0,79	2/1,59	0	59
R408W	P281L	4/3,17	0	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
R408W	IVS12+1G>A	3/2,28	0	0	0	0	0	0	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
R408W	EX5del	2/1,59	0	0	0	0	0	0	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
R408W	R158Q	2/1,59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
R408W	R252W	2/1,59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
R408W	R261Q	2/1,59	0	0	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
R408W	A342T	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	A403V	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	F299C	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	IVS2+13T>G	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	IVS4+5G>T	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	IVS7+1G>A	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	IVS7-5T>C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	IVS9+5G>A	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W0	IVS10-3C>T	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	IVS10-11G>A	1/0,79	0	0	0	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
R408W	IVS11+1G>C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/0,79	0	0	0	0	0	0	1
R408W	K363>Nfs	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	L48S	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	N133_Q134>Rfs	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	I306V	0	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	R176X	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	R408Q	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	T372S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/0,79	1
R408W	V399V	0	0	0	0	0	0	0	0	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	Y387H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R408W	Y414C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	1
IVS10-11G>A	F39del	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/0,79	0	0	2/1,59	0	3
IVS10-11G>A	K363>Nfs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/0,79	0	0	0	0	1
IVS12+1G>A	IVS12+1G>A	2/2,28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3

Таблица 2 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
A300S	R297H	2/1,59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
E390G	IVS11+1G>C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
V245A	S16>XfsX1	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
P281L	EX5del	0	0	0	0	0	0	0	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
P281L	R261Q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/0,79	0	0	0	0	1
R158Q	R261Q	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R158Q	F39del	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R158Q	c.1298dupT		0	0	0	0	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R243X	E280K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R252W	IVS4+5G>T	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R252W	IVS10-11G>A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2/1,59	0	0	0	0	2
R261Q	IVS10-3C>T	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R261Q	Y268C	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R261Q	E280K	1/0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R261G	EX5del	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/0,79	0	0	0	0	0	1
R261X	R261X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/0,79	0	0	0	1
R261X	R261Q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/0,79	0	0	0	1
	Всего	91	1	2	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	5	2	1	5	1	126

Примечание. В числителе — абсолютное число больных, в знаменателе процент к общему числу больных ФКУ в Ростовской области. Национальность состав больных фенилкетонурией по национальности родителей: 1 — русские; 2 — армяне; 3 — даргинцы; 4 — евреи; 5 — турки; 6 — украинец/татарин; 7 — русская/азербайджанец; 8 — русская/армянин; 9 — русская/белорус; 10 — русская/грузин; 11 — русская/немец; 12 — русская/русский кореец; 13 — русская/украинец; 14 — русская/узбек; 15 — русская/украинец белорус; 16 — русская/цыган; 17 — русская армянин/украинец; 18 — русская/русский туркмен; 19 — русская/ туркмен кореец

В странах Европы частота мутации R261Q выше и, например, в Италии составила 15,7% [10], в Хорватии — 9% [35], в Египте — 7% [13], в Иране — 2% [24].

Исследования по частоте мутации R261X немногочисленны. Мутация R261X среди больных ФКУ в Иране составила 8% [24]. На Дальнем Востоке России данная мутация встречается в 1,7%.

Проведенный анализ показал одинаково частоту (1,98%) миссенс-мутаций R158Q, R252W и крупной делеции EX5DEL. Мутации в сайтах сплайсинга IVS4+5G>T, IVS10-3C>T, IVS11+1G>C, миссенс-мутации A300S, E280K, R297H и делеции F39del, K363f>Nfs определены также с одинаковой частотой (0,79%) и в общей сложности составили 6,35%. Остальные 18 мутаций (табл. 1) выявлены в единичных случаях (0,40%) и суммарно составляют 8,33% от всех мутантных аллелей гена *PAH*.

В ходе исследования определены 2 новые (частота по 0,40%), ранее не описанные мутации в гене *PAH* — Y268C и c.1298dupT [31].

Анализ спектра выявленных мутационных изменений в гене *PAH* показал, что по типу мутаций основной пул приходится на миссенс-мутации (82,55%). Мутации сайта сплайсинга определены в 11,90%, и крупные делеции составили 2,38% и 1,98% соответственно. Нонсенс-мутации (0,79%) и инверсия (0,40%) выявлены в единичных случаях.

Анализ частот отдельных мутаций в гене *PAH* в разных этнических группах

Россия многонациональная страна, для каждого региона характерен особенный национальный состав населения (даже для исконно русских территорий). На территории Ростовской области, по данным ГБУ РО «МИАЦ», проживает 4 252 366 чел. По национальному составу население РО составляют русские — 90,3%, армяне — 2,6%, украинцы — 1,9%, турки — 0,9%, азербайджанцы — 0,4% и другие. В целом, в области проживают представители более 150 национальностей и народностей.

Проведен анализ спектра и частот мутаций в гене *PAH* с учетом национальной принадлежности больных ФКУ, проживающих в регионе. Как следует из данных представленных в табл. 2, среди русских больных ФКУ (91/182 хромосомы) «мажорной» является мутация R408W, частота которой в данной группе составила 51,19%, а в гомозиготном состоянии встретилась у 54,95% больных. Второй по частоте у русских пациентов является мутация — IVS12+1G>A (3,57%), реже встречаются мутации R261Q (2,38%), P281L (1,59%), R158Q (1,59%), R252W (1,19%). Мутации A300S, EX5del, IVS4+5G>T, IVS10-3C>T, R297H выявлены с одинаково низкой частотой (по 0,79%). Остальные 17 мутаций представлены единичными компаунд-гетерозиготами (по 0,40%). Из 40 выявленных мутаций у больных ФКУ проживающих в РО, среди русского населения выявлено 28 мутаций.

В семьях больных ФКУ армянской национальности (5 пациентов/10 хромосом) наиболее частыми оказались мутации IVS10-11G>A и R252W, выявленные на хромосомах 4 и 2 соответственно. Мутации F39del, K363>Nfs, P281L, R261Q обнаруженные с одинаковой частотой, встретившись на 1 хромосоме каждая. Определенные генотипы: R252W/IVS10-11G>A (2 больных), F39del/IVS10-11G>A (1 больной), K363>Nfs/IVS10-11G>A (1 больной), P281L/R261Q (1 больной).

У турок-месхетинцев наиболее частой определена мутация R408W, которая выявлена на 4 хромосомах у двух больных в гомозиготном состоянии. Мутация IVS10-11G>A в гомозиготном состоянии выявлена на четырех хромосомах. У одного больного выявлены мутации E390G и IVS11+1G>C. Определенные генотипы: R408W/R408W (2 больных), IVS10-11G>A /IVS10-11G>A (2 больных), E390G /IVS11+1G>C (1 больной).

У двух пациентов, даргинцев по национальности, наиболее частой выявлена мутация R261X, которая определена на 3 из 4 хромосомах. Мутация R261Q обнаружена у одного больного в компаунд-гетерозиготном варианте с мутацией R261X (генотипы больных R261X/R261X, R261X/R261Q).

Единственная больная в многодетной еврейской семье является носителем мутации R408W в гомозиготном состоянии.

В межнациональных семьях наиболее частой является мутация R408W и составила 9,54%. С частотой 1,19% и 0,80% обнаруживаются мутации EX5del и P281L, соответственно. Другие мутации встречаются в единичных вариантах и в общей сложности составляют 5,6% от всех мутаций.

Полученные в ходе данного исследования результаты позволили оценить спектр и частоту встречаемости мутаций в гене *PAH* у больных фенилкетонурией в Ростовской области. Показано, что, как и в большинстве регионов России, «мажорной» мутацией является R408W, частота встречаемости которой составила 63,10%. К другим частым мутациям, составляющим спектр мутаций, выявленных у больных ФКУ в Ростовской области, относятся IVS10-11G>A

3,97%, IVS12+1G>A 3,97%, R261Q 3,57%, P281L 2,78%, EX5del 1,98%, R158Q 1,98%, R252W 1,98%.

Полученные результаты можно использовать для оптимизации помощи семьям с больными ФКУ в Ростовской области и, прежде всего, для проведения пренатальной диагностики.

Список литературы

1. Амелина С.С., Кривенцова Н.В., Поляков А.В., Зинченко Р.А. Молекулярно-генетическое типирование больных с фенилкетонурией в Ростовской области // Медицинская генетика. — 2004. — Т. 3, №3. — С. 139—144.
2. Аничкина (Степанова) А.А., Гаврилюк А.П., Тверская С.М., Поляков А.В. Анализ наиболее часто встречающихся мутаций в гене *PAH* у больных фенилкетонурией в ряде регионов бывшего Советского Союза // Медицинская генетика. — 2003. — Т. 2, №4. — С. 175—181.
3. Ахметова В.Л., Викторова Т.В., Мурзабаева С.Ш., Маржанов Р.В., Хуснутдинова Э.К. Анализ мутаций гена *PAH* у больных фенилкетонурией из Башкортостана // Медицинская генетика. — 2003. — Т. 2, №4. — С. 182—187.
4. Барановская С.С. Молекулярно-генетический анализ фенилкетонурии в Санкт-Петербурге: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.б.н. — СПб., 1996. — 24 с.
5. Зинченко Л.В., Матулевич С.А., Кучер А.Н. Территориальная распространенность и этническое разнообразие мутаций гена фенилаланингидроксилазы в Краснодарском крае // Кубан. науч. мед. вестн. — 2006. — №3—4 (84—85). — С. 39—42.
6. Матулевич С.А., Зинченко Л.В., Голихина Т.А., Голубцов В.И. Анализ мутаций гена *PAH* у больных фенилкетонурией в Краснодарском крае // Медицинская генетика. — 2004. — Т. 3, №10. — С. 466—469.
7. Смагулова Ф., Масленников А., Морозов И., Китайник Г. Мутации в структуре экзона 7 гена фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией Новосибирской области // Генетика человека. — 2000. — Т. 36, №6. — С. 849—852.
8. Степанова А.А. Исследование молекулярно-генетической природы фенилкетонурии в выборках российских больных: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.б.н. — М., 2005. — 27 с.
9. Bernegger C., Blau N. High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1,919 patients observed from 1988 to 2002 // Mol. Genet. Metab. — 2002. — Vol. 77. — P. 304—313.
10. Daniele A., Cardillo G., Pennino C., Carbone M.T., Scognamiglio D., Corra A., Pignero A., Castaldo G., Salvatore F. Molecular epidemiology of phenylalanine hydroxylase deficiency in Southern Italy: a 96% detection rate with ten novel mutations // Ann. Hum. Genet. — 2007. — Vol. 71(Pt 2). — P. 185—193.
11. DiLella A.G., Kwok S.C.M., Ledley F.D., Marvit J., Woo S.L.C. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene // Biochemistry. — 1986. — Vol. 25. — P. 743—749.
12. DiLella A.G., Marvit J., Brayton K., Woo S.L.C. An amino acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2 // Nature. — 1987. — Vol. 327. — P. 333—338.
13. Effat L.K., Essawi M.L., Abd E., Hamid M.S., Hawari N., Gad Y.Z. Screening for six Mediterranean mutations in 90 Egyptian patients with phenylketonuria // Bratisl. Lek. Listy. — 2008. — Vol. 109(1). — P. 17—19.
14. Eisensmith R.C., Goltsov A.A., O'Neill C., Tyfield L.A., Schwartz E.I., Kuzmin A.I., Baranovskaya S.S., Tsukerman G.L.,

Treacy E., Scriver C.R., Guttler F., Guldberg P., Eiken H.G., Apold J., Svensson E., Naughten E., Cahalane S.F., Croke D.T., Cockburn F., Woo S.L.C. Recurrence of the R408W Mutation in the Phenylalanine Hydroxylase Locus in Europeans // *Am. J. Hum. Gen.* — 1995. — Vol. 56 (1). — P. 278–286.

15. Folling A.I. Ueber Ausscheidung von Phenylbrenztraubensaure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillitate // *Ztschr. Physiol. Chem.* — 1934. — Vol. 227. — P. 169–176.

16. Guldberg P., Rey F., Zschocke J., Romano V., Francois B., Michiels L., Ullrich K., Hoffmann G., Burgard P., Schmidt H., Meli C., Riva E., Dianzani I., Ponzone A., Rey J., Guttler F. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype // *Am. J. Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 63. — P. 71–79.

17. Guttler F., Woo S.L.C. Molecular genetics of PKU // *J. Inher. Metab.* — 1986. — Vol. 9. — P. 58–68.

18. Jaruzelska J., Matuszak R., Lyonnet S., Rey F., Rey J., Filipowicz J., Borski K., Munnich A. Genetic background of clinical homogeneity of phenylketonuria in Poland // *J. Med. Genet.* — 1993. — Vol. 30. — P. 232–234.

19. Kadasi L., Polakova E., Hudegova S. et al. PKU in Slovakia: mutation screening and haplotype analysis // *Hum. Genet.* — 1995. — Vol. 1. — P. 112114.

20. Kalanin J., Takarada Y., Kagawa S., Yamashita K., Ohtsuka N., Matsuo A. Gypsy phenylketonuria: a point mutation of the phenylalanine hydroxylase gene in gypsy families from Slovakia // *Am. J. Med. Genet.* — 1994. — Vol. 49. — P. 235–239.

21. Kasnauskienė J., Giannattasio S., Lattanzio P. et al. The molecular basis of phenylketonuria in Lithuania // *Hum. Mutat.* — 2003. — Vol. 21, №4. — P. 398.

22. Lidsky A.S., Law M.L., Morse H.G. et al. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1985. — Vol. 82. — P. 622–225.

23. Lillevali H., Ounap K., Metspalu A. Phenylalanine hydroxylase gene mutation R408W is present on 84% of Estonian phenylketonuria chromosomes // *Eur. J. Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 4(5). — P. 296–300.

24. Moradil K., Alibakhshi R., Ghadiri K., Khatami S.R., Gahdari H. Molecular analysis of exons 6 and 7 of phenylalanine hydroxylase gene mutations in Phenylketonuria patients in Western Iran // *Indian J. Hum. Genet.* — 2012. — Sep. — Vol. 18(3). — P. 290–293. doi: 10.4103/0971-6866.107978.

25. Nechiporenko M.V., Laliyshits L.A. Analysis of mutations in the phenylalanine hydroxylase gene in Ukrainian families at high risk for phenylketonuria // *Tsitol. Genet.* — 2000. — Vol. 6, 34. — P. 59–63.

26. O'Neill C.A., Eisensmith R.C., Croke D.T., Naughten E.R., Cahalane S.F., Woo S.L. Molecular analysis of PKU in Ireland // *Acta Paediatr. Suppl.* — 1994. — Vol. 407. — P. 43–44.

27. Popescu T., Blazkova M., Kozak L. et al. Mutation spectrum and phenylalanine hydroxylase RFLP/VNTR background in 44 Romanian Phenylketonurie alleles // *Hum. Mutat.* — 1998. — Vol. 12. — P. 314–319.

28. Pronina N., Giannattasio S., Lattanzio P. et al. The molecular basis of phenylketonuria in Latvia // *Hum. Mutat.* — 2003. — Vol. 21. — P. 398–399.

29. Scriver C.R., Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly S.W., Valle D., eds; Childs B., Kinzler K.W., Vogelstein B., assoc eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8 ed. — New York, NY: McGraw-Hill, 2001. — P. 1667–1724.

30. Tsukerman G., Kirillova, Gusina N. et al. Population control of Genetics diseases in Belarus: Status and development // *Brazilian Jour. Of Genet.* — 1996. — Vol. 19, №2. — P. 75–77.

31. URL: <http://www.pahdb.mcgill.ca>. (дата обращения май 2015).

32. URL: McKusick V.A. Online Mendelian inheritance in man. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (дата обращения май 2015).

33. Zschocke J., Hoffman G.F. Phenylketonuria mutation in Germany // *Hum. Genet.* — 1999. — Vol. 104. — P. 390–398.

34. Zschocke J., Hoffman G.F. PAH gene mutation analysis in clinical practice comments in mutation analysis anticipates dietary requirements in phenylketonuria // *Eur. J. Pediatr.* — 2000. — Vol. 159. — P. 154–155.

35. Zschocke J., Preusse A., Sarnavka V. et al. The molecular basis of phenylalanine hydroxylase deficiency in Croatia // *Hum. Mutat.* — 2003. — Vol. 21(4). — P. 399.

Spectrum and frequency of mutations in *PAH* gene in patients with phenylketonuria from Rostov region

Amelina M.A.¹, Stepanova A.A.², Polyakov A.V.², Amelina S.S.^{1,3}, Zinchenko R.A.^{2,4,5}

¹ — Academy of Biology and Biotechnology of Southern Federal University, st.194/1 prospect Stachki, Rostov-on-Don, 344006, e-mail: samelina@mail.ru

² — Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», 1, Moskvorechie Str., Moscow, 115478

³ — The Rostov State Medical University, 29 St. Nakhichevansky, Rostov-on-Don, 344022

⁴ — Pirogov Russian National Research Medical University, 1. Ostrovityanova Str., Moscow, 117997

⁵ — Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20 bld. 1, Delegatskaya Str., Moscow, 127473

Within a more general framework of genetic and epidemiology study of Rostov Region (RR) population PAH gene mutations frequencies and PAH gene spectrum mutations for in RR. Comprehensive DNA diagnostics detect PAH mutations in 126 PKU patients. Russians are the most substantial ethnic group composing a patients' sample (~72%). Diagnostic efficiency was 100%. 40 different mutations represent the spectrum. The most frequent mutation is R408W (63,10%). The frequency of other mutations did not exceed 5%. With a frequency higher than 1% revealed the following mutations: IVS12+1G>A (3,97%), IVS10-11G>A(3,97%), R261Q (3,57%), P281L (2,78%), R158Q (2,00%), R252W (2,00%), EX5DEL (2,00%) R261X (1,20%). 8 mutations — IVS11 + 1G> C, F39del, E280K, A300S, R297H, IVS4+5G>T, IVS10-3C>T, K363>Nfs identified with the same frequency — 0.79%. The overall incidence of other mutations 20 (A342T, A403V, c.1298dupT, E390G, F299C, I306V, IVS2+13T>G, IVS7+1G>A, IVS7-5T>C, IVS9+5G>A, L48S, N133_Q134>Rfs, R176X, R243X, R261G, R408Q, S16>XfsX1, T372S, V245A, V399V, Y268C, Y387H, Y414C), represented isolated cases, was 9,13%. The analysis of the frequency of mutations in the gene for PAH was depending on the ethnicity of the patient.

Key words: phenylketonuria, mutation, gene PAH, phenylalanine

Московский региональный сегмент Федерального регистра орфанных заболеваний

Брюханова Н.О.¹, Жилина С.С.², Мутовин Г.Р.³, Зинченко Р.А.^{4,5}

¹ — Государственное бюджетное учреждение Морозовская детская городская клиническая больница Департамента Здравоохранения г.Москвы, Москва, 4-й Добрынинский пер., 1/9, 119049, mosscrining@morozdgbk.ru

² — Научно-практический центр медицинской помощи детям с пороками развития черепно-лицевой области и врождёнными заболеваниями нервной системы Департамента Здравоохранения г.Москвы, Москва, ул. Авиаторов, д.38, 119620, npsprakt@mail.ru

³ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, ул. Островитянова, д.1, 117997

⁴ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Медико-генетический научный центр, ул. Москворечье, д. 1, 115478; genazinchenko@mail.ru

⁵ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» МЗРФ, Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1, 127473

Редкие заболевания (rare disease, orphan disease) — заболевания, затрагивающие небольшую часть популяции и имеющие распространённость не более 10 случаев на 100 000 населения. Редкие заболевания часто опасны для жизни и приводят к глубокой инвалидизации и социальной дезадаптации. Поэтому в соответствии с Постановлением Правительства РФ от 26.04.2012 №403 был создан Федеральный регистр лиц, страдающих жизнеугрожающими и хроническими прогрессирующими редкими заболеваниями, приводящими к сокращению продолжительности жизни или их инвалидности. В настоящем сообщении обсуждаются первые результаты анализа данных регистра орфанных заболеваний Московского регионального сегмента.

Ключевые слова: редкие (орфанные) заболевания, федеральный регистр, перечень редких заболеваний

Редкими принято считать заболевания, затрагивающие небольшую часть популяции. Однако в настоящее время не существует универсального критерия для оценки редкости конкретного заболевания. Частота заболевания может варьировать в зависимости от региона или популяции. По оценке EURORDIS (Европейской неправительственной организации по редким заболеваниям, объединяющей более 600 организаций пациентов с редкими заболеваниями из 58 стран), в мире насчитывается более 6000 редких заболеваний. Общее количество пациентов с редкими заболеваниями только в странах Евросоюза, оценивается более чем в 30 млн чел.

В медицинской литературе к числу редких относят заболевания с разным уровнем распространённости — от 1 из 1000 до 1 из 200 000. Так, в Европейском союзе болезнь или патологическое состояние относят к категории редких, если уровень заболеваемости не превышает 1 случая на 2000 чел. Для каждой страны принят свой перечень «редких заболеваний» и критерии частоты встречаемости. В России редким считается заболевание с распространённостью не более 10 случаев на 100 000 чел.

По оценкам EURORDIS около 80% редких заболеваний имеют генетическую природу. Часто редкие заболевания являются хроническими и представляют угрозу для жизни пациента. Совокупно, редкие заболевания оказывают негативное воздействие не только на самих больных, но и на членов их семей.

Для привлечения к проблеме данных заболеваний, изучения их патогенеза, распространённости, а также создания лекарственных средств (так называемых орфанных препаратов) требуется поддержка со стороны государства.

С 1 января 2012 г. вступил в силу федеральный закон №323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», который предусматривает лечение людей с редкими заболеваниями. Финансирование медицинской помощи таким больным возложено на регионы [4]. В течение полугода сформирован перечень редких заболеваний, запущен в работу Федеральный регистр пациентов с редкими заболеваниями и приняты подзаконные акты, в том числе на региональном уровне.

Всего было сформировано два перечня редких заболеваний. Один — это перечень жизнеугрожающих и хронических прогрессирующих редких заболеваний, приводящих к сокращению продолжительности жизни или к инвалидности, — согласно Постановлению Правительства РФ от 26.04.2012 №403 включает 24 заболевания [1]. Это те заболевания, для которых в настоящее время имеется патогенетическое лечение.

Второй список, подготовленный Министерством здравоохранения РФ, включает перечень редких заболеваний из 230 наименований. В перечень вошли заболевания, которые соответствуют утверждённому в России критерию, не более 10 случаев на 100 тысяч населения вне зависимости от того, существуют ли на сегодняшний день методы лечения и лекарственная терапия или нет.

В формировании списка болезней принимали участие медицинские специалисты и представители общественных пациентских организаций. В будущем ведомство совместно со специалистами и пациентскими организациями будут возвращаться к теме актуализации перечня редких заболеваний.

Согласно федеральному закону «Об основах охраны здоровья граждан в РФ», лечение и лекарственное обеспечение пациентов с редкими заболеваниями входит в полномочия региональных властей [4]. Для того, что бы точно определить потребность в лекарственных препаратах, объём финансирования и сделать помощь адресной, Постановлением Правительства РФ от 26.04.2012 №403

был определен Порядок ведения Федерального регистра пациентов с редкими заболеваниями [1].

На данный момент уже разработаны стандарты оказания помощи больным с редкими заболеваниями, которые представлены на сайте rosminzdrav.ru.

Московский сегмент Федерального регистра лиц, страдающих редкими заболеваниями, в настоящее время осуществляет свою работу в составе Центра неонатального скрининга Морозовской ДГКБ [2, 3].

За прошедший период (1.06.2012 — 1.06.2015) нашим отделом были получены сведения о пациентах с заболеваниями, подлежащими обязательной регистрации, от следующих государственных бюджетных учреждений

Таблица 1

**Перечень орфанных заболеваний и количество лиц, состоящих на учёте
в Московском сегменте федерального регистра**

№	Заболевание	Код МКБ X	Количество лиц, внесённых в регистр, в том числе:		
			Всего	Взрослые	Дети
1	Гемолитико-уремический синдром	D59.3	19	11	8
2	Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (Маркиафавы—Микели)	D59.5	34	34	
3	Апластическая анемия неуточнённая	D61.9	44	43	1
4	Наследственный дефицит факторов II (фибриногена), VII (лабильного), X (Стюарта—Прауэра)	D68.2	14	1	13
5	Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (синдром Эванса)	D69.3	394	280	114
6	Дефект в системе комплемента	D84.1	38	33	5
7	Преждевременная половая зрелость центрального происхождения	E22.8	74		74
8	Нарушения обмена ароматических аминокислот (классическая фенилкетонурия, другие виды гиперфенилаланинемии)	E70.0, E70.1	340 58	70	270 58
9	Тирозинемия	E70.2	1		1
10	Болезнь "кленового сиропа"	E71.0	1		1
11	Другие виды нарушений обмена аминокислот с разветвлённой цепью (изовалериановая ацидемия, метилмалоновая ацидемия, пропионовая ацидемия)	E71.1	8		8
12	Нарушения обмена жирных кислот	E71.3	3	1	2
13	Гомоцистинурия	E72.1	3		3
14	Глютаровая ацидурия	E72.3	3		3
15	Галактоземия	E74.2	20	1	19
16	Другие сфинголипидозы: болезнь Фабри (Фабри—Андерсона), Нимана—Пика, Гоше	E75.2	8	5	3
17	Мукополисахаридоз, тип I	E76.0	10	3	7
18	Мукополисахаридоз, тип II	E76.1	14	2	12
19	Мукополисахаридоз, тип VI	E76.2	4	4	
20	Острая перемежающаяся (печеночная) порфирия	E80.2			
21	Нарушения обмена меди (болезнь Вильсона)	E83.0	8	3	5
22	Несовершенный остеогенез	Q78.0	25	5	20
23	Легочная (артериальная) гипертензия (идиопатическая) (первичная)	I27.0	52	33	19
24	Юношеский артрит с системным началом	M08.2	45	3	42
	ВСЕГО		1220	532	688

города Москвы: «ДГКБ №13 им. Н.Ф. Филатова ДЗ г.Москвы», «Морозовская детская городская клиническая больница ДЗ г.Москвы», «Измайловская детская городская клиническая больница ДЗ г.Москвы», «НПЦ психического здоровья детей и подростков ДЗ г.Москвы», «Городской гематологический, консультативно-диагностический и организационно-методический центр Городской клинической больницы им. С.П. Боткина ДЗ г.Москвы», Государственного научного центра «Институт иммунологии» ФМБА, Эндокринологического диспансера и ряда поликлиник Департамента здравоохранения г.Москвы.

На конец второго квартала 2015 г. в Московском сегменте федерального регистра состоят на учёте 1220 чел. (табл. 1).

В результате статистического анализа 1 этапа создания и формирования базы регистра (табл. 2) показано, что в Московском сегменте федерального регистра состоит на учёте 56% детей (688) и 44% взрослых (532).

В табл. 2 представлено количество пациентов по нозологиям в процентном соотношении, в порядке убывания.

Как следует из табл. 2, наибольший процент выявляемости зарегистрирован для пациентов с нарушением

Таблица 2

Нозологический спектр, код по МКБ 10 и количество пациентов (в процентном соотношении), зарегистрированных в Московском сегменте федерального регистра

№№	Заболевание	Код МКБ-10	Количество лиц, внесённых в регистр, %
1	Нарушения обмена ароматических аминокислот	E70.0, E70.1	33
2	Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (синдром Эванса)	D69.3	32
3	Преждевременная половая зрелость центрального происхождения	E22.8	6
4	Апластическая анемия неуточненная	D61.9	4
5	Лёгочная (артериальная) гипертензия (идиопатическая) (первичная)	I27.0	4
6	Юношеский артрит с системным началом	M08.2	4
7	Дефект в системе комплемента	D84.1	3
8	Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (Маркиафавы—Микели)	D59.5	3
9	Несовершенный остеогенез	Q78.0	2
10	Галактоземия	E74.2	1,6
11	Гемолитико-уремический синдром	D59.3	1,5
12	Наследственный дефицит факторов II (фибриногена), VII (лабильного), X (Стюарта—Прауэра)	D68.2	1
13	Мукополисахаридоз, тип II	E76.0	0,8
14	Другие виды нарушений обмена аминокислот с разветвлённой цепью (изовалериановая ацидемия, метилмалоновая ацидемия, пропионовая ацидемия)	E71.1	0,6
15	Другие сфинголипидозы: болезнь Фабри (Фабри—Андерсона), Нимана—Пика, Гоше	E75.2	0,6
16	Нарушения обмена меди (болезнь Вильсона)	E83.0	0,6
17	Мукополисахаридоз, тип I	E76.2	0,3
18	Нарушения обмена жирных кислот	E71.3	0,2
19	Гомоцистинурия	E72.1	0,2
20	Глютаровая ацидурия	E72.3	0,2
21	Тирозинемия	E70.2	0,1
22	Болезнь "кленового сиропа"	E71.0	0,1
23	Мукополисахаридоз, тип VI	E76.1	0,1
24	Острая перемежающаяся (печеночная) порфирия	E80.2	0

обмена ароматических аминокислот (33%). Причём в основном за счёт классической формы фенилкетонурии (E70.0) 270 пациентов детского возраста и 70 взрослых больных. С другими видами гиперфенилаланинемии (E70.1) выявлено 58 детей. Среди других форм много пациентов, молекулярная диагностика у которых ограничена частыми мутациями в гене *PAH*. Учитывая большой спектр мутаций в гене *PAH* у больных, не прошедших полноценную подтверждающую ДНК-диагностику в связи с дорогой стоимостью анализа всего гена, нельзя исключить наличие фенилкетонурии, которая может быть обусловлена наличием «лёгких мутаций» в гене *PAH* либо компаунд-гетерозиготным носительством со второй «лёгкой» мутацией. Большинство этих пациентов не получают специализированной диеты.

На втором месте (32%) по выявляемости зарегистрирована идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (в том числе синдром Эванса) — 394 пациента (280 взрослых и 114 детей). Эти пациенты наблюдаются в Городском гематологическом центре Городской клинической больницы им. С.П. Боткина и большинство из них получает терапию Ромипластином (энплейт), стимулирует тромбопоэз, и препарат Элтромбопаг.

Еще одна обширная группа — это пациенты с преждевременным половым развитием центрального происхождения (74 ребёнка — 6%). В основе заболевания лежит несвоевременная активация гипоталамуса или аденогипофиза. Этим детям показана терапия трипторелином, который подавляет секрецию гонадотропинов. Лечение продолжается до 14-15 лет, а затем отменяется.

Группа пациентов с юношеским артритом с системным началом (45 пациентов, из которых 3 взрослых пациента и 42 ребёнка) занимает 6-е место. Это заболевание собирательное, оно включает в себя все формы артритов, которые возникают у юных пациентов в возрасте до 16 лет. Этиология неизвестна. Они наблюдаются и получают терапию иммунодепрессантами (метатрексат, адалимумаб, тоцлизумаб) в Центре ревматоидного артрита Морозовской ДГКБ.

Как следует из вышеизложенного, в настоящий момент сложно получить представление по Москве о частоте данных заболеваний, так как получаемая информация о пациентах с различными диагнозами скорее всего не полная, так как не все пациенты состоят на учёте в медицинских учреждениях и не все организации на данный момент исчерпывающе представляют данные. Однако создание Центра орфанных болезней позволит более полно получать и анализировать информацию о пациентах.

В соответствии с Приказом №1132 Департамента Здравоохранения г.Москвы в целях дальнейшего совершенствования организации оказания медицинской по-

мощи детям и подросткам с редкими заболеваниями на базе Морозовской ДГКБ с 27.02.2015 г. функционирует Центр орфанных и других редких заболеваний, который оказывает стационарную специализированную медицинскую помощь пациентам с метаболическими заболеваниями, митохондриальной патологией и наследственными нейродегенерациями. Также на базе Морозовской ДГКБ с 20.04.2015 г. функционирует Центр неонатального скрининга, который является амбулаторным звеном помощи пациентам с редкими (орфанными) заболеваниями, проживающим в Москве. Он организует обеспечение лекарственными препаратами пациентов с орфанной патологией и осуществляет ведение регистров.

На сегодняшний день существуют проблемы в организации медицинской помощи пациентам с редкими заболеваниями, это недостаточная информированность врачей о редких заболеваниях и учреждениях, где они наблюдаются и как получают препараты, это проблемы с координацией пациентов и с обеспечением их лекарственными препаратами и лечебным питанием. В связи с созданием орфанного центра появились новые возможности в решении этих проблем. Стало доступным проведение конференций и круглых столов для определения новых целей и задач, и путей их решения, а также для повышения информированности врачей об орфанных заболеваниях. Также стало возможным динамическое персонализированное наблюдение пациентов с редкими заболеваниями и более глубокий анализ статистических данных.

Список литературы

1. Постановление Правительства РФ от 26 апреля 2012 г. №403 «О порядке ведения Федерального регистра лиц, страдающих жизнеугрожающими и хроническими прогрессирующими редкими (орфанными) заболеваниями, приводящими к сокращению продолжительности жизни граждан или их инвалидности, и его регионального сегмента».
2. Приказ №352 Департамента Здравоохранения города Москвы от 15.04.2013 «О порядке ведения Московского сегмента Федерального регистра лиц, страдающих редкими (орфанными) заболеваниями».
3. Приказ №139 Департамента Здравоохранения города Москвы от 21.02.2014 «О дальнейшем совершенствовании организации оказания медицинской помощи жителям города Москвы, страдающим заболеваниями, включенными в перечень жизнеугрожающих прогрессирующих редких (орфанных) заболеваний».
4. Федеральный закон Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»: Статья 15. Передача осуществления полномочий Российской Федерации в сфере охраны здоровья органам государственной власти субъектов Российской Федерации.

Moscow regional segment of the Federal orphan diseases register. A report at the end of the second quarter of 2015

Bryukhanova N.O.¹, Zilina S.S.², Mutovin G.R.³, Zinchenko R.A.^{4,5}

¹ — Morozovskaya Children's City Clinical Hospital of the Department of Health of Moscow city, 4-th Dobryninsky pereulok 1/9, Moscow, 119049, mosscrining@morozdgkb.ru

² — Scientific-practical center of medical care to children with malformations of craniofacial and congenital diseases of the nervous system of the Health Department of the city of Moscow, str. Aviatorov, 38, Moscow, 119620, npcprakt@mail.ru

³ — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation, 1, Ostrovityanova Str., Moscow, 117997

⁴ — Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moskvorechie str., 1, Moscow, 115478

⁵ — Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20 bld. 1, Delegatskaya Str., Moscow, 127473

Rare diseases (rare disease, orphan disease) — diseases affecting a small part of the population and has a prevalence of no more than 10 cases per 100 000 population. Rare diseases are often life-threatening and result in profound disability and social maladjustment. Therefore, in accordance with the RF Government Decree dated 26.04.2012 No. 403 was created by the Federal register of persons suffering from life-threatening and chronic progressive rare diseases, leading to reduced life expectancy or disability. This report discusses the results of the first analysis of the data register of orphan diseases Moscow regional segment.

Key words: rare (orphan) diseases, federal register, list of rare diseases

Молекулярно-генетическая диагностика семейного случая синдрома LEOPARD в Беларуси

Осадчук Т.В., Румянцева Н.В., Зобикова О.Л., Наумчик И.В.

ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», МЗ РБ, Республика Беларусь, 220053, г.Минск, Орловская, 66

Синдром LEOPARD (LS, OMIM 151100) — редкое генетическое заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования. Основными симптомами LS являются лентиго и патология сердечно-сосудистой системы. Заболевание характеризуется выраженным клиническим полиморфизмом: от тяжелой формы гипертрофической кардиомиопатии, глухоты, задержки умственного развития до легких клинических проявлений в виде мягких лицевых дисморфий и лентиго. Представленное наблюдение демонстрирует внутрисемейную вариабельность клинических проявлений синдрома, а также возможность установления диагноза LS в раннем возрасте при наличии унаследованной формы заболевания. Уточненный молекулярный дефект — мутация Thr468Met в гене *PTPN11* позволяет верифицировать клинический диагноз и провести пренатальную ДНК-диагностику плода при последующих беременностях.

Ключевые слова: синдром LEOPARD, ген *PTPN11*, лентиго, гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМ)

Введение

Синдром LEOPARD (LS, OMIM 151100) — редкое генетическое заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования, высокой пенетрантностью и различной экспрессивностью клинических признаков, обусловленное мутациями в генах *PTPN11*, *RAFI*, *BRAF*. Впервые было описано Zeisler и Becker в 1936 г. у 24-летней женщины с гипертелоризмом, лентиго, деформацией грудной клетки.

В 1969 г. Gorlin R. с соавторами предложили диагностические критерии и название синдрома LEOPARD, состоящее из первых букв основных фенотипических признаков [1, 2]:

Lentigines — лентиго, мелкие плоские пятна коричневого цвета;

Electrocardiographic (ECG) conduction abnormalities — нарушения проводящей системы сердца;

Ocular hypertelorism — гипертелоризм;

Pulmonic stenosis — стеноз легочной артерии;

Abnormal genitalia — аномалии развития половых органов;

Retardation of growth — задержка роста;

Deafness sensorineural — нейросенсорная тугоухость.

Популяционная частота заболевания не установлена. Внутри группы «нейро-кардио-лице-кожных» (NCFC) синдромов, в которую входит LS, он является вторым по частоте встречаемости после синдрома Нуна [3].

Клинический диагноз LS устанавливается при наличии лентиго и как минимум, двух основных признаков [4, 5]. В отсутствие лентиго сочетание трёх других характерных для синдрома признаков и наличие близкого родственника с диагнозом LS могут также считаться диагностически значимыми. Однако использование данных критериев не всегда позволяет диагностировать LS у детей с неполным фенотипом, особенно при sporadических случаях заболевания.

LS характеризуется выраженным клиническим полиморфизмом: от тяжелой ранней формы гипертрофической кардиомиопатии, глухоты, задержки умственного развития до легких клинических проявлений. Манифестация клинических признаков возможна в разном возрасте — от неонатального периода до взрослого. Лицевые дисморфии включают гипертелоризм, птоз, широкую плоскую переносицу, глубокие носогубные складки, толстые губы. Часто отмечаются низко расположенные диспластичные ушные раковины, короткая шея. У новорожденных и детей первого года жизни данные признаки могут быть нечетко выражены [5–7]. Рост пациентов при рождении, как правило, имеет средние значения. С возрастом отмечается замедление темпов роста, и у 85% взрослых пациентов он соответствует нижней границе нормы. Интеллект у значительной части пациентов сохранен, задержка психического развития обычно не грубая, встречается примерно у 10%. Характерным признаком синдрома является поражение кожных покровов в виде множественного лентиго, проявление которого начинается с 4–5-летнего возраста и значительно увеличивается в пубертатный период; преимущественная локализация пятен — кожа шеи и туловища. Часто выявляются пятна цвета «кофе с молоком», гиперпигментированные пятна, участки гипопигментации [5]. Скелетные аномалии представлены воронкообразной или килевидной деформацией грудной клетки (75%), реже встречаются сколиоз и гипермобильность суставов [6]. Нейросенсорную тугоухость имеют 15–25% пациентов, в большинстве случаев она выявляется в детском возрасте, но возможно ее формирование и у взрослых [4, 8, 9].

Со стороны сердечно-сосудистой системы при LS наиболее распространенной патологией является гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМ), как правило, асимметричная, с преимущественным поражением левого желудочка. Данная патология встречается у 60%

пациентов с LS и представляет серьезную проблему для жизни. На ЭКГ большинство пациентов имеют признаки гипертрофии левого желудочка (89%), реже гипертрофии правого желудочка (39%), и правого предсердия [10]. Также описаны характерные нарушения проводимости (удлиненный интервал PR, блокада ножек пучка Гиса, полная атриовентрикулярная блокада) и ритма (пароксизмальная предсердная тахикардия, фибрилляция предсердий). Стеноз легочной артерии в ранних публикациях описан в 40% случаев [4, 8], однако с накоплением числа наблюдений его частота оценивается как 10—20% [9, 10].

Пороки половой системы представлены гипоплазией половых органов, у мужчин крипторхизмом, гипоспадиями. У части пациентов при отсутствии пороков развития половых органов отмечается задержка полового развития. Аномалии почек встречаются редко [4, 6].

Трудности при установлении диагноза у детей связаны с тем, что некоторые ключевые признаки начинают проявляться в более старшем возрасте, а степень выраженности симптомов может быть минимальной. Дифференциальная диагностика проводится преимущественно внутри группы «нейро-кардио-лице-кожных» (NCFC) синдромов. В эту группу, кроме LS, также входят синдромы Нунан (NS, OMIM 163950), Нунан-нейрофиброматоз (NFNS, OMIM 601321), Костелло (CS, OMIM 218040), кардио-лице-кожный (CFCS, OMIM 115150). Фенотипические проявления этих заболеваний частично перекрываются, так как все они вызваны мутациями в различных компонентах RAS-MAPK сигнального пути.

Этиология

Синдром LEOPARD представляет собой генетически гетерогенное заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования. LS может возникнуть вследствие спорадической мутации (*de novo*), либо быть унаследован от одного из родителей, имеющих данное заболевание. В описанных семейных случаях отмечают преимущественное наследование по материнской линии, что, вероятнее всего, свидетельствует о снижении фертильности у мужчин [6, 9].

Около 85% пациентов с синдромом LEOPARD имеют мутации в гене *PTPN11*. Ген *PTPN11* (protein tyrosine phosphatase, 11) расположен на длинном плече хромосомы 12 в сегменте q24.1 (OMIM 176876), кодирует тирозинспецифическую протеинфосфатазу SHP2. Известно 11 различных миссенс-мутаций в экзонах 7, 12, 13 [11]. По данным литературы, мутации в экзоне 13 сопровождаются более тяжелыми кардиологическими проявлениями: быстро прогрессирующей тяжелой бивентрикулярной обструктивной ГКМ и серьезными сердечно-сосудистыми осложнениями (сердечной недостаточностью и внезапной смертью) [12]. Следующими по частоте встречаемости мутаций при LS являются гены *RAF1*

(расположен на хромосоме 3 в сегменте p25.2 (OMIM 164760) и *BRAF* (расположен на хромосоме 7 в сегменте q34 (OMIM 164757)). Молекулярно-генетическое тестирование трех генов позволяет выявить мутации примерно у 95% пациентов [11, 13]. Эти гены относятся к генам RAS-MAPK сигнального пути, который опосредует процессы, связанные с делением, ростом и дифференцировкой клеток. Предполагается участие других генов в возникновении LS, что расширит представление о генетической гетерогенности заболевания.

Цель работы: провести молекулярно-генетическое и клинко-генеалогическое обследование семьи с синдромом LEOPARD в трех поколениях и проанализировать внутрисемейный полиморфизм фенотипических признаков.

Материалы и методы

Объект исследования — семья с фенотипическими проявлениями LS в трёх поколениях (ребенок-пробанд, отец и дед пробанда). Отбор пациентов для проведения ДНК-диагностики проводился согласно клиническим диагностическим критериям для данной патологии.

Для проведения ДНК-диагностики в качестве биологического материала использовалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Образцы ДНК были протестированы на наличие точковых мутаций методом ресеквенирования кодирующей последовательности гена *PTPN11*. Для амплификации использовали праймеры, фланкирующие 15 экзонов и прилегающие участки интронов гена *PTPN11* [14].

Реакцию ресеквенирования выполняли наборами ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit по методике производителя. Для синтеза фрагмента ДНК использовали один из праймеров.

Результаты и обсуждение

Так как наибольшее количество мутаций (около 85%) у пациентов с синдромом LEOPARD идентифицировано в гене *PTPN11*, первым этапом диагностики является мутационный анализ данного гена. Существуют разные подходы к поиску мутаций: ресеквенирование кодирующей последовательности «горячих» экзонов гена *PTPN11* (экзоны 7, 12 и 13) или же ресеквенирование кодирующей последовательности всех 15 экзонов и прилегающих участков интронов гена.

Для определения мутаций в гене *PTPN11* проведено ресеквенирование кодирующей последовательности всех 15 экзонов и прилегающих участков интронов гена в 2 образцах ДНК (пробанд девочка в возрасте 4,5 лет и отец пробанда в возрасте 35 лет, доступные для обследования). Определение мутаций и полиморфизмов проводили исходя из зафиксированных на электрофореграмме изменений в последовательности пиков, соответству-

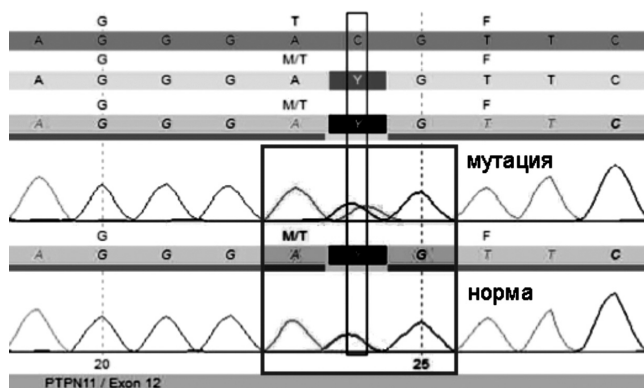


Рис. 1. Результаты секвенирования двенадцатого экзона гена *PTPN11*: квадратом выделено место нуклеотидной замены ACGATG (с.1403CT).

ющих определенному нуклеотиду в анализируемом фрагменте ДНК, и путем сравнения ресеквенированной нуклеотидной последовательности с референсной последовательностью соответствующего экзона.

В двенадцатом экзоне гена *PTPN11*, кодирующем РТР-домен, обнаружена ранее описанная нуклеотидная замена с.1403CT, соответствующая мутации Thr468Met, что отображено на рис. 1.

Аминокислота Thr 468 в нативном белке играет решающую роль в функции РТР-домена, необходимую для каталитической активности. Она расположена в консенсусной последовательности активного центра тирозин-специфической протеинфосфатазы, которая необходима для тирозин-фосфатазной активности. Кроме того, в нативном ферменте Thr 468 участвует в нескольких водородных связях по отношению к молекулам растворителя, таким образом, представляя стабилизирующую аминокислоту для белка. Метионин, введенный в это положение, может обуславливать общее изменение внутри белок-водородных сетей, изменяя внутренние структурные свойства каталитического центра [15]. Идентифицированная мутация является одной из двух наиболее часто встречающихся и определяет фенотипические проявления синдрома LEOPARD.

Приводим клиническое описание семейного наблюдения синдрома LEOPARD в трех поколениях. Родословная семьи представлена на рис. 2.

Пробанд (III.1) — девочка, родилась в сроке 38—39 недель с массой 3900 г, длиной тела 55 см. В возрасте 2 мес. при проведении ЭхоКГ, выполненной с целью уточнения природы систолического шума, выявлены умеренная гипертрофия межжелудочковой перегородки и клапанный стеноз легочной артерии легкой степени.) Ребенок впервые осмотрен генетиком в возрасте 3 лет 7 мес. по направлению детского кардиолога в связи с асимметричной формой прогрессирующей гипертрофической кардиомиопатии (гипертрофия межжелудочковой перегородки), нарушением проводимости.

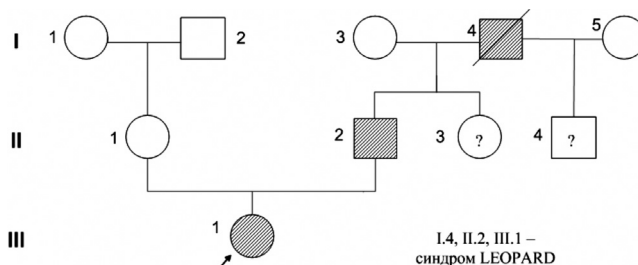


Рис. 2. Родословная семьи с синдромом LEOPARD в трёх поколениях.

У ребенка наблюдались характерные для LS признаки: лицевые дисморфии (легкий гипертелоризм, широкая переносица, низкорасположенные диспластичные ушные раковины), несколько лентигинозных пятен диаметром 1—2 мм на коже спины и рук. В возрасте 3 лет у ребенка диагностирована нейросенсорная тугоухость 1 степени слева. При проведении ЭКГ выявлено нарушение внутрижелудочковой проводимости в виде блокады правой ветви левой ножки пучка Гиса. На ЭхоКГ наблюдалась умеренная гипертрофия межжелудочковой перегородки, изменения структуры створок митрального клапана в виде их утолщения.

При осмотре отца пробанда (II.2): рост 176 см, нормальный интеллект, отмечались лицевые дисморфии — гипертелоризм, птоз, глубокие носогубные складки, низко расположенные, оттопыренные диспластичные ушные раковины с утолщенным завитком. Воронкообразная деформация грудной клетки сформировалась в подростковом возрасте. На коже определялись множественные лентиго светло- и темно-коричневого цвета с неправильными контурами размером от 1 до 5 мм, число которых значительно увеличилось в течение второй декады жизни, пятна «кофе с молоком» неправильной формы диаметром от 2 до 9 см в поясничной области, правом бедре и правой голени. По результатам ЭКГ выявлены изменения: блокада правой ветви левой ножки пучка Гиса, по данным ЭхоКГ: гипертрофия базального отдела межжелудочковой перегородки, формирующая обструкцию выходного отдела левого желудочка. При проведении аудиограммы патологии не выявлено.

Сходную клиническую симптоматику имел дед пробанда по линии отца (I.4). Данные медицинской документации: рост 160 см, воронкообразная деформация грудной клетки, на коже наблюдалось большое количество разнообразных пятен, двусторонняя нейросенсорная тугоухость 3 степени, умер в возрасте 50 лет от острой сердечной недостаточности. Вышеперечисленные

**Диагностические признаки синдрома LEOPARD
в представленном семейном наблюдении и по данным литературы**

	Пробанд, 4 года 6 мес.	Отец пробанда, 35 лет	*Дед пробанда	Данные литературы [4–10]
L — лентиго	+	+	+	90%
E — нарушения проводящей системы сердца	+	+	+	75%
O — гипертелоризм	+	+	н.и.	50%
P — стеноз легочной артерии	+	+, ГKM	+	10-20%
A — аномалии половых органов	—	—	—	50%
R — задержка роста	—	—	+	13-60%
D — нейросенсорная глухота	+	—	+	15-25%
Птоз	+	+	н.и.	50%
Дисморфичные ушные раковины	+	+	н.и.	87%
Пятна "кофе с молоком"	—	+	—	50%
Деформация грудной клетки	—	+	+	30-75%
Примечание. * Данные медицинской документации; н.и. — нет информации				

симптомы и семейный анамнез свидетельствуют о наличии у него LS.

Сибсы отца (II.3, II.4) генетиком осмотрены не были. В связи с наличием 50% риска заболевания и рождения больного потомства им рекомендовано проведение медико-генетического консультирования.

Спектр диагностических признаков, входящих в акроним, а также других клинически значимых при LS симптомов в представленном семейном наблюдении и по данным литературы отражен в таблице.

Заключение

LS имеет четкие клинические проявления, из которых ведущими симптомами являются лентигиноз и патология сердечно-сосудистой системы. Наблюдаемый клинический симптомокомплекс может варьировать от мягких лицевых дисморфий и лентиго у взрослых, до тяжелой формы ГKM, тугоухости и задержки умственного развития у детей с раннего возраста, даже в пределах одной семьи.

Представленное наблюдение демонстрирует возможность установления LS в раннем возрасте при унаследованной форме заболевания. Так как заболевание имеет аутосомно-доминантный тип наследования, и риск рождения ребенка с данной патологией в семье составляет 50%, медико-генетическое консультирование является важной составляющей медицинской помощи. Уточнение молекулярного дефекта позволяет верифицировать клинический диагноз и при последующих беременностях провести пренатальную ДНК-диагностику плода. Ранняя диагностика LS позволяет планировать диспансерное наблюдение пациентов с учетом патологических проявлений, тактику лечения и профилактику вторичных осложнений. Необходима тщательная оцен-

ка состояния сердечно-сосудистой системы в динамике, включая выполнение эхокардиографии (ЭхоКГ). Это связано с тем, что преимущественно изменения со стороны сердца влияют на продолжительность и качество жизни пациентов. Отсутствие ультразвуковых признаков ГKM в раннем детстве не исключает вероятность ее развития в старшем возрасте. Следует помнить также о возможной тугоухости — своевременная коррекция слуха играет важную роль в развитии и социальной адаптации ребенка.

Список литературы

1. Gorlin R.J., Anderson R.C., Blaw M. Multiple lentiginos syndrome // Am. J. Dis. Child. — 1969. — Vol. 117. — P. 652–662.
2. Gorlin R.J., Anderson R.C., Moller J.H. The Leopard (multiple lentiginos) syndrome revisited // Birth Defects Orig. Artic. Ser. — 1971. — Vol. 7, №4. — P. 110–115.
3. van der Burgt I. Noonan syndrome // Orphanet. J. Rare Dis. — 2007. — Vol. 2. — P. 1–6.
4. Voron D.A., Hatfield H.H., Kalkhoff R.K. Multiple lentiginos syndrome. Case report and review of the literature // Am. J. Med. — 1976. — Vol. 60. — P. 447–456.
5. Sarkozy A., Digilio M.C., Dallapiccola B. Leopard syndrome // Orphanet. J. Rare Dis. — 2008. — Vol. 3. — P. e13.
6. Digilio M.C., Sarkozy A., de Zorzi A., Pacileo G., Limongelli G. et al. Leopard syndrome: clinical diagnosis in the first year of life // Am. J. Med. Genet. — 2006. — Vol. 140. — P. 740–746.
7. Sarkozy A., Digilio M.C., Zampino G. et al. Leopard syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis // Monogr. Hum. Genet. — 2009. — Vol. 17. — P. 55–65.
8. Coppin B.D., Temple I.K. Multiple lentiginos syndrome (LEOPARD syndrome of progressive cardiomyopathic lentiginosis) // J. Med. Genet. — 1997. — Vol. 34. — P. 582–586.
9. Sarkozy A., Conti E., Digilio M.C., Marino B., Morini E. et al. Clinical and molecular analysis of 30 patients with multiple lentiginos LEOPARD syndrome // J. Med. Genet. — 2004. — Vol. 41. — P. e 68.

10. Limongelli G., Pacileo G., Marino B., Digilio M.C. et al. Prevalence and clinical significance of cardiovascular abnormalities in patients with the Leopard syndrome // *Am. J. Cardiol.* — 2007. — Vol. 100. — P. 736–741.

11. Martinez-Quintana E., Rodriguez-Gonzalez F. LEOPARD syndrome: clinical features and gene mutations // *Mol. Syndromol.* — 2012. — Vol. 3. — P. 145–157.

12. Digilio M.C., Sarkozy A., Pacileo G., Limongelli G. et al. PTPN11 gene mutations: linking the Gln510Glu mutation to the «LEOPARD syndrome phenotype» // *Eur. J. Pediatr.* — 2006. — Vol. 165. — P. 803–805.

13. Legius E., Schrandt-Stumpel C., Schollen E. et al. PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome // *J. Med. Genet.* — 2002. — Vol. 39. — P. 571–574.

14. Tartaglia M., Kalidas K., Shaw A., Song X., Musat D.L. et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity // *Am. J. Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 70. — P. 1555–1563.

15. Digilio M.C., Conti E., Sarkozy A., Minganelli R. et al. Grouping of Multiple-Lentigines/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene // *Am. J. Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 71. — P. 389–394.

Molecular genetic diagnostics of family case of LEOPARD syndrome in Belarus

Asadchuk T.V., Rumyantseva N.V., Zobikova O.L., Naumchik I.V.

National Center of Research and Applied Medicine «Mother and Child», Minsk, BELARUS

Syndrome LEOPARD (LS, OMIM 151100) — is a rare genetic disorder with autosomal dominant inheritance. The main symptoms of LS are lentiginosis and pathology of the cardiovascular system. The disease is characterized by marked clinical polymorphism from a severe form of hypertrophic cardiomyopathy, deafness, mental retardation to light clinical manifestations in the form of slight facial dysmorphism and lentigines. The present report demonstrates intrafamily variability of clinical manifestations of the syndrome as well as the possibility of establishing LS at an early age if the disease is inherited. The defined molecular defect is mutation Thr468Met in the gene *PTPN11* that allows to verify the clinical diagnosis and prenatal diagnosis of the fetal's DNA in subsequent pregnancies.

Key words: Syndrome LEOPARD, *PTPN11* gene, lentigines, hypertrophic cardiomyopathy

Участники Экспертного Совета обсудили задачи, стоящие перед Российским медицинским сообществом в области диагностики и лечения редкого наследственного заболевания — гипофосфатазии. Результатом работы Экспертного Совета явилась Резолюция.

Резолюция Экспертного Совета по оптимизации подходов к диагностике и лечению редкого наследственного заболевания — гипофосфатазии

по итогам заседания 21 апреля 2015 года, г. Москва

Цель: Улучшение диагностики и качества медицинской помощи больным гипофосфатазией в Российской Федерации, снижение показателей смертности и инвалидизации, улучшение качества жизни пациентов с гипофосфатазией. Разработка мер раннего доступа к патогенетической терапии пациентов, нуждающихся в терапии по жизненным показаниям.

Гипофосфатазия (ГФ) представляет собой прогрессирующее наследственное метаболическое заболевание, обусловленное дефицитом щелочной фосфатазы, который возникает из-за мутации в гене, кодирующем неспецифический тканевой изофермент щелочной фосфатазы. Дефицит активности щелочной фосфатазы ведёт к гипоминерализации, нарушениям со стороны костей скелета и полиорганным осложнениям. Начало заболевания возможно в любом возрасте, начиная с внутриутробного периода. Степень выраженности симптомов заболевания варьирует от умеренных (доброкачественная форма) до тяжёлых форм, приводящих к инвалидности во взрослом состоянии. Наиболее тяжёлые случаи наблюдаются при возникновении заболевания у плода и в младенчестве, и в таких ситуациях смертность может достигать 90—100%.

Классификация гипофосфатазии основывается на времени появления первых симптомов заболевания. Выделяют перинатальную (развитие симптомов внутриутробно или при рождении), младенческую (младше 6 мес.), детскую (6 мес. — 18 лет) и взрослую (старше 18 лет) формы. Отдельно выделяют одонтогипофосфатазию, при которой наблюдаются изолированные поражения зубов.

Отличительными чертами перинатальной и младенческих форм ГФ являются выраженная гипоминерализация и рахитоподобная деформация скелета, развитие лёгочной недостаточности и В6-зависимых судорог. В дальнейшем у таких пациентов отмечается сниженный тонус мышц, вялое сосание, задержка роста, плохая прибавка массы тела, рахит, нефрокальциноз. Для дет-

ской формы характерны поражение скелета, низкий рост, переломы, боли в костях и мышцах, непрогрессирующая миопатия, скованность суставов, задержка начала ходьбы и утиная походка, ранняя потеря молочных зубов. Для взрослой формы характерны многократные плохо заживающие переломы, нередко требующие хирургического вмешательства. Преимущественно поражаются нижние конечности, возникает укорочение и искривление длинных трубчатых костей, походка больных нарушена, рост снижен. Нередко обнаруживаются хондрокальциноз, псевдоподагра и артропатии, сопровождающиеся сильной болью и приводящие к нарушению трудоспособности.

Диагноз гипофосфатазии может быть заподозрен у любого пациента, при выявлении снижения уровня щелочной фосфатазы на фоне клинической картины рахитоподобного заболевания. Ключевым дифференцирующим признаком заболевания является низкая активность щелочной фосфатазы и высокий уровень пиродоксальфосфата (активной формы витамина В6). Важно отметить, что, поскольку нормальные значения уровня щелочной фосфатазы зависят от пола и возраста, интерпретация результатов обязательно должна учитывать эти показатели.

Несмотря на чёткие диагностические критерии, скелетные поражения при гипофосфатазии напоминают другие заболевания, протекающие с рахитом и/или остеомаляцией, в связи с чем таким пациентам нередко ставится ошибочный диагноз. Во избежание подобных ошибок, при подозрении на гипофосфатемический рахит, рахит вследствие дефицита витамина D, почечную остеодистрофию, черепно-ключичную дисплазию и идиопатический ювенильный остеопороз необходимо проводить дифференциальный диагноз с гипофосфатазией.

На сегодняшний день единственной патогенетической терапией гипофосфатазии является фермент-заместительная терапия асфотазой альфа — специфичной

рекомбинантной щелочной фосфатазой, при использовании которой в международных клинических исследованиях было продемонстрировано улучшение метаболических показателей (уровни субстратов щелочной фосфатазы), значительное улучшение рентгенологической картины, а так же минерализации костей и опорно-двигательной функции и у пациентов. В связи с тем, что на данный момент асфотаза альфа ещё не зарегистрирована в России, доступ российских пациентов к препарату ограничен.

С учётом вышеизложенного Эксперты считают необходимым рекомендовать следующие меры, направленные на улучшение качества медицинской помощи больным гипофосфатазией в Российской Федерации, снижение показателей смертности и инвалидизации, улучшение качества жизни данных пациентов:

1. Для повышения осведомлённости врачей различных специальностей и улучшения выявляемости пациентов с гипофосфатазией необходимо разработать образовательную программу для врачей по теме: «Системные заболеваниями скелета связанные с нарушениями кальций-фосфорного обмена».

2. Рекомендовать главным специалистам по профилям: ортопедия, неонатология, эндокринология, педиатрия внести в стандарты диагностики и оказания медицинской помощи обязательное определение уровня щелочной фосфатазы всем пациентам с заболеваниями, включающими системное поражение скелета (скелетные деформации, задержка роста, преждевременное выпадение зубов). В неонатальном периоде необходимо проводить исследование щелочной фосфатазы в случае развития клинической картины, включающей генерализованные судороги в сочетании с дыхательной недостаточностью и системными скелетными изменениями.

3. В случае сочетания клиники рахитоподобного заболевания и снижения показателя щелочной фосфатазы необходимо проводить исследование уровня пиродоксаль 5-фосфата, и генетическое исследование на мутации в гене *ALPL*. При возможности исследуется уровень фосфоэтаноламина в моче.

4. «Для унификации интерпретации результатов диагностических исследований активности щелочной фос-

фатазы необходимо разработать клинические рекомендации по лабораторной диагностике гипофосфатазии с установлением референсных значений щелочной фосфатазы в зависимости от пола и возраста пациента»

5. При наличии жизненных показаний у пациентов с клиническими и лабораторными проявлениями гипофосфатазии, с целью снижения смертности и предотвращения развития тяжёлых осложнений, должна быть рассмотрена возможность проведения им ферментозаместительной терапии препаратом асфотаза альфа в рамках существующих программ раннего доступа к препарату.

6. Для обеспечения координационной, методической и образовательной деятельности в области диагностики, дифференциальной диагностики и лечения гипофосфатазии, предлагается рассмотреть возможность создания и регулярной работы уполномоченного экспертного совета.

Резолюция, принятая участниками совета экспертов, будет опубликована в журналах _____ на сайтах _____ и направлена в региональные органы здравоохранения и профильным специалистам.

Куцев Сергей Иванович
 Петеркова Валентина Александровна
 Новиков Петр Васильевич
 Захарова Екатерина Юрьевна
 Тюльпаков Анатолий Николаевич
 Кочетов Анатолий Глебович
 Родионова Светлана Семеновна
 Белова Наталья Александровна
 Виссарионов Сергей Валентинович
 Петрайкина Елена Ефимовна
 Калинин Наталья Юрьевна
 Михайлова Светлана Витальевна
 Цыгин Алексей Николаевич
 Сухоруков Владимир Сергеевич
 Печатникова Наталья Леонидовна
 Рябых Сергей Олегович
 Демикова Наталья Сергеевна