

Главный редактор
ГИНТЕР Е.К.
 академик РАМН
 Ответственный секретарь
 редакции
ИЖЕВСКАЯ В.Л.
 д.м.н.
 Редакционная коллегия
БАРАНОВ В.С.
 чл.-корр. РАМН
ДУРНЕВ А.Д.
 чл.-корр. РАМН
ИЛЛАРИОШКИН С.Н.
 д.м.н., профессор
КОЗЛОВА С.И.
 д.м.н., профессор
ЛИМБОРСКАЯ С.А.
 д.б.н., профессор
МИХАЙЛОВА Л.К.
 д.м.н., профессор
НАЗАРЕНКО Л.П.
 д.м.н., профессор
НОВИКОВ П.В.
 д.м.н., профессор
ПУЗЫРЕВ В.П.
 академик РАМН
РУБЦОВ Н.Б.
 д.б.н., профессор
ХУСНУТДИНОВА Э.К.
 д.б.н., профессор

Редакционный совет
АРЧАКОВ А.И.
 академик РАМН
БАРАНОВ А.А.
 академик РАМН
КОПНИН Б.П.
 д.б.н., профессор
ЛАЗЮК Г.И.
 чл.-корр. РАМН
СВЕРДЛОВ Е.Д.
 академик РАН
СЕРЕДЕНИН С.Б.
 академик РАМН
СМИРНОВ В.Н.
 чл.-корр. РАН, академик РАМН
ЧУЧАЛИН А.Г.
 академик РАМН

Издатель: Издательство «Гениус Медиа»
 ИРИШКИН Андрей Александрович
 Председатель Совета директоров
 ИРИШКИН Дмитрий Андреевич
 Генеральный директор
 ЛУКАШЕВИЧ Ирина Александровна
 Литературная редакция
 КОМАРОВА Анна Константиновна
 Дизайн и верстка
 ШЕВЧУК Ольга Анатольевна
 Распространение и подписка
 СКВОРЦОВ Владимир Владимирович
 Предпечатная подготовка

Адреса редакции:
 1. 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1, Федеральное государственное бюджетное учреждение Медико-генетический научный центр РАМН
 Тел. (499) 612-81-07, факс: 324-07-02
 2. 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8.
 Тел. (495) 518-14-51, 601-23-74.
 E-mail: genius-media@mail.ru

Вниманию 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
 © Издательство «Гениус Медиа»

Тираж 200 экз.

Медицинская ГЕНЕТИКА

Ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал

2013 г. Том 12. №4 (130)

СОДЕРЖАНИЕ

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

- Азимова Ю.Э., Климов Е.А., Скоробогатых К.В., Сергеев А.В., Кокаева З.Г., Табеева Г.Р.**
 Генетические основы гемиплегической мигрени3
- Степанов В.А., Канделария П., Кхо С., Жанг Г., Трифонова Е.А., Симонова К.В., Бочарова А.В., Лайнг И.А., Хайден К., Баккер В., Бьеррегаард П., Линч Н., Хагель И., Маск А.У., Битлз А., Голдблатт Дж., Ле Сёф П.**
 Деканализация иммунного ответа при расселении современного человека: связь генетического разнообразия в генах иммунной системы с климато-географическими факторами8

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Курбатова И.В., Топчиева Л.В., Корнева В.А., Коломейчук С.Н., Немова Н.Н.**
 Экспрессия генов циркадного ритма *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в клетках буккального эпителия у больных эссенциальной артериальной гипертензией.....19
- Бабушкина Н.П., Кучер А.Н., Лебедев И.Н., Васильев С.А., Тимошевский В.А., Брагина Е.Ю., Суханова Н.Н., Торхова Н.Б., Яковлева Ю.С.**
 Ассоциации полиморфных вариантов генов репарации ДНК и метаболизма ксенобиотиков с уровнем хромосомных нарушений в лимфоцитах человека27
- Лысогорская Е.В., Абрамычева Н.Ю., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н.**
 Частота мутаций в гене *SOD1* у российских пациентов с боковым амиотрофическим склерозом.....32

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

- Степанов В.А., Трифонова Е.А., Симонова К.В., Чередниченко А.А.**
 Вариабельность генов интерлейкина 4 и его рецептора в популяциях коренных народов Сибири38

Editor-in-Chief
GINTER E.K.

Secretary
IZHEVSKAYA V.L.

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

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

Publisher: Genius Media Ltd, Moscow

IRISHKIN A.A.
Chairman of the Board

IRISHKIN D.A.
CEO

LUKASHEVICH I.A.
Text editor

KOMAROVA A.K.
Technical editor

SHEVCHUK O.A.
Distribution and subscribe

SKVORTSOV V.V.
Prepress

Medical GENETICS

Monthly reviewed scientific and practical journal

2013. Volume 12. №4 (130)

Content

REVIEWS

*Azimova J.E., Klimov E.A., Skorobogatykh K.V.,
Sergeev A.V., Kokaeva Z.G., Tabeeva G.R.*
Hemiplegic migraine.....3

*Stepanov V.A., Candelaria P., Khoo S., Zhang G.,
Trifonova E.A., Simonova K.V., Bocharova A.V., Laing I.A.,
Hayden C., Backer V., Bjerregaard P., Lynch N., Hagel I.,
Musk A.W., Bittles A., Goldblatt J., Le Souef P.*
Decanalization of immune response
during the dispersion of modern humans:
the relationships of genetic diversity in immune system genes
and climatic and geographic factors.....8

ARTICLES

*Kurbatova I.V., Topchieva L.V., Korneva V.A.,
Kolomeichuk S.N., Nemova N.N.*
Expression of circadian genes *CLOCK*, *BMAL1* and *PER1*
in buccal cells of donors with essential hypertension19

*Babushkina N.P., Kucher A.N., Lebedev I.N.,
Vasilyev S.A., Timoshevsky V.A., Bragina E.Yu.,
Sukhanova N.N., Torkhova N.B., Yakovleva Yu.S.*
Associations between polymorphic variants of DNA repair
and metabolism of xenobiotics genes
and chromosome aberration level
in human lymphocytes27

*Lysogorskaia E.V., Abramychева N.Iu.,
Zakharova M.N., Illarionov S.N.*
Frequency of mutations in the *SOD1* gene
in Russian patients with amyotrophic lateral sclerosis32

BRIEF REPORT

Stepanov V.A., Trifonova E.A., Simonova K.V., Cherednichenko A.A.
Variability of interleukin 4 and its receptor genes
in native populations of Siberia.....38

Генетические основы гемиплегической мигрени

Азимова Ю.Э.^{1,2}, Климов Е.А.³, Скоробогатых К.В.^{1,2},
Сергеев А.В.^{1,2}, Кокаева З.Г.³, Табеева Г.Р.^{1,2}

¹ — Лаборатория неврологии и клинической нейрофизиологии НИЦ Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

² — Университетская клиника головной боли, Москва, Россия

³ — Кафедра генетики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Семейная гемиплегическая мигрень — единственный тип мигрени с хорошо изученным молекулярно-генетическим механизмом. Это достаточно редкое неврологическое заболевание человека, описанное всего в 200 семьях во всем мире и единично встречающееся в спорадических формах. Однако понимание молекулярных механизмов гемиплегической мигрени расширяют наши представления об этиологии классической мигрени. В настоящем обзоре представлена имеющаяся на сегодняшний день информация о генетической основе гемиплегической мигрени, её клинической картине, дан краткий обзор подходов к лечению.

Ключевые слова: гемиплегическая мигрень, семейная гемиплегическая мигрень, мутации

Введение

Мигрень характеризуется клинической и этиологической гетерогенностью. Семейная гемиплегическая мигрень (СГМ) — редкая, тяжёлая форма мигрени с аурой с моногенным типом наследования, характеризующаяся развитием мышечной слабости различной выраженности во время ауры. Обратимый моторный дефицит при мигрени впервые описан J.M. Clarke [10] в 1910 г., а современное название и детальное описание СГМ было дано в 1953 г. C.W.M. Whitty [55]. Последующий анализ клинических случаев показал, что в семьях с СГМ отмечается аутосомно-доминантный тип наследования заболевания [6, 21, 25]. Эти наблюдения послужили основой активного поиска молекулярно-генетических основ развития СГМ, и в 90-х годах был обнаружен ген СГМ I типа, расположенный на хромосоме 19 [28], а затем еще два гена, регулирующих ионный транспорт и ответственных за развитие второго и третьего типов СГМ [11, 16], в настоящий момент выделяют и СГМ IV. В Международной классификации головных болей-2 (МКГБ-2) [1] представлены критерии СГМ и спорадической гемиплегической мигрени (таблица). Основным отличием этих двух форм является наличие (в случае с СГМ) по крайней мере, одного родственника первой или второй степени родства с аналогичной аурой, включающую преходящую мышечную слабость, тогда как при спорадической гемиплегической мигрени семейный анамнез отрицательный. В МКГБ-2 типы СГМ не выделены.

Распространённость СГМ чрезвычайно низка. Около 200 семей во всем мире страдают СГМ, и в литературе имеются данные еще около 200 пациентов со спорадической гемиплегической мигренью. Единственное популяционное исследование СГМ, проведённое в Дании, показало распространённость семейных форм, равную 0,003%, и спорадических форм, составляющую 0,002% [45, 47].

Клиническая картина

СГМ характеризуется развитием мышечной слабости (пареза) во время ауры. Продолжительность моторного дефицита может варьировать от нескольких минут до нескольких часов и даже дней. Большинство больных СГМ испытывает также приступы обычной мигрени [12, 23, 27, 41, 47, 49, 50]. Частота атак при СГМ чрезвычайно вариабельна и может колебаться от одного приступа в сутки до пяти за всю жизнь при первом типе. Двигательные симптомы всегда сопровождаются хотя бы одним симптомом ауры, наиболее часто — это чувствительные нарушения. Различные симптомы ауры развиваются медленно, в течение 20—30 мин, и возникают последовательно, как правило, в следующем порядке: зрительные — чувствительные — двигательные — речевые — базиллярные [41, 47, 48]. В отличие от МА при гемиплегической мигрени чаще вовлекается лицо, язык, стопа, нога и туловище [41, 47]. Согласно критериям МКГБ-2 продолжительность двигательных нарушений не должна превышать 24 ч, однако у 20% пациентов с СГМ I и II типов слабость может сохраняться в течение 2—3 суток, и существуют описания случаев, когда симптомы сохранялись на протяжении 4 недель [43]. Головная боль присутствует в каждом приступе у большинства пациентов (95%) [47]. Характеристики головной боли соответствуют типичному приступу мигрени без ауры. У пациентов с гемиплегической мигренью могут отмечаться и другие неврологические нарушения — как пароксизмальные, так и перманентные: тяжёлые приступы с развитием нарушения сознания, лихорадки, менингеальных симптомов, эпилептические приступы, галлюцинации, нарушения координации, задержка умственного развития [17, 19, 24, 35, 41, 54].

Гемиплегическая мигрень является противопоказанием к назначению специфических средств для купирования мигрени — триптанов, препаратов эрготамина и дигидроэрготамина [4, 41]. Все препараты для профи-

лактики распространённых форм мигрени могут быть использованы при гемиплегической мигрени. Обсуждается эффективность таких препаратов, как верапамил, ламотриджин, ацетазоламид [5, 26, 30, 34, 41].

Генетика семейной гемиплегической мигрени

В основе развития СГМ лежат мутации кодирующие ионные транспортеры генов *CACNA1A*, *ATP1A2* и *SCN1A*, что отражает генетическую гетерогенность СГМ.

Ген *CACNA1A* кодирует основную субъединицу высокопороговых вольтаж-зависимых нейрональных кальциевых каналов (Cav2.1), и его мутации вызывают развитие СГМ I типа (ОМIM: 141500). Основной функцией Cav2.1 является модуляция выхода преимущественно возбуждающих нейротрансмиттеров, как в нервно-мышечном синапсе, так и в центральных синапсах, в основном в мозжечке, стволе и коре мозга [9]. В настоящее время выявлено более 60 мутаций этого гена, которые могут проявляться различными фенотипическими вариантами — чистыми формами СГМ, сочетанием СГМ с мозжечковой атаксией различной степени выраженности или фатальной комой, связанной с тяжёлым отёком мозга [12, 39]. Мутации гена *CACNA1A* вызывают также развитие заболеваний, не связанных с СГМ — эпизодической атаксии 2-го типа [37], прогрессирующей атаксии [57], спиноцеребеллярной атаксии 6-го типа [58] и различных форм эпилепсии [29]. Развитие СГМ I типа обусловлено в основном миссенс-мутациями гена *CACNA1A* (50—75% семей) [13]. У 40% семей с СГМ I типа выявляется мутация, приводящая к аминокислотной замене Thr666Met (далее будут указываться положения замены в аминокислотной последовательности) [16]. Мутация Arg192Gln вызывает развитие «чистой» гемиплегической мигрени, а Ser218Leu — злокачественной формы с возникновением приступов ге-

миплегической мигрени в ответ на минимальную травму головы, которые часто осложняются глубокой комой [38]. Если гомозиготы Arg192Gln могут быть клинически здоровы, то гомозиготы Ser218Leu характеризуются наличием атаксии и у них высок риск внезапной смерти, обусловленной тяжёлыми эпилептическими приступами и отеком мозга [38, 53].

На клеточных моделях было показано, что различные мутации в гене *CACNA1A* вызывают разные варианты каналопатии: нарушение проводимости ионного канала, изменение его кинетики или структуры [8], что приводит к усилению тока ионов кальция через вольтажзависимые каналы. Изменённые кальциевые каналы открываются под воздействием меньшего уровня электрического напряжения по сравнению с диким типом, и ток ионов внутрь клетки происходит после меньшей степени деполяризации [38]. Более того, такие каналы дольше остаются открытыми по сравнению с диким типом. Наибольшая выраженность этих изменений отмечается при мутации Ser218Leu, характеризующейся наиболее тяжёлым клиническим фенотипом и является фактором риска развития тяжёлых атак с нарушением сознания [44]. Эти патофизиологические изменения и лежат в основе развития распространяющейся корковой депрессии (РКД), предположительно основного механизма инициации мигренозного приступа. В эксперименте с трансгенными мышами, несущими ген *CACNA1A* человека с мутацией Arg192Gln, было показано снижение порога развития РКД, а также повышение выделения глутамата при сохранности ингибирующего влияния ГАМК, что может обуславливать гиперовозбудимость нейронов, возникновение и распространение РКД [53]. Предполагается, что вызванное триггерами повышение уровня калия, на пресинаптическом уровне приводит к деполяризации мембраны и активации Cav2.1 каналов, что ведет к деполяризации постсинаптической мембраны и снижает блокаду NMDA-рецепто-

Таблица

Диагностические критерии СГМ

A.	По меньшей мере два приступа, отвечающие критериям B и C
B.	Аура включает полностью обратимую мышечную слабость и по меньшей мере один из перечисленных ниже симптомов: 1. Полностью обратимые зрительные симптомы, в том числе позитивные (мерцающие пятна и полосы) и/или негативные (выпадение полей зрения) 2. Полностью обратимые чувствительные симптомы, в том числе позитивные (ощущение покалывания) и/или негативные (онемение) 3. Полностью обратимые нарушения речи
C.	По меньшей мере два симптома из нижеперечисленных: 1. Как минимум один симптом ауры постепенно развивается на протяжении пяти и более минут и/или различные симптомы ауры возникают последовательно на протяжении пяти минут и более 2. Каждый симптом имеет продолжительность пять и более минут, но не больше 60 мин 3. Головная боль, соответствующая критериям B-D мигрени без ауры (1.1), начинается во время ауры или в течение 60 мин после её начала
D.	По меньшей мере у одного родственника первой или второй степени родства имеются приступы, соответствующие критериям СГМ A-E
E.	Не связана с другими причинами

ров ионами магния. Выделение глутамата приводит к еще большей деполяризации постсинаптической мембраны и еще большему повышению ионов калия в межклеточном пространстве и таким образом возникает порочный круг. В норме существуют механизмы, позволяющие регулировать уровень межклеточного калия, в частности поглощение ионов K^+ клетками глии, тогда как при СГМ I типа отмечается недостаточность этого механизма. Также существуют доказательства, что Cav2.1 каналы играют также немаловажную роль в развитии центральной сенситизации [32]. Этот тип каналов обнаружен в нейронах околосинаптического серого вещества и вентромедиальных отделах продолговатого мозга, регулирующих проведение болевого импульса по тригеминальному пути [52]. Более того, было показано, что Cav2.1 каналы участвуют в регуляции выхода нейротрансмиттеров в периваскулярных окончаниях менингеальных афферентов [2].

Ген *ATPIA2* кодирует $\alpha 2$ субъединицу глиальной и нейрональной K^+/Na^+ -АТФазы, и мутации в этом гене приводят к развитию СГМ II типа (OMIM: 602481). Сейчас описано более 60 мутаций данного гена, в основном делеции и сдвиг рамки считывания. Мутации гена *ATPIA2* также обнаружены в семьях с базиллярной мигренью и в двух семьях с мигренью без ауры [3, 51]. Снижение активности K^+/Na^+ -АТФазы приводит к нарушению обратного захвата клетками глии ионов калия и глутамата из синаптической щели, что приводит к медленному восстановлению нейрональной активности после возбуждения. Наиболее тяжёлый клинический фенотип отмечаются при мутациях Leu764Pro, Trp887Arg, Gly615Arg, характеризующихся полным исключением активности K^+/Na^+ -АТФазы [11]. При мутации Thr345Ala, вызывающей частичное снижение активности K^+/Na^+ -АТФазы, отмечается уменьшение аффинитета к межклеточному калию, более медленному току ионов K^+ из межклеточного пространства и более медленному восстановлению нейрона после возбуждения [42]. При мутациях Met731Thr и Arg689Gln снижается каталитический оборот, что также приводит к накоплению калия в межклеточном пространстве [38]. Получены мыши с нокаутом по гену *Atp1a2*, для которых показаны другие неврологические нарушения, включая тревогу, страх, нарушения обучения и двигательных функций [22].

Ген *SCN1A*, мутации в котором приводят к развитию СГМ III типа, кодирует структуру $\alpha 1$ -субъединицы формирующей пору вольтажзависимых натриевых каналов (Nav1.1) (OMIM: 609634). Этот тип ионных каналов представлен преимущественно в теле и проксимальной части дендритов ингибирующих вставочных нейронов [56]. Подобное специфическое расположение Nav1.1-каналов играет ключевую роль в развитии гипервозбудимости дендритов, важнейшего компонента синаптической передачи. На сегодняшний день обнаружено 5 мутаций этого гена в пяти семьях [41]. Мутация

Gln1489Lys приводит к ускорению восстановления после быстрой блокады Nav1.1-каналов, что вызывает повышение нейрональной возбудимости [15].

СГМ тип IV (OMIM: 607516). В ходе выявления групп сцепления, ассоциированных с СГМ, выявлен локус 1q31 [31]. Практически в той же группе сцепления (1q23.2) находится ген *ATPIA2* — СГМ II. Между тем в районе 1q25-q31 картирован ген *CACNA1E*, кодирующий основную субъединицу промежуточнопороговых вольтажзависимых нейрональных кальциевых каналов (Cav2.3). Данный тип каналов обнаружен в гранулярных клетках мозжечка и других нейронах. Его функции идентичны функции Cav2.1 — СГМ I. Пока остаётся неясным — обнаружена 1 группа сцепления (тогда речь должна идти о гене *ATPIA2*) или это 2 группы сцепления (*ATPIA2* и *CACNA1E*). Ответ на этот вопрос может дать либо более детальное картирование СГМ с неясной генетической причиной, либо молекулярно-генетический анализ гена *CACNA1E* у таких пациентов.

Эпилептические приступы описаны в 60 семьях пациентов с СГМ и со спорадическими случаями мутаций в генах *CACNA1A*, *ATPIA2* и *SCN1A* [41].

Существуют и другие генетические варианты СГМ пока не выделенные в отдельные типы:

- так, у мальчика с «чистой» гемиплегической мигренью была обнаружена мутация гена *SLC1A3*, кодирующего аминокислотную последовательность глиального переносчика глутамата *EAAT1* [20]. При мутации этого гена нарушается захват глутамата астроцитами;

- гомозиготная делеция гена *SLC4A4*, кодирующего котранспортер электрогенного бикарбоната натрия ($Na^+-HCO_3^-$) NBCe1 обнаружена у двух сестёр с гемиплегической мигренью, почечным тубулярным ацидозом и патологией глаз [14];

- мутации в гене *PRR2*, участвующего в регуляции активности белкового комплекса SNAP-25, также приводят к развитию гемиплегической мигрени, а также других пароксизмальных расстройств — пароксизмальной дискинезии, инфантильные судороги, пароксизмальный тортиколиз, эпизодическая атаксия [33]. Функция белкового комплекса SNAP-25 заключается в транспорте везикул с медиатором (например, с глутаматом, кальцитонин ген-родственным пептидом и др.) к синаптической щели, а предположительный механизм противомигренозного действия препаратов ботулинического токсина связан с блокадой белка SNAP-25.

Спорадическая гемиплегическая мигрень вызвана мутациями *de novo* или наследованием патологических аллелей от родителя с асимптомной СГМ [40], однако идентифицировать мутацию удастся менее чем у 20% пациентов [13]. Большинство спорадических случаев с мутациями *CACNA1A* и *ATPIA2* характеризуется тяжёлым течением и наличием других неврологических симптомов. 76% пациентов с мутацией *ATPIA2 de novo* характеризуются ранним началом заболевания.

Закключение

Генетическое тестирование в наибольшей степени показано пациентам с ранним началом спорадической гемиплегической мигрени. Согласно рекомендациям Европейской федерации неврологических сообществ [7] генетическое тестирование на выявление наиболее часто встречающихся мутаций гена *CACNA1A* может использоваться для дифференциальной диагностики СГМ, но не является обязательным методом.

Список литературы

1. Международная классификация головных болей. 2-е изд-е (полная русскоязычная версия). — 2006. — 380 с.
2. Akerman S., Williamson D.J., Goadsby P.J. Voltage-dependent calcium channels are involved in neurogenic dural vasodilatation via a presynaptic transmitter release mechanism // *Br. J. Pharmacol.* — 2003. — Vol. 140. — P. 558–566.
3. Ambrosini A., D'Onofrio M., Grieco G.S. et al. Familial basilar migraine associated with a new mutation in the ATP1A2 gene // *Neurology.* — 2005. — Vol. 65. — P. 1826–1828.
4. Arto V., Nissila M., Wessman M. et al. Treatment of hemiplegic migraine with triptans // *Eur. J. Neurol.* — 2007. — Vol. 14. — P. 1053–1056.
5. Athwal B.S., Lennox G.G. Acetazolamide responsiveness in familial hemiplegic migraine // *Ann. Neurol.* — 1996. — Vol. 40. — P. 820–821.
6. Bradshaw P., Parsons M. Hemiplegic migraine, a clinical study // *Q. J. Med.* — 1965. — Vol. 34. — P. 65–85.
7. Burgunder A.J.-M., Finsterer J., Szolnoki Z. et al. EFNS guidelines on the molecular diagnosis of channelopathies, epilepsies, migraine, stroke, and dementias // *European Journal of Neurology.* — 2010. — Vol. 17. — P. 641–648.
8. Cao Y.Q., Piedras-Renteria E.S., Smith G.B. et al. Presynaptic Ca^{2+} channels compete for channel type-preferring slots in altered neurotransmission arising from Ca^{2+} channelopathy // *Neuron.* — 2004. — Vol. 43. — P. 387–400.
9. Catterall W.A. Structure and function of neuronal Ca^{2+} channels and their role in neurotransmitter release // *Cell Calcium.* — 1998. — Vol. 24. — P. 307–323.
10. Clarke J.M. On recurrent motor paralysis in migraine. With report of a family in which recurrent hemiplegia accompanied the attacks // *BMJ.* — 1910. — Vol. 1. — P. 1534–1538.
11. De Fusco M., Marconi R., Silvestri L. et al. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na^{+}/K^{+} pump alpha 2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2 // *Nat. Genet.* — 2003. — Vol. 33. — P. 192–196.
12. de Vries B., Freilinger T., Vanmolkot K.R. et al. Systematic analysis of three FHM genes in 39 sporadic patients with hemiplegic migraine // *Neurology.* — 2007. — Vol. 69. — P. 2170–2176.
13. de Vries B., Haan J., Frants R.R. et al. Genetic biomarkers for migraine // *Headache.* — 2006. — Vol. 46. — P. 1059–1068.
14. de Vries B., Mamsa H., Stam A.H. et al. Episodic ataxia associated with EAAT1 mutation C186S affecting glutamate reuptake // *Arch. Neurol.* — 2009. — Vol. 66. — P. 97–101.
15. Dichgans M., Freilinger T., Eckstein G. et al. Mutations in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine // *Lancet.* — 2005. — Vol. 336. — P. 371–377.
16. Ducros A., Diener C., Joutel A. et al. Recurrence of the T666M calcium channel CACNA1A gene mutation in familial hemiplegic migraine // *Am. J. Hum. Genet.* — 1999. — Vol. 64. — P. 89–98.

17. Elliott M.A., Peroutka S.J., Welch S., May E.F. Familial hemiplegic migraine, nystagmus, and cerebellar atrophy // *Ann. Neurol.* — 1996. — Vol. 39. — P. 100–106.
18. Eriksen M.K., Thomsen L.L., Andersen I. et al. Clinical characteristics of 362 patients with familial migraine with aura // *Cephalalgia.* — 2004. — Vol. 24. — P. 564–575.
19. Fitzsimons R.B., Wolfenden W.H. Migraine coma. Meningitic migraine with cerebral oedema associated with a new form of autosomal dominant cerebellar ataxia // *Brain.* — 1985. — Vol. 108. — P. 555–577.
20. Freilinger T., Koch J., Dichgans M. et al. A novel mutation in SLC1A3 associated with pure hemiplegic migraine // *J. Headache Pain.* — 2010. — Vol. 11. — P. 90.
21. Glista G.G., Mellinger J.F., Rooke E.D. Familial hemiplegic migraine // *Mayo Clin. Proc.* — 1975. — Vol. 50. — P. 307–311.
22. Gritz S.M., Radcliffe R.A. Genetic effects of ATP1A2 in familial hemiplegic migraine type II and animal models // *Hum. Genomics.* — 2013. — 7(1). — 8.
23. Hansen J.M., Thomsen L.L., Olesen J., Ashina M. Coexisting typical migraine in familial hemiplegic migraine // *Neurology.* — 2010. — Vol. 74. — P. 594–600.
24. Hayashi R., Tachikawa H., Watanabe R. et al. Familial hemiplegic migraine with irreversible brain damage // *Intern. Med.* — 1998. — Vol. 37. — P. 166–168.
25. Heyck H. Varieties of hemiplegic migraine // *Headache.* — 1973. — Vol. 12. — P. 135–142.
26. Hsu D.A., Stafstrom C.E., Rowley H.A. et al. Hemiplegic migraine: hyperperfusion and abortive therapy with intravenous verapamil // *Brain Dev.* — 2008. — Vol. 30. — P. 86–90.
27. Jensen T.S., de Fine Olivarius B., Kraft M., Hansen H.J. Familial hemiplegic migraine — a reappraisal and a long-term follow-up study // *Cephalalgia.* — 1981. — Vol. 1. — P. 33–39.
28. Joutel A., Bousser M.G., Biouesse V. et al. A gene for familial hemiplegic migraine maps to chromosome 19 // *Nat. Genet.* — 1993. — Vol. 5. — P. 40–45.
29. Jouvenceau A., Eunson L.H., Spauschus A. et al. Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel // *Lancet.* — 2001. — Vol. 358. — P. 801–807.
30. Lampl C., Katsarava Z., Diener H.C., Limmroth V. Lamotrigine reduces migraine aura and migraine attacks in patients with migraine with aura // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* — 2005. — Vol. 76. — P. 1730–1732.
31. Lea R.A., Shepherd A.G., Curtain R.P. et al. A typical migraine susceptibility region localizes to chromosome 1q31 // *Neurogenetics.* — 2002. — Vol. 4. — P. 17–22.
32. Luvisetto S., Marinelli S., Panasiti M.S. et al. Pain sensitivity in mice lacking the *cav2.1a1* subunit of P/Q-type Ca^{2+} channels // *Neuroscience.* — 2006. — Vol. 142. — P. 823–832.
33. Meneret A., Gaubert C., Riant F. et al. PRRT2 mutations and paroxysmal disorders // *Eur. J. Neurol.* — 2013.
34. Mjaset C., Russell M.B. Intravenous nimodipine worsening prolonged attack of familial hemiplegic migraine // *J. Headache Pain.* — 2008. — Vol. 9. — P. 381–384.
35. Neligan P., Harriman D.G., Pearce J. Respiratory arrest in familial hemiplegic migraine: a clinical and neuropathological study // *Br. Med. J.* — 1977. — Vol. 2. — P. 732–734.
36. Olesen J., Friberg L., Olsen T.S. et al. Timing and topography of cerebral blood flow, aura, and headache during migraine attacks // *Ann. Neurol.* — 1990. — Vol. 28. — P. 791–798.
37. Ophoff R.A., Terwindt G.M., Vergouwe M.N. et al. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca^{2+} channel gene CACNL1A4 // *Cell.* — 1996. — Vol. 87. — P. 543–552.
38. Pietrobon D. Biological science of headache channels // *Handb. Clin. Neurol.* — 2010. — Vol. 97. — P. 79–83.

39. Rajakulendran S., Kaski D., Hanna M.G. Neuronal P/Q-type calcium channel dysfunction in inherited disorders of the CNS // *Nat. Rev. Neurol.* — 2012. — Vol. 8. — P. 86–96.
40. Riant F., Ducros A., Ploton C. et al. De novo mutations in ATP1A2 and CACNA1A are frequent in early-onset sporadic hemiplegic migraine // *Neurology.* — 2010. — Vol. 75. — P. 967–972.
41. Russell M.B., Ducros A. Sporadic and familial hemiplegic migraine: pathophysiological mechanisms, clinical characteristics, diagnosis and management // *Lancet Neurol.* — 2011. — Vol. 10. — P. 457–470.
42. Segall L., Scanzano R., Kaunisto M.A. et al. Kinetic alterations due to a missense mutation in the Na,K-ATPase alpha2 subunit cause familial hemiplegic migraine type 2 // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 43692–43696.
43. Stam A.H., Luijckx G.J., Poll-The B.T. et al. Early seizures and cerebral oedema after trivial head trauma associated with the CACNA1A S218L mutation // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* — 2009. — Vol. 80. — P. 1125–1129.
44. Stam A.H., Louter M.A., Haan J. et al. A long-term follow-up study of 18 patients with sporadic hemiplegic migraine // *Cephalalgia.* — 2011. — Vol. 31. — P. 199–205.
45. Terwindt G.M., Ophoff R.A., Haan J. et al. Familial hemiplegic migraine: a clinical comparison of families linked and unlinked to chromosome 19.DMG RG // *Cephalalgia.* — 1996. — Vol. 16. — P. 153–155.
46. Thomsen L.L., Ostergaard E., Romer S.F. et al. Sporadic hemiplegic migraine is an aetiologically heterogeneous disorder // *Cephalalgia.* — 2003. — Vol. 23. — P. 921–928.
47. Thomsen L.L., Eriksen M.K., Roemer S.F. et al. A population-based study of familial hemiplegic migraine suggests revised diagnostic criteria // *Brain.* — 2002. — Vol. 125. — P. 1379–1391.
48. Thomsen L.L., Olesen J. Sporadic hemiplegic migraine // *Cephalalgia.* — 2004. — Vol. 24. — P. 1016–1023.
49. Thomsen L.L., Olesen J., Russell M.B. Increased risk of migraine with typical aura in probands with familial hemiplegic migraine and their relatives // *Eur. J. Neurol.* — 2003. — Vol. 10. — P. 421–427.
50. Thomsen L.L., Ostergaard E., Olesen J., Russell M.B. Evidence for a separate type of migraine with aura: sporadic hemiplegic migraine // *Neurology.* — 2003. — Vol. 60. — P. 595–601.
51. Todt U., Dichgans M., Jurkat-Rott K. et al. Rare missense variants in ATP1A2 in families with clustering of common forms of migraine // *Hum. Mutat.* — 2005. — Vol. 26. — P. 315–321.
52. Urban MO, Ren K, Sablad M et al. Medullary N-type and P/Q-type calci channels contribute to neuropathyinduced allodynia // *Neuroreport.* — 2005. — Vol. 16. — P. 563–566.
53. van Den Maagdenberg A., Terwindt G., Haas J. et al. Genetics of headaches // *Handb. Clin. Neurol.* — 2010. — Vol. 97. — P. 85–97.
54. Vanmolkot K.R., Stroink H., Koenderink J.B. et al. Severe episodic neurological deficits and permanent mental retardation in a child with a novel FHM2 ATP1A2 mutation // *Ann. Neurol.* — 2006. — Vol. 59. — P. 310–314.
55. Whitty C.W.M. Familial hemiplegic migraine // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* — 1953. — Vol. 16. — P. 172–177.
56. Yu F.H., Mantegazza M., Westenbroek R.E. et al. Reduced sodium current in gabaergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy // *Nat. Neurosci.* — 2006. — Vol. 9. — P. 1142–1149.
57. Yue Q., Jen J.C., Nelson S.F. et al. Progressive ataxia due to a missense mutation in a calcium-channel gene // *Am. J. Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 61. — P. 1078–1087.
58. Zhuchenko O., Bailey J., Donnen P. et al. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the a1A-voltage-dependent calcium channel // *Nat. Genet.* — 1997. — Vol. 15. — P. 62–69.

Hemiplegic migraine

Azimova J.E.^{1,2}, Klimov E.A.³, Skorobogatykh K.V.^{1,2},
Sergeev A.V.^{1,2}, Kokaeva Z.G.³, Tabeeva G.R.^{1,2}

¹ — Laboratory of Neurology and Clinical Neurophysiology, Department of Neuroscience, Scientific-Research Centre, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

² — University headache clinic, Moscow, Russia

³ — Biological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Familial hemiplegic migraine is only one type of migraine with well-studied molecular genetic mechanism. This is a rare neurological disease of humans that is described only in 200 families worldwide and in sporadic forms. However, understanding of the molecular mechanisms of hemiplegic migraine expands our understanding of the etiology of classical migraine. In this review available to date information about the genetic basis of hemiplegic migraine, its clinical presentations and a brief overview of approaches to treatment are presented.

Key words: hemiplegic migraine, familial hemiplegic migraine, mutations

Деканализация иммунного ответа при расселении современного человека: связь генетического разнообразия в генах иммунной системы с климато-географическими факторами*

Степанов В.А.¹, Канделария П.², Кхо С.², Жанг Г.², Трифонова Е.А.¹, Симонова К.В.¹, Бочарова А.В.¹, Лайнг И.А.², Хайден К.², Баккер В.³, Бьеррегаард П.³, Линч Н.⁴, Хагель И.⁴, Маск А.У.⁵, Битлз А.⁶, Голдблатт Дж.², Ле Сёф П.²

¹ — Научно-исследовательский институт медицинской генетики СО РАМН,

634050, Набережная Ушайки 10, Томск, Россия, e-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru

² — Школа педиатрии и детских болезней, Университет Западной Австралии, 6009 Перт, Австралия

³ — Университетский госпиталь Копенгагена, Биспебьерк Баке 23, 2400 Копенгаген, Дания

⁴ — Институт биомедицины, Центральный Университет Венесуэлы, Каракас, Венесуэла

⁵ — Отдел респираторной медицины, Госпиталь сэра Чарльза Гарднера, Перт, Австралия

⁶ — Центр сравнительной геномики, Университет Мердока, Саут стрит, 6150 Перт, Австралия

Представлены данные о распределении в 15 мировых популяциях частот аллелей семи маркёров в генах, участвующих в клеточном иммунном ответе на паразитарные инфекции, поляризации иммунного ответа по Th2-пути и ассоциированных с atopическими и аллергическими фенотипами. Гены и популяции для исследования были выбраны исходя из гипотезы о сдвиге баланса иммунного ответа от Th2 к Th1-типу по мере расселения современного человека из экваториальной Африки в регионы с умеренным и арктическим климатом под действием естественного отбора, обеспечивающего адаптацию популяций к новым условиям среды обитания. В настоящем исследовании выявлено систематическое изменение частот аллелей, играющих роль в иммунном ответе и в воспалительных реакциях, в популяциях человека по мере расселения из Африки. Показано, что эти изменения связаны со сменой климато-географических условий среды обитания, опосредованы естественным отбором, имеют отношение к подверженности распространённым болезням, и могут быть объяснены с позиций гипотезы канализации/деканализации взаимоотношений генотип-среда под действием естественного отбора.

Ключевые слова: естественный отбор, генетическое разнообразие, иммунная система, популяции человека, гипотеза деканализации

Введение

Современный человек является уникальным биологическим видом по широте занимаемого им ареала и скорости расселения. Распространение человека из места происхождения *Homo sapiens* в Восточной Африке по территории земного шара происходило быстро, в эволюционных масштабах, темпами — на протяжении последних 50—100 тыс. лет, и было сопряжено со сменой климатических зон от тропического климата к умеренному и арктическому, и связанными с этим изменениями параметров среды обитания — температуры, влажности, инсоляции, инфекционной нагрузки. Вероятно, опосредованное естественным отбором влияние средовых факторов играло определённую роль в изменении частот аллелей и генотипов в популяциях, хотя эффекты естественного отбора на фоне

ведущей роли миграций, изоляции расстоянием и дрейфа генов в формировании генетического разнообразия в популяциях человека выявить сложно. Наиболее яркие примеры роли естественного отбора в дифференциации популяции по генам, имеющим отношение к болезням, были получены ещё на группах крови и ряде других белковых систем. Классическими примерами являются распространённость нулевого аллеля группы крови *Duffy* и высокая частота гетерозигот по мутациям в гене бета-цепи гемоглобина, приводящим к серповидно-клеточной анемии, в районах распространения малярии [21]. Поиску сигналов естественного отбора на уровне всего генома посвящен и ряд современных работ [17, 28, 40]. В полногеномных исследованиях гены, вовлечённые в иммунный ответ, являются наиболее часто выявляемыми мишенями для естественного отбора.

* Работа частично финансировалась ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» (госконтракт №11.519.11.2036. В.С.), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (соглашение №8042, В.С.), Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант №12-04-00595а, В.С.), Австралийским исследовательским советом (ARC, П.Л.С.), Национальным советом Австралии по исследованиям в области здравоохранения и медицины (NHMRC, П.Л.С.)

В ряду важных теоретических представлений о роли естественного отбора можно отметить концепцию канализации Уоддингтона [41, 42, 44], постулировавшую эволюцию системы к наиболее стабильному состоянию, устойчивому к генетическим и средовым изменениям, представленному оптимумом фенотипа у большей части популяции. Близки идеям Уоддингтона и представления Шмальгаузена [4] о стабилизирующем отборе (отборе против отклонений от оптимума) и более поздняя концепция Алтухова об оптимальном уровне гетерозиготности популяции, авто-регулируемым факторами популяционной динамики [1].

Применительно к роли отбора в эпидемиологии распространённых болезней развивались концепции «эко-номных генов» [34, 35], «дрейфующих генов» и ряд других. Появление в последние годы новых данных, основанных на полногеномных и постгеномных технологиях, привели к новому всплеску концептуального осмысления роли естественного отбора и разработке подходов к выявлению его сигналов в популяциях человека. Например, гипотеза «предковой предрасположенности» (Ancestral Susceptibility) [13] в соответствии с принципом канализации постулирует, что предковые аллели были адаптивными для древних популяций человека, а производные — «вредными». Согласно этой гипотезе, с расселением и сменой средовых факторов давление отбора на производные аллели упало, а предковые аллели стали аллелями предрасположенности к хроническим болезням. Концепция деканализации, развиваемая Гибсоном [15, 32] идеологически близка предыдущей и подразумевает, что расселение человека за пределы ареала предковых популяций нарушило канализованный оптимум, привело к проявлению криптической генетической изменчивости и повышению частоты связанных с ней заболеваний.

Эволюционные предшественники *Homo sapiens* и предковые популяции современного человека, на протяжении многих поколений подвергались усиленному давлению средовых факторов, связанных с инфекционными тропическими болезнями (гельминты, бактериальные инфекции). Роль паразитарных (прежде всего гельминтных инфекций) в заболеваемости населения подчеркивается данными эпидемиологических исследований. Согласно данным ряда работ [7, 46], гельминтозы встречаются гораздо чаще в условиях жаркого и влажного тропического климата по сравнению с популяциями умеренной и арктической зон. В тропических популяциях естественный отбор благоприятствовал накоплению вариантов генов, обеспечивающих более мощный иммунный ответ на паразитарные инфекционные заболевания по Th2-типу [18, 27], что должно было привести к канализации генетической структуры популяции за счёт направленного отбора провоспалительных аллелей генов, участвующих в гуморальном иммунном ответе, опосредованном Т-хелперами второго типа (Th2-ответ). Можно предполагать, что расселение человека в зоны умеренного и арктического климата и экс-

позиция другими инфекционными агентами (вирусными и внутриклеточными бактериальными инфекциями) могли привести к сдвигу устоявшегося баланса Th2/Th1 и деканализации сложившихся в предковых популяциях взаимоотношений генотип-среда.

Для проверки этой гипотезы мы исследовали распределение функциональных аллелей нескольких генов иммунной системы в 15 мировых популяциях, представляющих различные климатические зоны Земного шара и оценили взаимосвязь генетического разнообразия с климато-географическими факторами.

Материалы и методы

Исследованные популяции

В исследование были включены выборки из 15 популяций, представляющих коренное население Африки, Европы, Азии, Австралии, Северной и Южной Америки. Изученные популяции принадлежат к основным расовым группам человечества и проживают в различных климатических зонах (тропической, субтропической, умеренной, арктической). Географическая локализация популяций показана на рис. 1.

Гана, Западная Африка (N=170). В исследование были включены школьники, принадлежащие к основной этнической группе Ганы акан (гвинейская группа нигеро-кордофанской языковой семьи). Гана находится в экваториальном климатическом поясе.

Коса, Южная Африка (N=218). Школьники и студенты из Кейптауна (ЮАР), относящиеся к этнической группе коса (амакоса) и говорящие на языке группы банту нигеро-кордофанской семьи. Климат района проживания коса относится к средиземноморскому субтропическому типу.

Эфиопия (N=635). Выборка из популяции г.Джимма в юго-западной Эфиопии, состоящая из представителей народов оромо и амхара, языки которых относятся, соответственно, к кушитской и семитской группе афро-азиатской языковой семьи. Эфиопия находится в экваториальном климатическом поясе, однако из-за большой высоты над уровнем моря г.Джимма (1700 м), локальные климатические условия соответствуют субтропической зоне.

Австралийские аборигены, Калумбуру (N=240). Выборка из изолированной общины Калумбуру в северной части штата Западная Австралия. Экваториальная климатическая зона на границе регионов тропической саванны и пустыни.

Австралийские аборигены, Варракурна (N=97). Выборка из изолированного сообщества в пустынном районе Западной Австралии. Климат тропической пустыни.

Варао, Венесуэла (N=149). Южноамериканские индейцы племени Варао, проживающие в дельте реки Ориноко в зоне экваториального тропического климата. Язык варао относится к группе чибча америндской языковой семьи.

Итальянцы (N=96). Выборка доноров из г. Генуя. Генуя находится в зоне субтропического средиземноморского климата.

Датчане (N=475). Выборка неродственных индивидов из Копенгагена. Умеренный морской климат.

Русские (N=96). Популяционная выборка из Ростова-на-Дону. Умеренный континентальный климат.

Коми (N=48). Популяционная выборка коми-зырян из Сыктывкара, говорящих на языке, относящемся к финно-угорской языковой семье. Умеренный континентальный климат.

Киргизы, Бишкек, Киргизия (N=96). Популяционная выборка из г. Бишкека. Язык киргизов относится к тюркской группе алтайской языковой семьи. Умеренный континентальный климат.

Алтайцы (N=96). Популяционная выборка южных алтайцев из пос. Кулада и Бешпельтир Республики Алтай. Алтайцы говорят на языке, принадлежащем тюркской группе алтайской языковой семьи и проживают в высокогорной области зоны умеренного континентального климата.

Буряты (N=96). Популяционная выборка из пос. Орлик и Могохон, Республика Бурятия. Умеренный континентальный климат.

Ханты (N=48). Популяционная выборка из пос. Русскинский Ханты-Мансийского автономного округа. Язык хантов принадлежит к финно-угорской семье. Субарктический континентальный климат.

Инуиты, Гренландия (N=649). Выборка пос. Казигангуйт на западном берегу о. Гренландия за Северным полярным кругом в арктическом климатическом поясе. Язык инуитов принадлежит к эскимосско-алеутской языковой семье.

В выборки включались неродственные индивиды, принадлежащие к указанным этническим группам. Общая численность выборок составила 3209 чел.

Гены и маркёры

В настоящей работе было прогенотипировано 7 однонуклеотидных полиморфных маркёров (SNP) в шести генах. Гены, продукты которых играют важную роль в иммунном ответе, были выбраны исходя из данных об их роли в дифференциации Т-хелперов 2 типа, производстве иммуноглобулина Е (IgE) и в защите от бактериальных и гельминтных инфекций. Маркёры в генах были подобраны на основании данных об их участии в модуляции уровня транскрипции, изменения функций соответствующего белкового продукта и данных об ассоциациях с заболеваниями, характеризующимися дисбалансом Th1/Th2-типов иммунного ответа.

CD14 (Молекула CD14). Кодирован белком, который в комплексе с MD-2 и TLR4 взаимодействует с бактериальными липополисахаридами, опосредуя врождённый иммунный ответ. Полиморфный маркёр C-159T (rs2569190) в промоторе этого гена связан с уровнем транскрипции, аллель С ассоциирован со сниженным

уровнем CD14, повышенным уровнем IgE и IgE-зависимой патологией [6, 28]. Показана ассоциация этого маркёра с атопией, тяжестью течения бронхиальной астмы и ответом на терапию астмы [8, 9, 36, 47].

SCGB1A1 (Секретоглобин, семейство 1А, член 1, старое название — CC16). Кодирован секреторный белок клеток Клара, являющийся противовоспалительным белком. Участвует в подавлении воспалительных реакций при активации иммунного ответа по Th2-типу через механизмы, связанные с ингибированием фосфолипазы С [30]. Интронный полиморфизм 38 A/G (rs3741240) гена связан с модуляцией экспрессии гена. Аллель А ассоциирован с пониженным уровнем белка, с астмой и атопическим дерматитом. [10, 24, 25].

СМА1 (Химаза 1 тучных клеток). Кодирован сериновую протеазу, экспрессируемую в тучных клетках. Тучные клетки играют ведущую роль в таких Th2-опосредованных процессах как аллергическое воспаление и защита от паразитарных инфекций. Аллель G полиморфного маркёра -1903 A/G (rs1800875) в промоторе гена ассоциирован с риском атопической экземы и повышенным уровнем IgE [19, 45].

ADRB2 (Адренорецептор бета 2). Адренергический β-2 рецептор является членом суперсемейства рецепторов, связывающихся с белком G. Рецептор опосредует катехоламин-индуцируемую активацию аденилат-циклазы. Две миссенс-мутации в этом гене — arg16 (rs1042713) и gln27 (rs1042714) являются хорошо известными маркёрами продукции IgE тучными клетками [11]. Мутантные аллели ассоциированы с повышенным уровнем IgE. В частности, аллель arg16 связан с продукцией специфического IgE при аскаридозе [39]. Указанные варианты гена также связаны с эффективностью терапии бронхиальной астмы и эндофенотипами болезни [29].

IL12B (Интерлейкин 12В). Ключевой цитокин Т-клеток, обеспечивающий дифференциацию Т-клеток в Th1-фенотип и играющий, тем самым, важную роль в балансе Th1/Th2. Полиморфные маркёры этого гена ассоциированными с уровнем IgE, астмой и атопией. В частности, полиморфный маркёр A1188C (rs3212227) в 3'-нетранслируемом регионе гена ассоциирован с уровнем экспрессии интерлейкина 12В, ряда других цитокинов — интерферона-γ, интерлейкина 4, а также с другими фенотипами иммунной системы и инфекционными заболеваниями [2, 14].

IL4R (рецептор интерлейкина 4 альфа). Кодирован субъединицу рецептора интерлейкина 4, который связывает IL4 и IL13, тем самым опосредуя их эффект. IL4 и IL13 являются ключевыми медиаторами Th2-ответа и продукции IgE. Миссенс-мутация Ile50Val (rs1805010), наряду с рядом других мутаций, изменяет аффинность связывания с сигнальными молекулами (STAT6 и др.), модулируя активность рецептора. Аллель 50Ile ассоциирован с повышенным уровнем IgE и риском атопической бронхиальной астмы [20, 33].

Аллели указанных маркёров, которые связаны с повышенной продукцией IgE, другими воспалительными реакциями и/или с повышенным риском аллергических и атопических заболеваний будем в дальнейшем называть провоспалительными.

Генотипирование полиморфных маркёров осуществляли стандартными методами ПЦР как описано ранее [10, 23, 25]. Из-за недостатка биологического материала маркёры генов IL12B и IL4R не были прогенотипированы в популяциях Эфиопии и австралийских аборигенов из Варракурны. IL4R также не был прогенотипирован у коса.

Статистический анализ

Частоты аллелей, гетерозиготность, соответствие распределения генотипов равновесию Харди—Вайнберга определяли стандартными методами в пакете программ Arlequin. Для оценки селективной нейтральности полиморфных маркёров использовали тест Юинса—Ваттерсона, реализованный в Arlequin.

Для выявления взаимосвязи показателей генетического разнообразия с климато-географическими параметрами рассчитывали коэффициенты корреляции Спирмена в пакете Statistica и коэффициенты корреляции матриц Мантеля в Arlequin. Информацию о климатических параметрах (среднегодовая температура, среднегодовой уровень осадков, средняя температура июля, средняя температура января, разброс средних температур, высота над уровнем моря) извлекали из базы данных Weatherbase (www.weatherbase.com), используя дан-

ные ближайших к локализации популяции метеорологических станций. Для количественной оценки климата использовали классификацию Кеппена—Гейгера в редакции Peel et al., основанную на комбинации среднегодовых и месячных уровней температуры и осадков и сезонности осадков [32, 38].

Многомерный анализ частот аллелей проводили методом главных компонент в пакете программ Statistica.

Результаты

Частоты аллелей и генетическое разнообразие популяций

Частоты аллелей и параметры генетического разнообразия популяций приведены в табл. 1. Точный тест на соответствие распределения генотипов равновесию Харди—Вайнберга (PXB) показал значимое отклонение ($p < 0,05$) в 13 случаях из 100 распределений. Не наблюдалось накопление случаев отклонения от PXB по определённым маркёрам, однако было зафиксировано накопление отклонений в популяции Эфиопии (4 маркёра из пяти). Возможно, это отражает подразделённость выборки из г.Джимма, состоящей из представителей двух основных народов Эфиопии — амхара и оромо. В то же время, после введения поправки Бонферрони на множественность сравнений, скорректированный пороговый уровень статистической значимости ($p = 0,0038$) был превышен только в трёх случаях (по одному разному маркёру у алтайцев, инуитов и в Эфиопии), что не выходит за рамки ожидаемого числа случайных отклонений от PXB.

Таблица 1

Частоты провоспалительных аллелей (%) и генетическое разнообразие в исследованных популяциях

Популяция	Ген, rs, аллель								
	<i>CD14</i> rs2569190 C-159	<i>SCGB1A1</i> rs3741240 A38	<i>CMA1</i> rs1800875 1903G	<i>ADRB2</i> rs1042713 arg16	<i>ADRB2</i> rs1042714 gln27	<i>IL12B</i> rs3212227 1188C	<i>IL4R</i> rs1805010 Val50	He5	He7
Гана	72,9	22,6	85,1	46,3	88,1	35,1	50,6	0,342	0,381
Эфиопия	58,4	21,7	78,7	43,2	82,4			0,389	
Варао	63,8	8,7	94,1	58,8	97,3	63,7	43,1	0,251	0,316
Коса	76,1	22,5	85,1	46,6	84,3	30,7		0,346	
АА Калумбуру	82,3	78,7	96,6	59,7	89,4	69,0	83,1	0,273	0,296
АА Варракурна	86,6	65,8	88,1	48,4	87,4			0,324	
Итальянцы	37,8	38,8	50,5	35,8	65,2	25,3	45,1	0,474	0,464
Датчане	56,8	35,6	45,2	41,8	58,6	19,4	46,8	0,484	0,461
Киргизы	50,0	35,6	64,9	41,5	72,3	34	51,1	0,462	0,467
Русские	51,6	38,5	37,5	39,6	61,5	20,3	41,1	0,481	0,460
Алтайцы	40,4	47,9	53,7	31,3	60,2	27,4	36,5	0,480	0,474
Буряты	43,2	33,7	54,3	36,8	67,4	39,5	42,2	0,470	0,475
Коми	49,0	35,4	45,8	29,2	57,3	25	43,8	0,476	0,465
Ханты	45,8	40,6	45,8	38,5	57,3	18,8	56,4	0,493	0,467
Инуиты	20,5	22,6	60,3	66,3	84,9	33,6	15,5	0,372	0,367
Примечание. АА — австралийские аборигены; He5 — ожидаемая гетерозиготность по пяти маркёрам (<i>CD14</i> , <i>SCGB1A1</i> , <i>CMA1</i> , <i>ADRB2</i> arg16 и gln27); He7 — ожидаемая гетерозиготность по всем семи маркёрам									



Рис. 1. Локализация исследованных популяций. AA — австралийские аборигены

В целом, по маркерам генов *CD14*, *CMA1* и *ADRB2*, популяции, проживающие в условиях тропического и субтропического климата (3 африканские популяции, 2 популяции австралийских аборигенов и индейцы варео из Южной Америки) характеризуются более высокими частотами провоспалительных аллелей по сравнению с популяциями умеренной и арктической климатических зон.

На рис. 2 приведена диаграмма генетического разнообразия в популяциях (ожидаемая гетерозиготность по пяти маркерам) в исследованных популяциях. Популяции упорядочены по мере удаления от экватора, что со-

ответствует смене климатических зон от экваториального климата к умеренному и арктическому. Популяции экваториальной и тропической зоны (Гана, Эфиопия, коса, варео, аборигены Австралии) характеризуются гораздо более низким генетическим разнообразием по сравнению с популяциями умеренного и арктического климата. Гетерозиготность, оценённая по всем семи маркерам в 13 популяциях из 15 (табл. 1) следует той же закономерности.

Отклонения от селективной нейтральности

В табл. 2 приведены уровни значимости теста Юинса-Ваттерсона для отклонений от гипотезы селективной нейтральности изученных маркеров. Для маркеров *CD14*, *ADRB2* (*arg16*), *IL4R* наблюдается систематическое отклонение от нейтральности в большинстве изученных популяций. Маркеры *SCGB1A1*, *ADRB2* (*glu27*) и *CMA1* демонстрируют отклонения от нейтральности в большинстве популяций умеренной и арктической климатических зон. И лишь полиморфизм *A1188C* интерлейкина *12B*, вероятно, не испытывал давления естественного отбора.

Корреляция генетического разнообразия с климато-географическими параметрами

В табл. 3 приведены значения уровня значимости коэффициента Спирмена для корреляции частоты провоспалительных аллелей с географическими и климатическими параметрами. В качестве «географических» переменных использовались расстояние в градусах по широте от экватора, расстояние в градусах по долготе от гринвичского меридиана и высота над уровнем моря в метрах. «Климатические» переменные включали

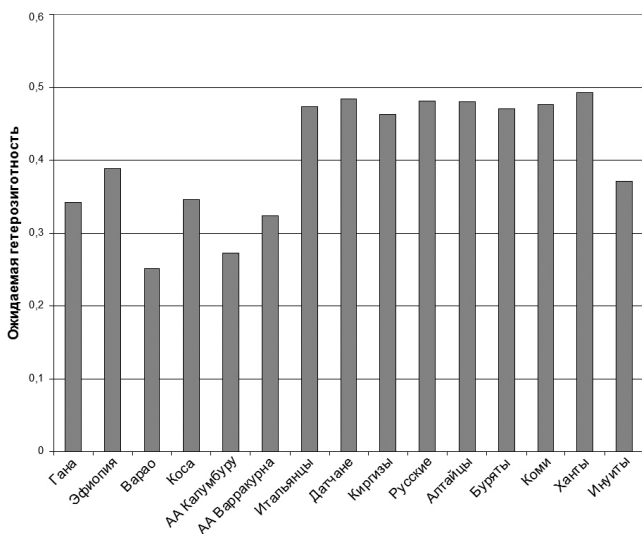


Рис. 2. Ожидаемая гетерозиготность по пяти SNP в исследованных популяциях

классификацию климата Кеппена—Гейгера в баллах, среднегодовую температуру, среднюю температура января, среднюю температура июля, разницу средних температур января и июля, количество осадков и уровень влажности.

Для четырёх из семи локусов (*CD14*, *CMA1*, *ADRB2-16*, *ADRB2-27*), а также для уровня ожидаемой гетерозиготности по пяти и по семи маркерам наблюдаются устойчивые корреляции с расстоянием от эквато-

ра, среднегодовой температурой, средним температурой января и июля, разбросом температур и влажностью. Частоты аллелей генов *SCGB1A1* и *IL4R* не показывают значимых корреляций, а ген *IL12B* занимает промежуточное положение, демонстрируя не столь широкий спектр взаимосвязей с климато-географическими параметрами, как 4 первых указанных локуса.

Среди средовых параметров расстояние от Гринвича по широте, высота над уровнем моря и количество осад-

Таблица 2

Селективная значимость исследованных маркёров в популяциях

Популяция	<i>CD14</i> rs2569190 C-159	<i>SCGB1A1</i> rs3741240 A38	<i>CMA1</i> rs1800875 1903G	<i>ADRB2</i> rs1042713 arg16	<i>ADRB2</i> rs1042714 gln27	<i>IL12B</i> rs 3212227 1188C	<i>IL4R</i> rs1805010 Val50
Гана	0,1578	0,1894	0,2778	0,0274	0,3144	0,0966	0,0039
Эфиопия	0,042	0,1697	0,166	0,0359	0,2002		
Варао	0,0914	0,3919	0,4454	0,0583	0,582	0,094	0,0434
Коса	0,1834	0,1942	0,2602	0,0232	0,2639	0,1222	
АА Калумбуру	0,2297	0,1924	0,5561	0,0607	0,3197	0,1171	0,2343
АА Варракурна	0,328	0,117	0,3505	0,0125	0,3326		
Итальянцы	0,0915	0,082	0,0059	0,1056	0,1147	0,1854	0,0374
Датчане	0,0365	0,0781	0,028	0,044	0,0458	0,1938	0,0178
Киргизы	0,0003	0,1042	0,1096	0,0614	0,1703	0,1153	0,0081
Русские	0,0147	0,085	0,0938	0,0758	0,0829	0,2471	0,0636
Алтайцы	0,0727	0,0177	0,0258	0,1393	0,0762	0,1119	0,1012
Буряты	0,0452	0,114	0,0315	0,0977	0,1248	0,0703	0,0538
Коми	0,0127	0,1227	0,0334	0,1738	0,0602	0,2234	0,0543
Ханты	0,035	0,0766	0,037	0,1006	0,0623	0,289	0,0546
Инуиты	0,1784	0,1606	0,0515	0,0861	0,226	0,1035	0,2222

Примечание. В ячейках таблицы приведён уровень значимости теста Юинса—Ваттерсона, полученный при 10 000 симуляций распределения генотипов в каждой из популяций. Серым выделены распределения, отклоняющиеся от гипотезы селективной нейтральности (тёмно-серый $p < 0,05$; светло-серый — $p < 0,10$)

Таблица 3

Связь частот аллелей с географическими и климатическими параметрами

	Широта от экватора	Долгота от Гринвича	Высота над уровнем моря	Климатическая классификация Кеппена	Средне- годовая темпера- тура	Средняя темпера- тура января	Средняя темпера- тура июля	Разброс темпера- тур	Уровень осадков	Влаж- ность
<i>CD14</i>		0,9496	0,6112	0,0004	0,0003	0,0019	0,0384	0,0440	0,7368	0,0298
<i>SCGB1A1</i>	0,3369	0,7561	0,9092	0,8154	0,7800	0,3724	0,2608	0,0743	0,4752	0,7650
<i>CMA1</i>	0,0003	0,1038	0,5574	0,0071	0,0009	0,0022	0,0060	0,0147	0,5249	0,0096
<i>ADRB2-16</i>	0,0577	0,1358	0,3579	0,0805	0,0293	0,0076	0,3574	0,0047	0,2075	0,0876
<i>ADRB2-27</i>	0,0004	0,1491	0,8196	0,0077	0,0009	0,0006	0,0270	0,0022	0,4264	0,0125
<i>IL12B</i>	0,0030	0,0707	0,4255	0,1464	0,0553	0,1186	0,0071	0,1002	0,7749	0,0362
<i>IL4R</i>	0,3786	0,3911	0,8883	0,0635	0,1850	0,2738	0,0965	0,6641	0,8203	0,8717
He5	0,0008	0,1177	0,7322	0,0055	0,0008	0,0011	0,0150	0,0050	0,4780	0,0053
He7	0,0985	0,8585	0,0422	0,0204	0,0088	0,0013	0,3426	0,0000	0,0098	0,0025

Примечание. В ячейках таблицы приведён уровень значимости коэффициента корреляции Спирмена между частотой аллеля в популяциях и анализируемым географическим или климатическим параметром. Серым выделены значимые корреляции (тёмно-серый — $p < 0,05$; светло-серый — $p < 0,10$); He5 — ожидаемая гетерозиготность по пяти маркерам (*CD14*, *SCGB1A1*, *CMA1*, *ADRB2* arg16 и gln27); He7 — ожидаемая гетерозиготность по всем семи маркерам

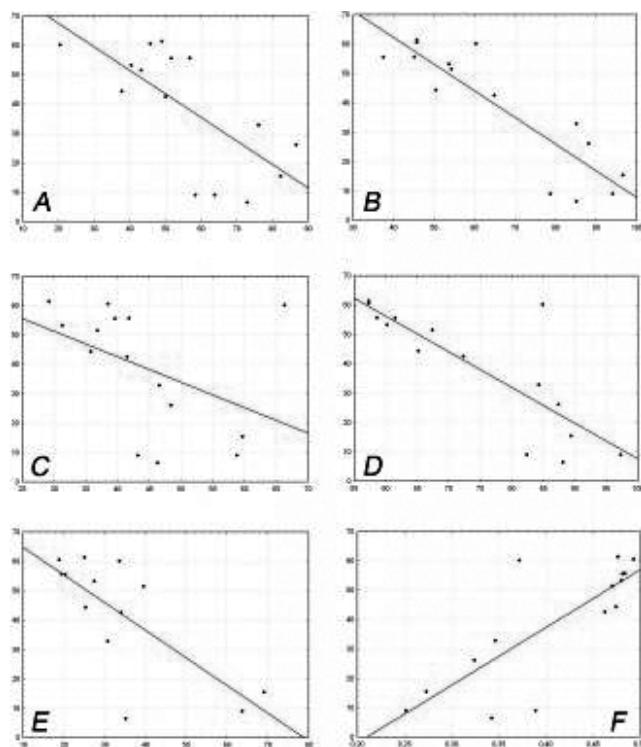


Рис. 3. Корреляция частот провоспалительных аллелей и ожидаемой гетерозиготности с широтой (расстоянием от экватора). По оси X — частота провоспалительного аллеля (A–E) или ожидаемой гетерозиготности по пяти маркерам (F). По оси Y — расстояние от экватора в градусах. A. *CD14*; B. *CMA1*; C. *ADRB2-16*; D. *ADRB2-27*; E. *IL12B*; F. Ожидаемая гетерозиготность

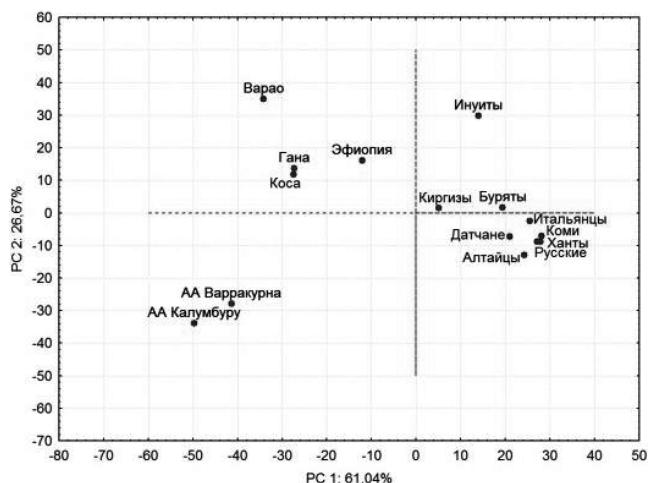


Рис. 4. Пространство двух первых главных компонент частот аллелей пяти SNP в исследованных популяциях

ков не демонстрируют корреляций с частотами аллелей и уровнем генетического разнообразия.

На рис. 3 продемонстрирована взаимосвязь частот аллелей и генетического разнообразия популяций с расстоянием от экватора (широтой). Частота провоспалительных аллелей всех изученных генов, за исключением *SCGB1A1* уменьшается от экватора к полюсам, причем для пяти маркеров из семи эта корреляция является статистически достоверной. Генетическое разнообразие по пяти и по семи маркерам за счёт уменьшения частоты провоспалительного аллеля и роста частоты альтернативного аллеля увеличивается от экватора к полюсам. Для системы из пяти маркеров эта корреляция является статистически достоверной с уровнем значимости $p=0,001$, а для семи маркеров $p=0,098$.

Матрица генетических расстояний между популяциями статистически достоверно коррелирует с матрицей географических расстояний (тест Мантеля, $p<0,05$).

Многомерный анализ частот аллелей

На рис. 4 показано положение исследованных популяций в пространстве двух первых главных компонент (PC) аллельных частот пяти генетических маркеров. Первая и вторая главные компоненты в сумме объясняют 88% вариальности частот аллелей. По первой главной компоненте исследованные популяции делятся на две группы — популяции тропического пояса располагаются в левой части пространства и характеризуются отрицательными значениями координат по оси PC1. Все популяции умеренного и арктического климата кластеризуются в правой части пространства. В целом, вероятно, первую компоненту можно интерпретировать как вклад климато-географических параметров среды обитания в генетическую дифференциацию популяций по исследованным генам. Популяции изолированных коренных народов (австралийские аборигены, варао и инуиты) занимают в пространстве PC1-PC2 обособленные положения, но также следуют общему тренду дифференциации на популяции тропических и умеренных/арктических регионов. Высокогорная популяция Эфиопии кластеризуется с другими африканскими популяциями, однако по шкале PC1 располагается ближе других тропических популяций к кластеру популяций умеренного и арктического климата.

Обсуждение

В работе представлены данные о распределении в мировых популяциях частот аллелей семи маркеров в генах, участвующих в иммунном ответе на паразитарные инфекции, поляризации иммунного ответа по Th2-пути и ассоциированных с atopическими и аллергическими фенотипами. Гены и популяции для исследования были выбраны исходя из гипотезы о сдвиге баланса иммунного ответа от Th2 к Th1-типу по мере расселения современного человека из экваториальной Африки в регионы с умеренным и

арктическим климатом под действием естественного отбора, обеспечивающего адаптацию популяций к новым условиям среды обитания. При этом сложившаяся в предковых и существующая в современных африканских популяциях система взаимоотношений генотип—среда, канализованная направленным отбором провоспалительных аллелей, обеспечивающих более мощный ответ на паразитарные инфекции, в ходе расселения была деканализована новыми средовыми факторами.

Совокупность полученных данных свидетельствует о существенной генетической дифференциации популяций тропической и умеренной/арктической климатических зон, выраженной корреляции частот аллелей и генетического разнообразия с климатическими факторами и вероятной роли естественного отбора в формировании такой картины.

Как и следует ожидать при изучении сложных биологических систем, не все данные (не все гены и популяции) укладываются в общую гипотезу исследования. Различия в частотах аллелей между популяциями человека являются следствием действия всей совокупности микроэволюционных факторов, ведущими из которых при расселении человека являлись миграции и генетический дрейф. При этом наблюдается клинальная изменчивость частот генов и уменьшение генетического разнообразия от места происхождения до периферии ареала. Для человека такие закономерности прослежены для любых представительных выборок генетических маркёров — по линиям мтДНК и Y-хромосомы, обширным выборкам коротких tandemных повторов, широкогеномным наборам SNP (см. обзор [3]). Однако эффекты дрейфа и формируемые им клины случайны в отношении аллелей и не могут объяснить систематический сдвиг частот функционально родственных, но локализованных в разных участках генома, маркёров. Наши данные свидетельствуют о параллельном снижении частоты функционально значимого провоспалительного (связанного с более выраженным иммунным ответом) аллеля от тропиков к полюсам и корреляции с ключевыми климатическими показателями для четырёх исследованных маркёров из семи (*CD14*, *CMA1* и 2 маркёра *ADRB2*). Такую же тенденцию демонстрирует и *IL12B*. И лишь два маркёра (*SCGB1A1* и *IL4R*) не демонстрируют аналогичных взаимосвязей.

Крайне примечательно, что общий уровень генетического разнообразия по исследованным генам возрастает от тропической Африки к популяциям Европы и Азии, локализованным в зоне умеренного и арктического климата. Такая картина противоположна тому, что наблюдается по любым условно нейтральным маркёрам (mtДНК, Y-хромосоме, широкогеномным выборкам SNP и др. [3]), и тому, чего следует ожидать исходя из гипотезы нейтральной эволюции — клинального падения генетического разнообразия от Африки (места происхождения) к Европе и Азии (на периферию ареала). На наш взгляд, рост разнообразия по генам, модулирующим Th2-ответ, можно интерпретировать как следст-

вие разрушения сложившегося в предковых популяциях равновесия (деканализацию) за счёт снижения селективной значимости провоспалительных аллелей, стимулирующих Th2-ответ и/или повышения адаптивной ценности альтернативных аллелей в новых средовых условиях умеренного/арктического климата.

Вывод о систематическом направленном изменении частот провоспалительных аллелей и генетического разнообразия поддерживается совокупностью всего массива данных, проанализированного с помощью разных методических подходов. Провоспалительные аллели большинства изученных генов имеют более высокую частоту в тропических популяциях (табл. 1); наблюдается клинальный рост генетического разнообразия по этим генам от экватора к полюсам (табл. 1, рис. 2 и 4); большая часть маркёров демонстрируют признаки действия естественного отбора как в Африке, так и вне её (табл. 2); популяции кластеризуются в пространстве главных компонент в зависимости от параметров климата (рис. 4). Наконец, большая часть генов как по отдельности, так и в рамках одной системы (совокупное генетическое разнообразие) демонстрируют устойчивые корреляции с расстоянием от экватора и ключевыми характеристиками климата (среднегодовой температурой, разбросом температур и влажностью) (табл. 3 и рис. 3). Таким образом, полученные данные, вероятно, свидетельствуют о снижении интенсивности провоспалительных реакций по мере расселения человека из Африки в регионы с умеренным и арктическим климатом.

В работе исследован ряд изолированных коренных популяций разных регионов мира — 2 общины австралийских аборигенов, индейцы племени варо из Южной Америки и гренландские инуиты. Несмотря на более выраженные эффекты генетического дрейфа, указанные популяции также следуют общему паттерну генетической изменчивости, зафиксированному в работе. Генетическое разнообразие в этих изолятах действительно ниже, чем в других популяциях, проживающих в сходных климатических условиях. Однако генетическое разнообразие инуитов (существенно более низкое, чем в других северных популяциях, см. рис. 2), тем не менее, превышает таковое во всех южных популяциях, за исключением Эфиопии.

Сравнение инуитов и варо может быть одним из показательных моментов в обсуждении канализации/деканализации иммунного ответа в популяциях человека. Эти две популяции наиболее родственны друг другу и с момента отделения их от общего генетического корня (т.е. со времени миграции предков всех коренных жителей Америки через Берингию) прошло небольшое, в эволюционных масштабах, время — 10–12 тыс. лет. При этом генофонд варо по изученным генам иммунного ответа приобрел характеристики, сближающие варо не с «генетическими родственниками» — коренными популяциями Северной Америки и Сибири, а с популяциями, живущими в близких климатических условиях (африканцы и аборигенные жители Австралии). То есть гено-

фонд вариабельности подвергся вторичной канализации отбором, произошедшей довольно быстрыми темпами.

Насколько важны найденные различия в частотах провоспалительных аллелей с точки зрения генетики распространённых болезней? Принимая во внимание связь Th1- и Th2-опосредованного иммунного ответа с путями реализации подверженности к аутоиммунным, атопическим и аллергическим заболеваниям, можно предполагать, что поддерживаемый отбором «уклон» в сторону одного из путей может быть важным фактором предрасположенности к указанным комплексным болезням. Например, хорошо доказаны различия между африканцами и европейцами по встречаемости астмы и аллергии. Эти фенотипы встречаются у афроамериканцев с частотой в два раза и более выше, чем у белых американцев [12, 22, 43], в то время как частота этих болезней в Африке остается очень низкой [5, 16]. Можно предположить, что канализованная необходимостью мощного клеточного ответа на паразитарные инфекции в Африке, иммунная система в других средовых условиях продуцирует «избыточный» потенциал иммунного ответа, приводящей к росту частоты атопий и аллергий. С точки зрения гипотезы деканализации, это есть проявление криптической изменчивости (скрытой в канализованных условиях и проявляющейся при деканализации), а с точки зрения гипотезы «предковой предрасположенности» — проявление генетической подверженности к

болезням, связанной с эффектом аллелей, накопленных в предковых популяциях.

Высокая частота провоспалительных аллелей в «южных» популяциях может быть предметом внимания здравоохранения в ближайшем будущем, особенно в развивающихся странах с быстро растущей экономикой. Среда и образ жизни в таких обществах с ростом промышленного производства подвергается так называемой «вестернизации» — переходу к урбанизированному индустриальному обществу. Например, в Индии частота астмы, в целом, остается низкой. В недавнем мультицентровом исследовании распространенность астмы у детей была зафиксирована на уровне 2,4%. Однако, в быстро развивающемся Бангалоре заболеваемость детской астмой за 20 лет возросла с 9 до 29,5% [37].

В целом, полученные в настоящей работе данные в рамках исходной гипотезы можно суммировать следующим образом (рис. 5).

1. В предковой популяции современного человека в Африке сложились канализованные направленным отбором отношения генотип-среда, обеспечивающие эффективный иммунный ответ на паразитарные инфекции за счёт сдвига баланса иммунной системы в сторону Th2-пути. Эта канализованная система сохранилась и у современных африканцев и в других коренных популя-

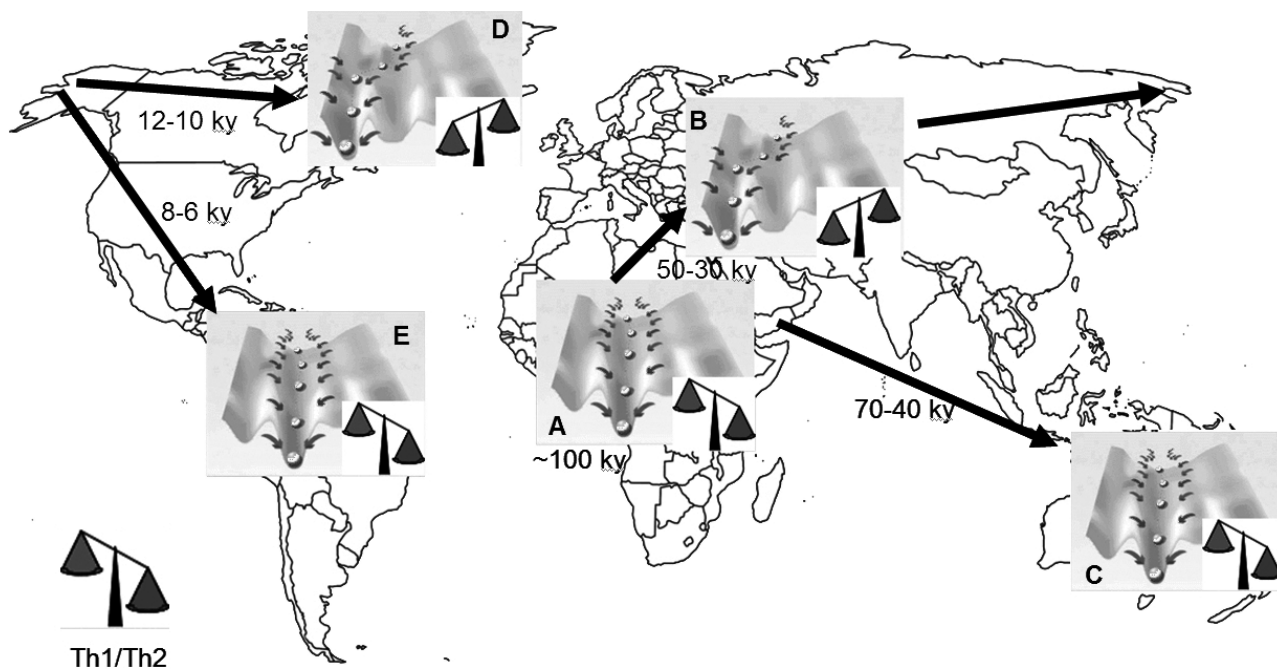


Рис. 5. Гипотеза канализации и деканализации генетического ландшафта иммунной системы в ходе расселения современного человека. Генетический ландшафт изображен в виде рельефа канализованных состояний, (долины), действие канализирующих средовых факторов показано стрелками (по [31]). Th1/Th2 — гипотетический баланс основных путей иммунного ответа, исходя из предположения о деканализации иммунной системы в ходе расселения человека. Ку — тысяч лет назад.

А. Канализованный ландшафт в предковых и современных африканских популяциях. В. Расселение в Евразию и деканализация ландшафта за счёт ослабления действия канализирующих факторов среды. Сдвиг баланса Th1/Th2. С. Заселение Австралии, сохранение канализованного ландшафта. D. Заселение Америки с территории Азии, сохранение деканализованного ландшафта у инуитов. E. Заселение Южной Америки. Вторичная канализация генетического ландшафта исходными средовыми факторами.

циях экваториального и тропического климатического пояса;

2. По мере расселения современного человека из Африки в регионы с умеренным и арктическим климатом, прослеживается снижение интенсивности провоспалительных реакций, свидетельствующее, согласно нашей гипотезе, о возможном смещении баланса иммунного ответа в сторону Th1-пути. Средовые факторы, связанные с адаптацией к экваториальному тропическому климату и специфической для него инфекционной нагрузкой, сменились средой, требующей адаптации к более суровому климату и большей эффективности гуморального иммунного ответа. Исчез канализирующий средовой фактор и произошла деканализация системы. В современных популяциях эта деканализация может проявляться повышенной подверженностью ряду распространённых заболеваний, унаследованной от предковых популяций, где эта подверженность была криптической (скрытой);

3. При возвращении популяций, прошедших долгий путь изменения частот генов, в исходные средовые условия тропического климата (например, варао), канализирующий средовой фактор возвращается и оказывается достаточно сильным, чтобы вернуть частоты функционально значимых провоспалительных аллелей в близкое исходному состояние.

Таким образом, в настоящей работе выявлено систематическое изменение частот аллелей, играющих роль в воспалительных реакциях и иммунном ответе, в популяциях человека по мере расселения из Африки. Показано, что эти изменения связаны со сменой климато-географических условий среды обитания, опосредованы естественным отбором, имеют отношение к подверженности распространённым болезням, и могут быть объяснены с позиций гипотезы канализации/деканализации взаимоотношений генотип—среда под действием естественного отбора. Несомненно, для более убедительных доказательств исходной гипотезы требуются дальнейшие исследования на более представительных выборках генов и маркёров. Работа в этом направлении находится в фокусе нашего внимания.

Список литературы

- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях (3-е перераб. и дополн. изд.). — М.: ИКЦ Академкнига, 2003. — 431 с.
- Гончарова И.А., Х. Гамаль Абд Эль-Азиз Наср, Белобородова Е.В., Ожегова Д.С., Степанов В.А., Пузырев В.П. Полиморфизм генов-модификаторов иммунного ответа при заболеваниях печени различной этиологии // Медицинская генетика. — 2010. — №12. — С. 20—24.
- Степанов В.А. Геномы, популяции, болезни: этническая геномика и персонализированная медицина // Acta Naturae. — 2010. — №4. — С. 18—34.
- Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции (теория стабилизирующего отбора). — М.—Л.: Изд-во АН СССР, 1946. — 396 с.
- Addo-Yobo E.O., Woodcock A., Allotey A., Baffoe-Bonnie B., Strachan D., Custovic A. Exercise induced bronchospasm in Ghana: differences in prevalence between urban and rural schoolchildren // PLoS Med. — 2007. — e70.
- Baldini M. et al. A Polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E // American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology. — 1999. — Vol. 20. — P. 976—983.
- Bethony J., Brooker S., Albonico M., Geiger S.M., Loukas A., Diemert D. et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm // Lancet. — 2006. — Vol. 367. — P. 1521—1532.
- Buckova D., Holla L.I., Schuller M., Znojil V., Vacha J. Two CD14 promoter polymorphisms and atopic phenotypes in Czech patients with IgE-mediated allergy // Allergy. — 2003. — Vol. 58. — P. 1023—1026.
- Buckova D., Holla L.I., Znojil V., Vasku A. Polymorphisms of the CD14 gene and atopic phenotypes in Czech patients with IgE-mediated allergy // J. Hum. Genet. — 2006. — Vol. 51. — P. 977—983.
- Candelaria, P.V. et al. Association between asthma-related phenotypes and the CC16 A38G polymorphism in an unselected population of young adult Danes // Immunogenetics. — 2005. — Vol. 57. — P. 25—32.
- Church M.K., Hiroi J. Inhibition of IgE-dependent histamine release from human dispersed lung mast cells by anti-allergic drugs and salbutamol // Br. J. Pharmacol. — 1987. — Vol. 90. — P. 421—429.
- Crater D.D. et al. Asthma hospitalization trends in Charleston, South Carolina, 1956 to 1997: twenty-fold increase among black children during a 30-year period // Pediatrics. — 2001. — Vol. 108. — P. E97.
- Di Rienzo A., Hudson R.R. An evolutionary framework for common diseases: the ancestral-susceptibility model // Trends Genet. — 2005. — Vol. 21, №11. — P. 596—601.
- Freidin M.B., Rudko A.A., Kolokolova O.V., Strelis A.K., Puzyrev V.P. Association between the 1188 A/C polymorphism in the human IL12B gene and Th1-mediated infectious diseases // International journal of immunogenetics. — 2006. — Vol. 33. — P. 231—232.
- Gibson G. Decanalization and the origin of complex disease // Nature Review Genetics. — 2009. — Vol. 10, №2. — P. 134—140.
- Godfrey R.C. Asthma and IgE levels in rural and urban communities of The Gambia // Clinical & Experimental Allergy. — 1975. — Vol. 5. — P. 201—207.
- Hancock A.M., Witonsky D.B., Alkorta-Aranburu G. et al. Adaptations to climat-mediated selective pressures in humans // PLoS Genetics. — 2011. — Vol. 7, №4. — e1001375. doi:10.1371/journal.pgen.1001375
- Hughes R.G. Environmental influences on helminthiasis and nutritional status among Pacific schoolchildren // Int. J. Environ. Health Res. — 2004. — Vol. 14. — P. 163—177.
- Iwanaga T. et al. Polymorphism of the mast cell chymase gene (CMA1) promoter region: lack of association with asthma but association with serum total immunoglobulin E levels in adult atopic dermatitis // Clin. Exp. Allergy. — 2004. — Vol. 34. — P. 1037—1042.
- Izuhara K., Yanagihara Y., Hamasaki N., Shirakawa T., Hopkin J.M. Atopy and the human IL-4 receptor alpha chain // J. Allergy Clin. Immunol. — 2000. — Vol. 106. — P. S65—71.
- Jobling M.A., Hurles M., Tyler-Smith C. Human Evolutionary Genetics: Origins, Peoples and Diseases. — New York: Garland Science, 2004. — 523 p.
- Joseph C.L., Ownby D.R., Peterson E.L., Johnson C.C. Racial differences in physiologic parameters related to asthma among middle-class children // Chest. — 2000. — Vol. 117. — P. 1336—1344.
- Khoo S.K. et al. Associations of the IL12B promoter polymorphism in longitudinal data from asthmatic patients 7 to 42 years of age // Journal of Allergy & Clinical Immunology. — 2004. — Vol. 113. — P. 475—481.

24. Kim Y.S. et al. Uteroglobin gene polymorphisms affect the progression of immunoglobulin A nephropathy by modulating the level of uteroglobin expression // *Pharmacogenetics*. — 2001. — Vol. 11. — P. 299–305.
25. Laing I.A. et al. A polymorphism of the CC16 gene is associated with an increased risk of asthma // *Journal of Medical Genetics*. — 1998. — Vol. 35. — P. 463–467.
26. Lappalainen T., Salmela E., Andersen P.M. et al. Genomic landscape of positive natural selection in Northern European populations // *European Journal of Human Genetics*. — 2010. — Vol. 18. — P. 471–478.
27. Le Souef P.N., Goldblatt J., Lynch N.R. Evolutionary adaptation of inflammatory immune responses in human beings // *Lancet*. — 2000. — Vol. 356. — P. 242–244.
28. LeVan T.D. et al. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity // *Journal of Immunology*. — 2001. — Vol. 167. — P. 5838–5844.
29. Litonjua A.A., Gong L., Duan Q.L., Shin J., Moore M.J., Weiss S.T., Johnson J.A., Klein T.E., Altman R.B. Very important pharmacogene summary ADRB2 // *Pharmacogenet Genomics*. — 2010 P. — Vol. 1. — P. 64–69.
30. Mantile G. et al. Human Clara cell 10-kDa protein is the counterpart of rabbit uteroglobin // *J. Biol. Chem.* — 1993. — Vol. 268. — P. 20343–20351.
31. McGrath J.J., Hannan A.J., Gibson G. Decanalization, brain development and risk of schizophrenia // *Transl. Psychiatry*. — 2011. — Vol. 1. — e14.
32. McKnight T.L., Hess D. Climate Zones and Types. Physical Geography: A Landscape Appreciation. — Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. — 242 p.
33. Mitsuyasu H. et al. Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis // *J. Immunol.* — 1999. — Vol. 162. — P. 1227–1231.
34. Neel J.V. Diabetes Mellitus: A «Thrifty» Genotype Rendered Detrimental by «Progress»? // *Am. J. Hum. Genet.* — 1962. — Vol. 14 №4. — P. 353–362
35. Neel J.V. The «thrifty genotype» in 1998 // *Nutr. Rev.* — 1999. — Vol. 57. — P. S2–9.
36. O'Donnell A.R., Toelle B.G., Marks G.B., Hayden C.M., Laing I.A., Peat J.K., Goldblatt J., Le Souef P.N. Age-specific relationship between CD14 and atopy in a cohort assessed from age 8 to 25 years // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2004. — Vol. 169. — P. 615–622.
37. Paramesh H. Epidemiology of asthma in India // *Indian J. Pediatr.* — 2002. — Vol. 69. — P. 309–312.
38. Peel M.C., Finlayson B.L., McMahon T.A. Updated world map of the Koeppen-Geiger climate classification // *Hydrol. Earth Syst. Sci.* — 2007. — Vol. 11. — P. 1633–1644.
39. Ramsay C.E., Hayden C.M., Tiller K.J. et al. Association of polymorphisms in the s 2-adrenoreceptor gene with higher levels of parasitic infection // *Human Genet.* — 1999. — Vol. 104. — P. 269–274.
40. Sabeti P.C., Schaffner S.F., Fry B. et al. Positive natural selection in the human lineage // *Science*. — 2006. — Vol. 312. — P. 1614–1620.
41. Scharloo J. Canalization: genetic and developmental aspects // *Annual Review of Ecology and Systematics*. — 1991. — Vol. 22. — P. 65–93.
42. Siegal P., Bergman J. Waddington's canalization revisited: developmental stability and evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2002. — Vol. 99, №16. — P. 10528–10532.
43. Von Behren J., Kreutzer R., Smith D. Asthma hospitalization trends in California, 1983–1996 // *J. Asthma*. — 1999. — Vol. 36. — P. 575–582.
44. Waddington C.H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters // *Nature*. — 1942. — Vol. 150. — P. 63–65.
45. Weidinger S. et al. Association study of mast cell chymase polymorphisms with atopy // *Allergy*. — 2005. — Vol. 60. — P. 1256–1261.
46. WHO Expert Committee. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. — World Health Organ Tech Rep Ser. 2002. — 912 p.
47. Wiertsema S.P. et al. Association of CD14 promoter polymorphism with otitis media and pneumococcal vaccine responses // *Clin. Vaccine Immunol.* — 2006. — Vol. 13. — P. 892–897.

Decanalization of immune response during the dispersion of modern humans: the relationships of genetic diversity in immune system genes and climatic and geographic factors

Stepanov V.A.¹, Candelaria P.², Khoo S.², Zhang G.², Trifonova E.A.¹, Simonova K.V.¹, Bocharova A.V.¹, Laing I.A.², Hayden C.², Backer V.³, Bjerregaard P.³, Lynch N.⁴, Hagel I.⁴, Musk A.W.⁵, Bittles A.⁶, Goldblatt J.², Le Souef P.²

¹ — Research Institute for Medical Genetics SB RAMS, Nab. Ushayky 10, 634050 Tomsk, Russia, e-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru

² — School of Paediatrics and Child Health, University of Western Australia, 6009 Perth, Australia

³ — Bispebjerg Hospital, Bispebjerg Bakke 23, 2400 Copenhagen NV, Denmark

⁴ — Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

⁵ — Department of Respiratory Medicine, Sir Charles Gairdner Hospital, Perth, Australia

⁶ — Centre for Comparative Genomics, Murdoch University South Street, 6150 Perth, Australia

Allele frequencies of seven genes contributing to cellular immune response to parasitic infections, polarization of immune response to Th2 type and associated with atopic and allergic phenotypes was studied in 15 World populations. Selection of genes and populations under study was based on the hypothesis of a shift in preferential immune response balance from Th2 to Th1 type during migration of modern humans from equatorial Africa to moderate and arctic climate regions. It is suggested that this shift was due to natural selection process of adaptation of populations to a new environment. We found the systematic change in frequencies of alleles involved in immune response and inflammatory reactions during the dispersion of human population from Africa. These changes may contribute to changes in a structure of common diseases and be explained by the hypothesis of canalization/decanalization of genotype-environment relationships occurring under the pressure of natural selection.

Key words: natural selection, genetic diversity, immune system, human populations, decanalization hypothesis

Ассоциации полиморфных вариантов генов репарации ДНК и метаболизма ксенобиотиков с уровнем хромосомных нарушений в лимфоцитах человека*

Бабушкина Н.П., Кучер А.Н., Лебедев И.Н., Васильев С.А., Тимошевский В.А., Брагина Е.Ю., Суханова Н.Н., Торхова Н.Б., Яковлева Ю.С.

ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН, 634050, г.Томск, ул. Набережная р. Ушайки, 10, тел. (3822) 513146, факс (3822) 513744, e-mail: nad.babushkina@medgenetics.ru

Представлены данные о частотах полиморфных вариантов генов систем репарации ДНК (*MLH1* (rs1799977), *PMS2* (rs1805321), *XRCC1* (rs25487)), контроля клеточного цикла (*TP53* (rs1042522)) и детоксикации ксенобиотиков (*Cyp2C19* (rs4244285), *GSTT1* (del) и *GSTM1* (del)) у индивидов с наличием в организме инкорпорированного плутония-239 и в контрольной группе, а также в подгруппах, характеризующихся различной частотой хромосомных аномалий (три группы сравнения: с высоким и низким уровнем частоты хромосомных aberrаций, анеуплоидии и микроядер). Ни по одному из исследованных локусов не зарегистрировано статистически значимых различий по частотам аллелей и генотипов между группой контроля и группой с наличием в организме инкорпорированного плутония-239. Однако установлены статистически значимые различия в частотах генотипов по rs1799977 гена *MLH1* между подгруппами с высоким и низким уровнем хромосомных aberrаций ($p=0,047$), а также по частоте комбинаций генотипов *GSTT1/GSTM1* между подгруппами с разным уровнем анеуплоидии ($p=0,032$). Для других исследованных локусов отмечены некоторые различия по частотам генотипов между группами с высокой и низкой частотой хромосомных нарушений разных типов, которые, однако, не достигали уровня статистической значимости. Частоты аллелей между сравниваемыми группами варьировали в меньшей степени; статистически значимые различия зарегистрированы только между подгруппами с разным уровнем хромосомных aberrаций (для rs25487 в гене *XRCC1*, $p=0,039$).

Ключевые слова: индивидуальная радиочувствительность, полиморфизм генов, репарация ДНК, хромосомные aberrации, микроядра

Введение

В настоящее время существование феномена индивидуальной радиочувствительности ни у кого не вызывает сомнения, так же как и наличие генетического компонента, оказывающего влияние на способность организма выдерживать воздействие ионизирующего излучения. Это подтверждается сходной индивидуальной радиочувствительностью в парах однояйцевых близнецов, а также повышенной радиочувствительностью пациентов с наследственными заболеваниями, обусловленными мутациями генов репарации ДНК. Поэтому оценка индивидуальной радиочувствительности и изучение определяющих её факторов являются одними из приоритетных направлений современной радиобиологии. Активное использование ионизирующих излучений в повседневной жизни (рентгенология, радиотерапия, атомная электроэнергетика) увеличивает техногенную нагрузку на человека и его среду обитания. Контакт с ионизирующим излучением происходит, преимущественно, в диапазоне малых доз, реакция организма на которые может заметно варьировать. Известно, что существуют различия по радиочувствительности между видами, популяциями, поло-

возрастными группами; реакция на радиацию может зависеть от физиологического состояния организмов, отличаться у клеток разных типов, зависеть от стадии дифференцировки и стадии клеточного цикла [36]. Таким образом, при равном радиационном воздействии реакция организма может отличаться у разных индивидов. Пока нет однозначных суждений о том, какие именно гены являются ключевыми в определении индивидуальной радиочувствительности. Однако часто к кандидатным относят гены репарации ДНК, контроля клеточного цикла, метаболизма ксенобиотиков и др. [2].

В настоящем исследовании изучен полиморфизм генов систем репарации ДНК (мисс-матч — *MLH1* (rs1799977) и *PMS2* (rs1805321); эксцизионной репарации оснований — *XRCC1* (rs25487)), контроля клеточного цикла (*TP53* (rs1042522)), детоксикации ксенобиотиков (*Cyp2C19* (rs4244285) — первой фазы, *GSTT1* (del) и *GSTM1* (del) — второй фазы) в группах индивидов, с одной стороны — дифференцированных по наличию/отсутствию в организме инкорпорированного плутония-239, с другой, — характеризующихся различной частотой хромосомных аномалий.

Настоящее исследование выполнено в рамках государственного контракта №16.512.11.2063 ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2013 годы».

Материалы и методы

Всего обследовано 145 чел., из них 71 чел. — лица с наличием в организме инкорпорированного плутония-239 (активность 10—188 нКи) (работники ОАО «Сибирский химический комбинат», г.Северск; далее «Pu»). 74 чел., не имеющие отношения к плутониевому производству, составили контрольную группу (далее «К») (табл. 1). Все индивиды в обеих группах были мужского пола, преобладали представители русской национальности. От каждого индивида получено информированное согласие на проведение генетического исследования.

Культивирование лимфоцитов периферической крови и приготовление препаратов хромосом для цитогенетического анализа проводили с использованием стандартных методов [29]. Анализ хромосомных нарушений проводился с использованием классических цитогенетических (применялась рутинная окраска хромосом по Гимза и дифференциальная окраска хромосом по G-методу (Романовского—Гимза)) [29] и молекулярно-цитогенетических методов [12] в случае учёта микроядер. Более подробно использованные молекулярно-цитогенетические методы описаны нами ранее [4].

У каждого индивида проанализировано 300 рутинно окрашенных метафаз и 100 метафазных пластинок с дифференциальной окраской. Частоту аномальных сегрегационных событий для каждой пары анализируемых на одном препарате хромосом оценивали в 1000 двухъядерных клеток, в которых проводили учет микроядер.

ДНК для проведения молекулярно-генетического анализа выделяли из лимфоцитов периферической крови по стандартной методике с фенол-хлороформной очисткой [3]. Полиморфные варианты генов анализировали с помощью ПЦР-ПДРФ. Структура праймеров, температура отжига и паттерн рестрикции представлены в табл. 2. Программы амплификации включали следующие блоки: первичная денатурация в течение 5—7 мин при 94—95°C, 30—35 циклов отжига праймеров при специфической для каждого snp температуре (табл. 2), элонгация цепи при 72°C и денатурация при 94°C. Программы завершала финальная элонгация в течение 5—10 мин при 72°C. Для определения генотипов продукты амплификации подвергали гидролизу специфической эндонуклеазой рестрикции (согласно протоколу фирмы-производителя), затем продукты рестрикции фракционировали в 3%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Генотипирование полиморфных

вариантов генов *GSTT1* и *GSTM1* проводили с помощью мультиплексной ПЦР. Отсутствие соответствующих фрагментов размером 131 и 114 п.н. указывало на наличие гомозигот по «нулевым» аллелям генов *GSTT1* и *GSTM1* соответственно. Наличие этих фрагментов свидетельствовало о наличии нормальной копии гена в гомо-, либо гетерозиготном состоянии. Для внутреннего контроля амплификации определяли фрагмент гена *ER* размером 181 п.н.

Различия по величинам усреднённых значений частот хромосомных нарушений между сравниваемыми группами оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди—Вайнберга проверяли с помощью критерия χ^2 ; для сравнения частот генотипов и аллелей между различными группами использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и точный тест Фишера.

Результаты и обсуждение

Важным вопросом в оценке индивидуальной радиочувствительности является анализ зависимости уровня хромосомных нарушений в клетках человека от носительства различных вариантов генов, продукты которых участвуют в репарации ДНК, метаболизме ксенобиотиков и других процессах в организме, связанных с ответом на воздействие радиации. Ранее нами был проведен анализ частоты структурных и числовых хромосомных нарушений и микроядер в лимфоцитах периферической крови у индивидов с инкорпорированным плутонием и лиц контрольной группы, никогда не контактировавших с радиацией в рамках профессиональной деятельности [4]. Основные результаты данного исследования представлены в табл. 3. В группе индивидов с инкорпорированным плутонием-239 наблюдалась статистически значимо более высокая частота аберраций хромосомного типа по сравнению с контрольной группой. Напротив, частота аберраций хроматидного типа не отличалась статистически значимо между обследованными группами, что согласуется с известными механизмами хронического воздействия ионизирующего излучения. Кроме того, уровень микроядер, соответствующих отставшим фрагментам хромосом и целым хромосомам, у работников плутониевого производства был статистически значимо выше, чем в контрольной группе. Наконец, суммарная частота анеуплоидии по шести исследованным хромосомам также оказалась выше в лимфоцитах периферической крови индивидов с инкорпорированным плутонием-239 по сравнению с контрольной группой.

Таблица 1

Характеристика сформированных для обследования групп индивидов с инкорпорированным плутонием и контрольных лиц

Группа	Обозначение группы	Возраст, лет	Активность плутония, нКи	Число индивидов
Контрольная группа	"К"	24—70 (53,0±9,42)	—	74
Лица с инкорпорированным плутонием-239	"Pu"	26,5—70 (56,7±9,5)	10—188	71

По результатам цитогенетического исследования были выделены подгруппы индивидов с разным уровнем хромосомных нарушений: хромосомных аберраций (ХА), анеуплоидии (Ан), микроядер (МЯ) (табл. 4). Между сформированными группами проводилось сравнение частот полиморфных вариантов генов *MLH1* (rs1799977), *PMS2* (rs1805321), *XRCC1* (rs25487), *TP53*

(rs1042522), *Cyp2C19* (rs4244285), *GSTT1* (del) и *GSTM1* (del).

Ни по одному из исследованных локусов не установлено статистически значимых различий по частотам аллелей и генотипов между группой контроля и группой индивидов с инкорпорированным плутонием-239, что позволило нам в дальнейшем формировать подгруппы с разным уровнем

Таблица 2

Структура праймеров, параметры ПЦР и рестрикции для определения генотипов по исследованным маркерам

Ген	Полимор- физм	Локализа- ция в гене	Последовательность праймеров	Температура отжига праймеров	Метод detec- ции	Продукты гидролиза, п.н.	Источ- ник
<i>MLH1</i>	rs1799977	Экзон 8	F: 5`-ATAGTTTGCTGGTGGAGATA-3` R: 5`-ATGTGATGGAATGATAAACCC-3`	56°C	ПЦР / ПДРФ BccI	G: 243 A: 161+82	*
<i>PMS2</i>	rs1805321	Экзон 11	F: 5`-AGAACAAGCCTCACAGCCCA-3` R: 5`-CCGTGTCTGGGATGCTGAAC-3`	64 °C	ПЦР / ПДРФ Bst MA I	T: 243 C: 136+107	*
<i>XRCC1</i>	rs25487	Экзон 10	F: 5`-TTGTGCTTTCTCTGTGTCCA-3` R: 5`-TCCTCCAGCCTTTTCTGATA-3`	55°C	ПЦР / ПДРФ Msp I	A: 615 G: 377+238	*
<i>TP53</i>	rs1042522	Экзон 4	F: 5`-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3` R: 5`-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC-3`	63°C	ПЦР / ПДРФ Bst FN I	C: 199 G: 113+86	*
<i>Cyp2C19</i>	rs4244285	Экзон 5	F: 5`-AATTACAACCAGAGCTTGGC-3` R: 5`-TATCACTTTCCATAAAAGCAAG-3`	60°C	ПЦР / ПДРФ Sma I	A: 169 G: 120+49	[8]
<i>GSTT1</i>	Протяжённая делеция ~10 тыс. п.н.		F: 5`-GGTCATTCTGAAGGCCAAGG-3` R: 5`-TTTGTGGACTGCTGAGGACG-3`	65°C → 61 °C (градиент)	Мультиплек- сная ПЦР In/Del	"+": 13 " ": —	[32]
<i>GSTM1</i>	Протяжённая делеция ~10 тыс. п.н.		F: 5`-TGCTTCACGTGTTATGGAGGTTTC-3` R: 5`-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3`			"+": 114 " ": —	
Примечание. * — для конструирования последовательности праймеров исследуемых областей генов использовалась программа Vector NTI							

Таблица 3

Средние значения частоты хромосомных нарушений в исследованных группах (% ± ст.ошибка)

Тип хромосомных нарушений	Группа индивидов с инкорпорированным плутонием-239	Контрольная группа
Аберрации хромосомного типа	0,86±0,10*	0,33±0,12
Аберрации хроматидного типа	0,75±0,08	0,55±0,11
Суммарная частота анеуплоидии (хромосомы 2, 7, 8, 12, X, Y)	1,49±0,30*	0,73±0,23
Микроядра	0,78±0,07*	0,55±0,04

Примечание. * — статистически значимо более высокая частота в группе индивидов с инкорпорированным плутонием-239 по сравнению с контрольной группой (p<0,05)

Таблица 4

Характеристика групп, сформированных на основе уровня хромосомных нарушений в лимфоцитах периферической крови

Группа сравнения	Исходные группы (численность)	Критерий формирования	Объём выборки
>ХА	"Pu" (15) + "K" (2)	Уровень хромосомных аберраций выше (>) либо ниже (<) 2,5%	17
<ХА	"Pu" (30) + "K" (3)		33
>Ан	"Pu" (26) + "K" (5)	Уровень анеуплоидии 10‰ и выше (>) либо ниже (<)	31
<Ан	"K" (23)		23
>МЯ	"Pu" (26) + "K" (16)	Уровень микроядер выше 6‰ (>) либо ниже (<)	42
<МЯ	"Pu" (12) + "K" (25)		37

Примечание. "K" и "Pu" — см. табл. 1

хромосомных нарушений из обеих исходных групп (табл. 4). Отклонения наблюдаемого распределения генотипов от ожидаемого при равновесии Харди—Вайнберга тестировали как в исходных группах («Ри» и «К»), так и в подгруппах, различающихся по уровню хромосомных нарушений. В исходных группах по всем исследованным локусам наблюдалось соответствие равновесию Харди—Вайнберга (табл. 5). Соответствие наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому было зарегистрировано во всех подгруппах по изученным полиморфным вариантам в генах *CYP2C19*, *XRCC1* и *PMS2*, в пяти из шести подгрупп по гену *TP53* и в трёх из шести подгрупп по гену *MLH1*. В подгруппах с высокими уровнями хромосомных aberrаций, анеуплоидии и микроядер по полиморфному варианту в гене *MLH1* и в подгруппе с высоким уровнем анеуплоидии по полиморфному варианту в гене *TP53* распределение генотипов отличалось от равновесия Харди—Вайнберга. Во всех случаях (и для гена *TP53*, и для гена *MLH1*) отклонение было обусловлено отсутствием гомозигот по редкому аллелю и избытком гетерозигот. При этом, для полиморфного варианта гена *MLH1* в парах сравнений с высоким и низким уровнем хромосомных нарушений статистически значимые различия по распределению генотипов были установлены только между группами с хромосомными aberrациями выше 2,5% и ниже 2,5%, что соответствует фоновому уровню ($\chi^2=6,097$, $p=0,047$). Предрасполагающим к повышенному уровню хромосомных aberrаций оказался гетерозиготный генотип: OR=4,41 (CI: 1,14—14,29), $\chi^2=3,95$, $p=0,047$. Между другими сравниваемыми подгруппами (различающимися по уровню анеуплоидии и микроядер) по частотам генотипов rs179977 в гене *MLH1* не установлено статистически значимых отличий, как и по исследованному локусу в гене *TP53*. Вместе с тем, ситуация по «смещению» распределений частот генотипов (табл. 5) в подгруппах с высоким уровнем хромосомных нарушений не может быть случайной, так как данные подгруппы были сформированы из двух исходных групп (контрольной и группы с инкорпорированным плутонием-239 — табл. 5), в которых, по всем исследованным полиморфным вариантам наблюдалось соответствие равновесию Харди—Вайнберга, а между группами не было установлено статистически значимых различий по частотам генотипов.

При попарном сравнении подгрупп с разным уровнем хромосомных нарушений, помимо отмеченного выше гена *MLH1*, ещё только в двух случаях выявленные различия достигли уровня статистической значимости: для rs25487 гена *XRCC1* при сравнении подгрупп с высоким и низким уровнем хромосомных aberrаций и для сочетаний генотипов *GSTT1/GSTM1* — при сравнении подгрупп с высоким и низким уровнем анеуплоидии. Однако в отдельных парах сравнений для всех локусов наблюдались определённые отличия в характере распределения частот генотипов и аллелей, не достигавшие, тем не менее, значимого уровня. Следует отметить, что численности обследованных групп невелики, что может отражаться на статистической значимости полученных результатов.

По полиморфному варианту в гене *PMS2* статистически значимых различий по частотам аллелей и генотипов в подгруппах с разным уровнем хромосомных нарушений не зарегистрировано. Вместе с тем, наблюдается существенное (в 1,59 раза) различие по частоте носительства гетерозигот в подгруппах с высоким и низким уровнем хромосомных aberrаций (35,29 и 56,25% соответственно) (табл. 5).

Белки PMS2 и MLH1 являются компонентами системы пост-репликативной мисс-матч репарации (MMR). Они образуют гетеродимер, называемый MutL α , функционирующий совместно с гетеродимером MutS α или MutS β — субъединицей комплекса, узнающего нарушения спаривания двойной спирали ДНК (мисс-матчи). PMS2 обладает эндонуклеазной активностью, внося одноцепочечные разрывы в нить ДНК по краям участка с мисс-матчем. Деградацию повреждённого участка осуществляет экзонуклеаза EXO1. Показаны физические взаимодействия MutL α с ДНК-полимеразой III, также привлекаемой к процессу репарации. Эндонуклеаза PMS2 не может разрезать метилированную ДНК, поэтому таким путем могут репарироваться только нарушения, возникшие *de novo*. Кроме того, MutL α является частью BRCA1-ассоциированного комплекса, контролирующего стабильность генома — BASC (который содержит белки BRCA1, MSH2, MSH6, MLH1, ATM, BLM, PMS2), а также белкового комплекса RAD50-MRE11-NBS1. Этот комплекс динамичен и изменяется как на протяжении клеточного цикла, так и в пределах субклеточных доменов. MLH1 может также гетеродимеризоваться с MLH3 (MutL γ) и играть определённую роль в мейозе. Известно также, что PMS2 вовлечен в сигнальный путь, который при сильных повреждениях ДНК вызывает остановку клеточного цикла и ведет к апоптозу [19, 28]. Белки PMS2 и MLH1 играют важную роль в поддержании стабильности генома [22, 35]. Мутации в генах *PMS2* и *MLH1* могут приводить к некоторым наследственным онкологическим заболеваниям, таким как синдром Линча и синдром Туркота. Большинство семей с клинически верифицированным наследственным неполипозным колоректальным раком имеет мутации в генах *MLH1* и *MSH2*. Кроме того, мутации в *MLH1* могут вызвать синдром Мью—Торре, лобулярную карциному (LCIS), рак эндометрия [9, 20, 34].

В настоящем исследовании для замены в гене *XRCC1* (rs25487) также была выявлена некоторая специфика в распределении частот генотипов в разных подгруппах (табл. 5): частота гомозиготного генотипа по мажорному аллелю варьировала в пределах 35—59%, а гетерозиготного — 40—60%. Тем не менее, между сравниваемыми парами подгрупп статистически значимых различий по частотам генотипов не выявлено. По частотам аллелей различия регистрировались только при сравнении подгрупп с высоким и низким уровнем хромосомных aberrаций: аллель А является предрасполагающим к формированию структурных нарушений хромосом (OR=2,82 (CI: 1,05—7,66) $\chi^2=4,26$, $p=0,039$).

Таблица 5

Частоты аллелей и генотипов изученных локусов в исследованных группах

Полиморфизм	Группы							
	"Pu"	"K"	>XA	<XA	>An	<An	>МЯ	<МЯ
MLH1								
AA	39,44	37,84	23,53	42,42	26,67	35,71	26,19	29,73
AG	53,52	48,65	76,47	42,42	73,33	57,14	64,29	59,46
GG	7,04	13,51	0	15,15	0	7,14	9,52	10,81
A	66,2	62,16	61,76	63,64	63,33	63,04	58,33	59,46
PXB: χ^2 (p)	2,725 (>0,05)	0,086 (>0,05)	6,515 (<0,01)	0,229 (>0,05)	10,055 (<0,01)	1,043 (>0,05)	4,367 (<0,05)	2,014 (>0,05)
χ^2 (p) генотипы			6,097 (0,047)					
PMS2								
CC	21,43	22,22	29,41	18,75	30	26,09	28,57	18,92
CT	58,57	50	35,29	56,25	46,67	47,82	52,38	48,65
TT	20	27,78	35,29	25	23,33	26,09	19,05	32,43
C	50,71	47,22	47,06	46,88	53,33	50,00	54,76	43,24
PXB: χ^2 (p)	2,063 (>0,05)	0,001 (>0,05)	0,487 (>0,05)	1,446 (>0,05)	0,536 (>0,05)	0,117 (>0,05)	0,138 (>0,05)	0,003 (>0,05)
XRCC1								
GG	45,71	35,14	35,29	59,37	43,33	34,78	38,10	56,76
AG	42,86	55,41	41,18	37,5	46,67	60,87	52,38	40,54
AA	11,43	9,46	23,53	3,13	10	4,35	9,52	2,7
G	67,14	62,84	55,88	78,13	66,67	65,22	64,23	77,03
PXB: χ^2 (p)	0,058 (>0,05)	2,569 (>0,05)	0,462 (>0,05)	0,302 (>0,05)	0,075 (>0,05)	2,685 (>0,05)	0,832 (>0,05)	0,783 (>0,05)
χ^2 (p) аллели			4,259 (0,039)					
TP53								
GG	57,75	48,65	64,71	48,49	46,67	65,22	61,90	51,35
CG	36,62	44,59	35,29	39,39	53,33	30,43	38,10	43,24
CC	5,63	6,76	0	12,12	0	4,35	0	5,41
G	76,06	70,95	82,35	68,18	73,33	80,43	80,95	72,97
PXB: χ^2 (p)	0,002 (>0,05)	0,494 (>0,05)	0,781 (>0,05)	0,280 (>0,05)	3,967 (<0,05)	0,025 (>0,05)	2,325 (>0,05)	0,343 (>0,05)
Cyp2C19								
GG	77,14	69,86	88,24	68,75	83,33	60,87	63,41	81,08
GA	20	28,77	11,76	28,12	13,33	39,13	34,15	18,92
AA	2,86	1,37	0	3,13	3,34	0	2,44	0
G	87,14	84,25	94,12	82,81	90	80,43	80,49	90,54
PXB: χ^2 (p)	0,809 (>0,05)	0,512 (>0,05)	0,066 (>0,05)	0,005 (>0,05)	2,017 (>0,05)	1,361 (>0,05)	0,311 (>0,05)	0,404 (>0,05)
GSTT1/GSTM1								
+/+	46,48	39,19	47,06	45,46	56,67	30,43	47,62	43,24
+/-	36,62	47,3	47,06	39,39	36,67	43,48	33,33	43,24
-/+	11,27	4,05	0	12,12	0	21,74	9,52	10,81
-/-	5,63	9,46	5,88	3,03	6,66	4,35	9,52	2,7
GSTT1 "+"	83,1	86,49	94,12	84,85	92	78,57	75,00	86,49
GSTM1 "+"	57,75	43,24	47,06	57,58	60	50	57,14	54,05
χ^2 (p) сочетания генотипов					8,78 (0,032)			
Примечание. Частоты приведены в процентах; PXB — показатели (χ^2 и p) оценки соответствия частот генотипов исследованных групп равновесию Харди—Вайнберга; приведены только статистически значимые различия, полученные при сравнении частот аллелей (χ^2 (p) аллели) и генотипов (χ^2 (p) генотипы) между группами								

Не исключено влияние этой нуклеотидной замены на репарацию хромосомных aberrаций, что согласуется с данными литературы. В ряде работ показано, что высокая частота аллеля А ассоциирована с повышением уровня различных хромосомных нарушений [14, 18, 23]. В настоящем исследовании частота редкого аллеля А у индивидов с высоким уровнем хромосомных aberrаций составляет 44,12%, в то время как в группе с низким уровнем — в два раза ниже (21,88%); в остальных группах частота данного аллеля находится в пределах 23–36%.

Белок XRCC1 принимает участие в эксцизионной репарации оснований ДНК (BER), взаимодействуя с другими ферментами этой системы. Полиморфизм в гене *XRCC1* является фактором риска развития разных форм онкопатологии. Однако даже при метаанализах ассоциации полиморфных вариантов этого гена с онкологическими заболеваниями в одних случаях подтверждаются [17], в других — нет [16]. Показано, что аллель 399Gln (аллель А) гена *XRCC1* ассоциирован с высоким уровнем микроядер [14] и повышенным уровнем разрывов ДНК, т.е. снижением способности фермента репарировать повреждения ДНК [18, 23]. В нашем исследовании не установлено влияние данной замены на уровень микроядер.

По SNP rs1042522 в гене *TP53* в подгруппах с высокими уровнями хромосомных aberrаций, анеуплоидии, микроядер гомозиготы СС не выявлены. В других подгруппах индивидов их частота не превышает 12,12%. В разных подгруппах разброс частот альтернативных гомозигот и гетерозигот составляет около 20% (табл. 5). Статистически значимых различий между сравниваемыми подгруппами не выявлено.

Белок p53, кодируемый геном *TP53*, является опухолевым супрессором, индуцирующим остановку клеточного роста или апоптоз в зависимости от физиологических обстоятельств и типа клеток. Кроме того, он вовлечён в контроль клеточного цикла как транс-активатор множества генов, участвующих в клеточном делении, апоптозе и репарации ДНК [6]. Количество p53 возрастает в трансформированных клетках разных типов. Герминативное носительство мутаций в гене *TP53* в 80% случаев приводят к формированию четырех типов раковых новообразований: это рак молочной железы, саркома мягких тканей и костей, опухоли головного мозга и аденокарциномы [13, 24, 27]. На оставшиеся 20% приходится множество более редких опухолей. В целом же, примерно в 60% всех раковых образований выявляются мутации в гене *TP53*, приводящие либо к инактивации гена, либо к нарушению функций кодируемого им белка p53. Кодон 72 расположен в пролин-богатом регионе белка и замена аминокислоты может менять структуру SH3-связывающего домена [10]. Этот кодон является чрезвычайно вариабельным, в нем описано 5 несинонимичных нуклеотидных замен, и только замена Arg (дикий тип) на Pro является полиморфным вариантом, остальные (замены на Cys, Gly, His, Leu) представляют собой мутации [15]. Имеются данные, что полиморфный вариант *TP53* Pro72 (по сравнению с диким типом — Arg72)

снижает апоптотическую функцию белка, а также связан с увеличением радиочувствительности клетки [10].

По замене в гене *Cyp2C19* (rs4244285) в подгруппах с низкими уровнями анеуплоидии и микроядер, а также в подгруппе с высоким уровнем хромосомных aberrаций не был зарегистрирован генотип AA (табл. 5). Однако частоты гетерозигот и альтернативных гомозигот в этих группах неодинаковы и варьируют для GA от 11,76% (высокий уровень хромосомных aberrаций) до 39,13% (низкий уровень анеуплоидии). В гене *Cyp2C19* частота мажорного аллеля w находилась в границах от 80,43% (подгруппа с низким уровнем анеуплоидии) до 94,12% (подгруппа с высоким уровнем хромосомных aberrаций). Статистически значимые различия между сравниваемыми подгруппами не зарегистрированы.

Гены детоксикации ксенобиотиков, которые играют важную роль в индивидуальной чувствительности к воздействию различных токсических агентов окружающей среды, представляют большой интерес с точки зрения феномена индивидуальной радиочувствительности. Группа ферментов I фазы детоксикации ксенобиотиков представлена семейством цитохромов P-450, которое включает в себя более 60 генов [21, 25]. Фермент CYP2C19 метаболизирует широкий спектр лекарственных препаратов [33]. Основной генетический дефект, найденный у так называемых «медленных» метаболизаторов (S)-мефенитоина — это точковая замена G на A в пятом экзоне в положении 681 гена *CYP2C19* (*CYP2C19*2*), приводящая к появлению aberrантного сайта сплайсинга [8]. Этот полиморфизм обуславливает нарушение способности цитохрома P450 метаболизировать антиэпилептический препарат (S)-мефенитоин, омепразол, прогуйанил, некоторые барбитураты и ряд других соединений [31, 38].

Делеционный генотип («») в гене *GSTT1* (табл. 5) в сравниваемых подгруппах встречался с частотами в интервале от 5,88% (подгруппа с высоким уровнем хромосомных aberrаций) до 25,00% (подгруппа с высоким уровнем микроядер). Генотип с делецией в гене *GSTM1* регистрировался с высокой частотой (от 40 до 57% в разных подгруппах). По сочетанию генотипов *GSTT1/GSTM1* редкими являются «-/» и «-/-». Частота сочетания «-/» варьирует от 0% (в подгруппах с высокими уровнями хромосомных aberrаций и анеуплоидии) до 21,74% (в подгруппе с низким уровнем анеуплоидии). Частота сочетания «-/-» находится в пределах 3,03–9,52%. В большинстве случаев преобладающим является сочетание «+/» (от 30,43 до 56,67%). Между группами с высоким и низким уровнем анеуплоидии выявляются статистически значимые различия по генотипическим комбинациям *GSTT1/GSTM1*: $\chi^2=8,78$, $p=0,032$.

Глутатион-S-трансферазы GSTT1 и GSTM1 относятся к группе ферментов второй фазы биотрансформации ксенобиотиков, на которой различными гидролазами и трансферазами проводится нейтрализация токсичных продуктов первой фазы детоксикации. Глутатион-S-трансферазы играют основную роль в обеспечении резистентности клеток к перекисному окислению липидов, алкилированию бел-

ков, негативному воздействию свободных радикалов, приводящих к предотвращению повреждений ДНК [1]. Мутации генов семейства *GST* вовлечены в патогенез различных форм рака и являются факторами риска развития ряда заболеваний. «Нулевые» генотипы *GSTM1* или *GSTT1* (полная делеция гена), как правило, ассоциированы с повышенной частотой сестринских хроматидных обменов (СХО), по сравнению с нормальным генотипом при воздействии таких химических соединений, как 1,2-эпоксид-3-бутен и диэпоксидбутан [11]. «Нулевой» *GSTM1* генотип обуславливает также увеличение частоты хромосомных aberrаций хроматидного типа [30]. У индивидов с сочетанием гомозигот по «нулевым» аллелям генов *GSTM1* и *GSTT1* описана повышенная частота aberrаций хромосомного типа при воздействии тех же соединений. Для гомозиготных по «нулевому» аллелю генов *GSTM1* и *GSTT1* индивидов при курении характерны повышенная частота хромосомных aberrаций и высокий риск развития рака легкого [5, 7]. В то же время, в ряде других исследований отмечаются противоположные результаты: не подтверждаются ассоциации рассмотренных генотипов с хромосомными aberrациями и риском развития какой-либо формы рака [26, 37], в некоторых исследованиях [39] указывается даже протективная в отношении онкопатологии роль «нулевого» генотипа по *GSTM1*.

Таким образом, в ходе выполнения настоящего исследования были изучены полиморфные варианты в семи генах. Выбранные для исследования гены кодируют белки, относящиеся к системам репарации ДНК, метаболизма ксенобиотиков, регуляции клеточного цикла и пролиферации. Для большинства исследованных локусов наблюдались отличия по распространенности генотипов между сравниваемыми подгруппами, различающимися по частоте встречаемости хромосомных нарушений разных типов. Однако статистически значимые отличия были выявлены только для полиморфного варианта в гене *MLH1* (при сравнении подгрупп с высоким и низким уровнем хромосомных aberrаций), а также для комбинаций генотипов *GSTT1/GSTM1* (между подгруппами с разным уровнем анеуплоидии). Частоты аллелей между сравниваемыми группами варьируют в меньшей степени; статистически значимые различия зарегистрированы только между подгруппами с разным уровнем хромосомных aberrаций (полиморфный вариант в гене *XRCC1*).

Специфика формирования выборок для настоящего исследования, а именно трудоемкость предварительного детального цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследования, обусловила, в конечном итоге, тот факт, что большинство выделенных групп с различными генотипами оказались малочисленными. Это существенно снижает вероятность получения статистически значимых отличий между обследованными группами и не позволяет однозначно оценить роль как отдельно взятых аллелей и генотипов, так и их сочетаний в формировании тех или иных хромосомных нарушений. Тем не менее, полученные данные указывают на возможность вовлечения отдельных

локусов генома в формирование индивидуальной чувствительности организма к воздействию плотно-ионизирующего излучения. Для подтверждения полученных результатов об ассоциации некоторых изученных полиморфных вариантов с уровнем хромосомных нарушений и высказанных предположений о возможной вовлеченности других полиморфизмов в риск возникновения цитогенетических нарушений необходимо продолжение исследований как на более обширных выборках, так и у представителей других этнических групп.

Список литературы

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Ивашенко Т.Э. и др. Геном человека и гены «предрасположенности». (Введение в предиктивную медицину). — СПб.: Интермедика, 2000. — 272 с.
2. Гончарова И.А., Фрейдин М.Б., Тахауов Р.М., Карпов А.Б. Молекулярно-генетические подходы, применяемые для оценки воздействия радиации на геном, и индивидуальная радиочувствительность человека // Сибирский медицинский журнал. — 2003. — №5. — С. 78–83.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 479 с.
4. Тимошевский В.А., Лебедев И.Н., Васильев С.А. и др. Хромосомный и цитомный анализ соматических клеток работников радиохимического производства с инкорпорированным ^{239}Pu // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2010. — Т. 50, №6. — С. 672–680.
5. Abdel-Rahmad S.Z., Ei-Zein R.A., Zwishchenberder J.B. Association of the NAT110 genotype with increased chromosome aberrations and higher lung cancer risk in cigarette smokers // Mutat. Res. — 1998. — Vol. 398. — P. 43–54.
6. An W., Kim J., Roeder R.G. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53 // Cell. — 2004. — Vol. 117. — P. 735–748.
7. Conforti-Froes N., Ei-Zein, Abdel-Rahman S.Z. et al. Predisposing genes and increased chromosome aberrations in lung cancer cigarette smokers // Mutat. Res. — 1997. — Vol. 379. — P. 53–59.
8. De Morais S.M.F., Wilkinson G.R., Blaisdell J. et al. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in human // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269, №22. — P. 15419–15422.
9. De Vos M., Hayward B.E., Picton S. et al. Novel PMS2 pseudogenes can conceal recessive mutations causing a distinctive childhood cancer syndrome // Am. J. Hum. Genet. — 2004. — Vol. 74. — P. 954–964.
10. Dumont P., Leu JI, Della P.A.C. 3rd et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential // Nat. Genet. — 2003. — Vol. 33. — P. 357–365.
11. Falck G.C., Hirvonen A., Scsrpato R. et al. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GCTM1, GCTT1, and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers // Mutat. Res. — 1999. — Vol. 441. — P. 225–237.
12. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a «cytome» assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death // Mutat. Res. — 2006. — Vol. 600. — P. 58–66.
13. Frebourg T., Barbier N., Yan Y.-X. et al. Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome // Am. J. Hum. Genet. — 1995. — Vol. 56. — P. 608–615.
14. Guven M., Guven G.S., Oz E. et al. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and their association with coronary artery disease risks and micronucleus frequency // Heart Vessels. — 2007. — Vol. 22. — P. 355–360.
15. <http://www.uniprot.org/uniprot/P04637>.

16. Hu Z., Ma H., Chen F. et al. *XRCC1* Polymorphisms and cancer risk: A Meta-analysis of 38 Case-Control Studies // *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* — 2005. — Vol. 14. — P. 1810–1818.
17. Hung R.J., Hall J., Brennan P., Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: A HuGE review // *Am. J. Epidemiol.* — 2005. — Vol. 162. — P. 925–942.
18. Iarmarcovai G., Sari-Minodier I., Chaspoul F. et al. Risk assessment of welders using analysis of eight metals by ICP-MS in blood and urine and DNA damage evaluation by the comet and micronucleus assays; influence of *XRCC1* and *XRCC3* polymorphisms // *Mutagenesis.* — 2005. — Vol. 20. — P. 425–432.
19. Kadyrov F.A., Dzantiev L., Constantin N., Modrich P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. // *Cell.* — 2006. — Vol. 126. — P. 297–308.
20. Miyaki M., Nishio J., Konishi M. et al. Drastic genetic instability of tumors and normal tissues in Turcot syndrome // *Oncogene.* — 1997. — Vol. 15. — P. 2877–2881.
21. Nebert D.V., Garvan M.J. Ecogenetics: from biology to health // *Toxicol. Indust. Hlth.* — 1997. — Vol. 13. — P. 163–192.
22. Pan X.-M., Yang W.-Z., Xu G.-H. et al. The association between *MLH1* -93G>A polymorphism of DNA mismatch repair and cancer susceptibility: a meta-analysis // *Mutagenesis.* — 2011. — Vol. 26. — P. 667–673.
23. Qu T., Morii E., Oboki K., Lu Y., Morimoto K. Micronuclei in EM9 cells expressing polymorphic forms of human *XRCC1* // *Cancer Lett.* — 2005. — Vol. 221. — P. 91–95.
24. Ribeiro R.C., Sandrini F., Figueiredo B. et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2001. — Vol. 98. — P. 9330–9335.
25. Roberts R., Joyce P., Kennedy M.A. Rapid and comprehensive determination of cytochrome P450 CYP2D6 poor metabolizer genotypes by multiplex polymerase chain reaction // *Hum. Mutat.* — 2000. — Vol. 16, №1. — P. 77–85.
26. Rossi A.M., Hansteen I.-L., Skjelbred C.F. et al. Association between frequency of chromosomal aberration and cancer risk is not influenced by genetic polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* // *Environmental Health Perspectives.* — 2009. — Vol. 117. — P. 203–208.
27. Rutherford J., Chu C.E., Duddy P.M. et al. Investigations on a clinically and functionally unusual and novel germline p53 mutation // *Br. J. Cancer.* — 2002. — Vol. 86. — P. 1592–1596.
28. Sacho E.J., Kadyrov F.A., Modrich P. et al. Direct visualization of asymmetric adenine-nucleotide-induced conformational changes in MutL alpha // *Mol. Cell.* — 2008. — Vol. 29. — P. 112–121.
29. Sasaki M.S., Norman A. Selection against chromosome aberrations in human lymphocytes // *Nature.* 1967. — Vol. 214. — P. 502–503.
30. Scatpato R., Hirvonen A., Migliore L. et al. Influence of *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms on the frequency of chromosome aberrations in lymphocytes of smokers and pesticide-exposed greenhouse workers // *Mutat. Res.* — 1997. — Vol. 389. — P. 227–235.
31. Schwab M., Schaeffeler E., Klotz U. et al. *CYP2C19* polymorphism is a major predictor of treatment failure in white patients by use of lansoprazole-based quadruple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* // *Clin. Pharmacol. Ther.* — 2004. — Vol. 76. — P. 201–209.
32. Spurdle A.B., Webb P.M., Purdie D.M. et al. Polymorphisms at the glutathione S-transferase *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* loci: risk of ovarian cancer by histological subtype // *Carcinogenesis.* — 2001. — Vol. 22. — P. 67–72.
33. Thum T., Borlak J. Gene expression in distinct regions of the heart // *Lancet.* — 2000. — Vol. 355. — P. 979–983.
34. Trojan J., Zeuzem S., Randolph A. et al. Functional analysis of *hMLH1* variants and HNPCC-related mutations using a human expression system // *Gastroenterology.* — 2002. — Vol. 122. — P. 211–219.
35. van Oers J.M.M., Roa S., Werling U. et al. PMS2 endonuclease activity has distinct biological functions and is essential for genome maintenance // *PNAS.* — 2010. — Vol. 107. — P. 13384–13389.
36. Xu B., Kim S., Lim D., Kastan M.G. Two molecularly distinct G2/M checkpoints are induced by ionizing irradiation // *Mol. And Cell. Biol.* — 2002. — Vol. 22, №4. — P. 1049–1059.
37. Xu X., Wiencke J.K., Niu T. et al. Benzene Exposure, Glutathione S-transferase theta homozygous deletion, and sister chromatid exchanges // *Am. J. Ind. Med.* — 1998. — Vol. 33. — P. 157–163.
38. Yang H.G., Wong L. P., Lee T. C. et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C19 in healthy Malaysian subjects // *Br. J. Clin. Pharmacol.* — 2004. — Vol. 58, №3. — P. 332–335.
39. Yu K.D., Di G.H., Fan L. et al. A functional polymorphism in the promoter region of *GSTM1* implies a complex role for *GSTM1* in breast cancer // *FASEB J.* — 2009. — Vol. 23. — P. 2274–2287.

Associations between polymorphic variants of DNA repair and metabolism of xenobiotics genes and chromosome aberration level in human lymphocytes

Babushkina N.P., Kucher A.N., Lebedev I.N., Vasilyev S.A., Timoshevsky V.A., Bragina E.Yu., Sukhanova N.N., Torkhova N.B., Yakovleva Yu.S.

Institute of Medical Genetics SB RAMS,
634050, Tomsk, Naberezhnaya r.Ushaiki, 10, tel. (3822) 513146, fax (3822) 513744, e-mail: nad.babushkina@medgenetics.ru

We present data concerning frequencies of polymorphic variants of DNA repair (*MLH1* (rs1799977), *PMS2* (rs1805321), *XRCC1* (rs25487)), cell cycle control (*TP53* (rs1042522)) and metabolism of xenobiotics (*Cyp2C19* (rs4244285), *GSTT1* (del) и *GSTM1* (del)) genes in cohort of plutonium workers and control group. Also, subgroups with various levels of chromosome abnormalities are considered (with high and low levels of chromosome aberrations, aneuploidy and micronuclei). There were no significant differences of allele and genotype frequencies between group of plutonium workers and control group. However, significant differences of rs1799977 *MLH1* genotype frequencies was observed between subgroups with different levels of chromosome aberrations ($p=0.047$) and *GSTT1/GSTM1* genotype frequencies between subgroups with high and low levels of aneuploidy ($p=0.032$). There were also differences between subgroups regarding to genotype frequencies at other loci, but insignificant. Allele frequencies differences were registered only in *XRCC1* (rs25487) between subgroups with different levels of chromosome aberrations ($p=0.039$).

Key words: individual radiosensitivity, gene polymorphism, DNA repair, chromosome aberrations, micronuclei

Экспрессия генов циркадного ритма *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в клетках буккального эпителия у больных эссенциальной артериальной гипертензией*

Курбатова И.В.¹, Топчиева Л.В.¹, Корнева В.А.², Коломейчук С.Н.¹, Немова Н.Н.¹

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН).

185910, г.Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11, тел.: (8142)571879, факс: (8142)769810, e-mail: nemova@krc.karelia.ru

² — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Петрозаводский государственный университет» (ПетрГУ),

185000, г.Петрозаводск, ул. Ленина, д. 33, ПетрГУ, тел.: (8142)780685, e-mail: vikkorneva@mail.ru

Впервые проведён сравнительный анализ уровней экспрессии основных циркадных генов *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в группах доноров с установленным диагнозом эссенциальная артериальная гипертензия (ЭАГ) и в контрольной группе. Уровень экспрессии изучаемых генов оценивали в 9, 13 и 17 часов. Показано, что экспрессия гена *CLOCK* достоверно ниже у больных ЭАГ, по сравнению с контрольной группой, в 13 и 17 часов. Уровень экспрессии гена *BMAL1* достоверно ниже у больных ЭАГ, по сравнению с контрольной группой, в 9 и 13 часов. Экспрессия гена *PER1* достоверно ниже у больных ЭАГ по сравнению с контролем во всех временных точках. Корреляционный анализ уровней экспрессии исследуемых генов в различных временных точках показал стойкую положительную корреляционную зависимость между уровнями экспрессии генов *CLOCK* и *PER1*, *BMAL1* и *PER1* как в контроле, так и в группе больных ЭАГ.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), эссенциальная артериальная гипертензия (ЭАГ), гены циркадного ритма

Введение

К настоящему времени в литературе имеется ряд работ, посвящённых изучению роли генов циркадного ритма в этиологии и патогенезе полигенных заболеваний. Например, показано, что полиморфные варианты циркадных генов ассоциируются с развитием метаболического синдрома [19], диабета 2 типа [24], онкологических заболеваний [5]. Известно, что некоторые аллели генов циркадных ритмов связаны с повышением риска формирования артериальной гипертензии [7, 24]. Ранее нами было показано, что существует взаимосвязь между полиморфными маркерами 3111TC и 257TG в регуляторных областях и 862TC в экзоне 9 гена *CLOCK* и риском развития эссенциальной артериальной гипертензии (ЭАГ) и ишемической болезни сердца (ИБС) [2]. Таким образом, в настоящее время циркадные гены рассматриваются в качестве генов-кандидатов, принимающих участие в развитии полигенных, в том числе сердечно-сосудистых, заболеваний (ССЗ). Однако механизмы, через которые полиморфные варианты циркадных генов влияют на формирование этих заболеваний, практически не изучены.

Циркадная периодичность физиологических показателей и процессов организма обусловлена циркадными изменениями экспрессии многих генов, которые, в свою очередь, регулируются генами циркадных ритмов и зависят от колебаний их экспрессии. Особое значение в механизмах регуляции генов-мишеней у млекопитающих имеют транскрипционные факторы *CLOCK* и *BMAL1*. В последнее время в ряде работ появились данные, что уровень экспрессии генов циркадных ритмов отличается в контрольных группах и группах объектов, имеющих различные патологии, например рак [11], диабет 2 типа [20], ожирение [8].

Анализ данных литературы показал, что при ряде патологий наблюдается снижение экспрессии тех или иных циркадных генов. Долгое время наиболее масштабные исследования экспрессии циркадных генов проводились в связи с изучением опухолевых процессов. Например, показано значительное снижение уровня экспрессии гена *PER1* в спорадических опухолях молочной железы у женщин по сравнению с нормальными тканями. Есть предположение, что снижение экспрессии циркадных генов может влиять на трансактивацию сигналов, которые управляют клеточным циклом и на

* Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине»; Гранта Президента РФ «Ведущие научные школы РАН» НШ-3731.2010.4; гранта Правительства РФ (Постановление 220), ГК №11.G34.31.0052 (вед. учёный А.Н. Полторак), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 гг.», № г.р. 01201056445, ГК №02.740.11.0700.

способность клеток подвергаться апоптозу, потенциально способствуя канцерогенезу [23]. Некоторые авторы считают, что изменение экспрессии циркадных генов может служить биомаркером опухолевых процессов [4, 11]. В последнее время появились работы по исследованию экспрессии циркадных генов в связи с изучением их возможной роли в патогенезе других заболеваний, например, диабета 2-го типа [20], ожирения [8]. Так, было обнаружено, что уровень экспрессии генов *PER2*, *PER3* и *CRY2* достоверно ниже в β -клетках доноров, страдающих диабетом 2-го типа, по сравнению с контролем [20]. Что касается изучения экспрессии циркадных генов при сердечно-сосудистых патологиях, в литературе имеются немногочисленные данные экспериментов на модельных объектах. В одной из работ показано, что в гипертрофированном сердце крыс наблюдается снижение транскрипционной активности генов *per 1-3*, в то время как уровень экспрессии генов *bmal1*, *clock*, *cry* не отличается от контроля [25]. Авторы другой работы обнаружили снижение экспрессии гена *bmal1* в скелетных мышцах и печени у гипертензивной линии крыс по сравнению с нормотензивной линией [13].

Таким образом, данные литературы и наших исследований [1, 2] указывают на то, что наличие полиморфных сайтов в генах циркадных ритмов, а также изменения их транскрипционной активности могут ассоциироваться с развитием ССЗ. Цель настоящей работы — сравнительный анализ экспрессии (уровней транскриптов) генов циркадных ритмов *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в клетках буккального эпителия у пациентов, страдающих ЭАГ, и у доноров без клинических проявлений и диагноза ЭАГ.

Материалы и методы

В работе использованы 32 образца буккального эпителия здоровых людей (средний возраст $49,63 \pm 1,50$ лет) и 34 образца — доноров с диагнозом ЭАГ (I-II стадии) (средний возраст $50,74 \pm 2,55$ лет), с равным количеством мужчин и женщин в каждой группе. Все доноры являлись жителями Республики Карелии. РНК выделяли из клеток буккального эпителия ротовой полости доноров в утреннее, дневное и вечернее время через равные промежутки времени: в 9, 13 и 17 часов набором Yellow Solve («Clonogen», Россия). Степень чистоты и концентрацию РНК и комплементарной ДНК (кДНК) определяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus (Bio-Rad, США). Тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (10ед./мл) («Силекс», Россия). кДНК синтезировали с использованием MMLV-обратной транскриптазы и случайных гексануклеотидов (набор «Синтез первой цепи ДНК», «Силекс», Россия). Уровень экспрессии генов оценивали методом ПЦР в режиме реального времени на приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (Bio-Rad, США) с использованием набора для РТ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI («Синтол», Россия), прай-

меры («Литех», Россия) указаны нами ранее [1]. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР-фрагментов. Уровень экспрессии генов *CLOCK*, *BMAL1*, *PER1* был рассчитан относительно уровня экспрессии референсного гена *GAPDH*. Повторность при ПЦР-анализе — 2-кратная. Исследование выполнено на оборудовании центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН. Статистическую обработку данных проводили в программе Statgraphics 2.1. с использованием непараметрического критерия Вилкоксона—Манна—Уитни, метода ранговой корреляции Спирмена. Данные представлены в виде среднего арифметического значения (M) $\pm$ стандартная ошибка среднего (m). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

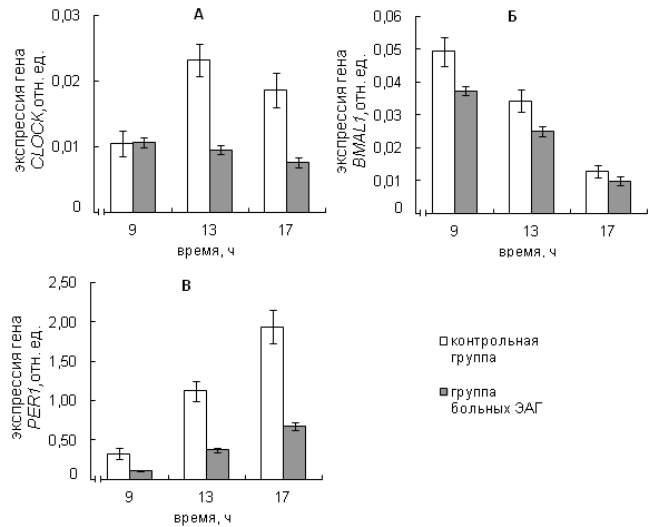
Результаты и обсуждение

В результате исследования выявлена общая тенденция снижения уровня экспрессии генов *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в буккальном эпителии у больных ЭАГ по сравнению с контролем. Так, экспрессия гена *CLOCK*, кодирующего позитивный транскрипционный фактор *CLOCK*, достоверно ниже у больных ЭАГ, по сравнению с контрольной группой, в 13 и 17 часов (табл. 1). В одной из первых и наиболее полных работ по изучению экспрессии циркадных генов в периферических тканях людей было показано, что экспрессия гена *CLOCK* не является ритмичной [3]. В то же время другие авторы в экспериментах на крысах обнаружили, что в сердце крыс ген *Clock* транскрибируется ритмично [25]. Позднее Reilly и соавторы в обзорной статье ссылаются на ряд работ, в которых показано отсутствие ритмики в изменении уровня экспрессии данного гена в тканях сосудов [15]. В нашей работе нам трудно оценить наличие периодичности в динамике экспрессии исследуемых генов, но можно заключить, что уровень экспрессии гена *CLOCK* в буккальном эпителии больных ЭАГ практически не изменяется в период с 9 до 17 часов. В то же время выявлена общая тенденция снижения уровня экспрессии гена *BMAL1* и постепенное повышение уровня экспрессии гена *PER1* с 9 до 17 часов как в контрольной группе, так и в группе больных ЭАГ (табл. 2, 3). Эти данные о динамике экспрессии генов *BMAL1* и *PER1* согласуются с известным представлением о молекулярных механизмах регуляции экспрессии циркадных генов как об авторегуляторных циклах обратной связи, согласно которому экспрессия этих генов ритмична и находится в противофазе относительно друг друга [22]. По данным исследований на грызунах и клеточных культурах человека, пик экспрессии мРНК *BMAL1* приходится на середину циркадной ночи, а затем экспрессия этого гена снижается [10, 15], а пик экспрессии мРНК *PER1* приходится на середину или вторую половину циркадного дня, независимо от того, в какое время суток активен организм [14, 15]. Однако в одной из работ приводятся данные, что экспрессия гена *PER1* в

слизистой оболочке полости рта и в коже людей максимальна в первой половине дня и затем снижается [3].

Как и в случае гена *CLOCK*, при сравнительном изучении уровней экспрессии генов *BMAL1* и *PER1* в группах доноров с установленным диагнозом ЭАГ и в контрольной группе была выявлена общая тенденция снижения экспрессии этих генов в буккальном эпителии у больных ЭАГ по сравнению с контролем. Как показано в табл. 2, уровень экспрессии гена *BMAL1* достоверно ниже у больных ЭАГ, по сравнению с контрольной группой, в 9 и 13 часов. Экспрессия гена *PER1* достоверно ниже у больных ЭАГ по сравнению с контролем во всех временных точках (табл. 3).

Корреляционный анализ уровней экспрессии исследуемых генов в различных временных точках показал стойкую положительную корреляционную зависимость между уровнями экспрессии генов *CLOCK* и *PER1*, *BMAL1* и *PER1*. Нужно отметить, что такая зависимость была выявлена и в контроле, и в группе больных ЭАГ, при этом наиболее сильная корреляция обнаружена в группе больных ЭАГ между уровнями экспрессии гена *CLOCK* в 9 часов и гена *PER1* в 13 ($r_s=0,66$, $p<0,001$) и 17 часов ($r_s=0,65$, $p<0,001$); а также между уровнями экспрессии гена *BMAL1* в 9 часов и гена *PER1* в 13 ($r_s=0,38$, $p=0,031$) и 17 часов ($r_s=0,47$, $p=0,007$). Как известно, у млекопитающих димер позитивных транскрипционных факторов *CLOCK:BMAL1* индуцирует экспрессию генов *Per* и *Cry*, действуя на промотор управляемых генов. Околосуточная периодичность экспрессии со-



здаётся транслокацией в ядро белковых продуктов генов *Cry* и *Per*. В ядре гетеродимеры или полимеры *CRY* и *PER* тормозят эффект позитивных транскрипционных факторов до тех пор, пока они не деградируют, что, в свою очередь, запускает новые 24-часовые циклы экспрессии [22]. Данные корреляционного анализа указывают на то, что чем ниже уровень экспрессии генов *CLOCK* и *BMAL1* в начальный период эксперимента (9 часов), тем ниже уровень индуцируемой димером *CLOCK:BMAL1* экспрессии гена *PER1* в более поздний

Таблица 1

Уровень экспрессии гена *CLOCK* (отн. ед.) в клетках буккального эпителия у пациентов, страдающих ЭАГ, и у доноров контрольной группы

Время	Контрольная группа (n=32)	Группа пациентов с диагнозом ЭАГ (n=34)	Значение p
9.00	0,0105±0,0020	0,0106±0,0008	0,5281
13.00	0,0232±0,0025	0,0095±0,0007	<0,0001
17.00	0,0186±0,0026	0,0076±0,0007	<0,0001

Таблица 2

Уровень экспрессии гена *BMAL1* (отн. ед.) в клетках буккального эпителия у пациентов, страдающих ЭАГ, и у доноров контрольной группы

Время	Контрольная группа (n=32)	Группа пациентов с диагнозом ЭАГ (n=34)	Значение p
9.00	0,0493±0,0044	0,0373±0,0014	0,0278
13.00	0,0343±0,0035	0,0250±0,0016	0,0347
17.00	0,0129±0,0018	0,0099±0,0015	0,4132

Таблица 3

Уровень экспрессии гена *PER1* (отн. ед.) в клетках буккального эпителия у пациентов, страдающих ЭАГ, и у доноров контрольной группы

Время	Контрольная группа (n=32)	Группа пациентов с диагнозом ЭАГ (n=34)	Значение p
9.00	0,3240±0,0690	0,1106±0,0094	0,0001
13.00	1,1252±0,1270	0,3747±0,0278	<0,0001
17.00	1,9362±0,2119	0,6710±0,0474	<0,0001

период эксперимента (13 и 17 часов). Многие авторы указывают на то, что из всех компонентов циркадной системы именно *CLOCK* является критическим фактором, который регулирует оборот основных циркадных протеинов у млекопитающих, так как его экспрессия не является ритмичной в большинстве тканей организма, и, кроме того, он обладает активностью ацетилтрансферазы гистонов [6, 21]. Также существует мнение, что не менее важную роль в регуляции циркадных механизмов играет ген *BMAL1*, так как итоговая цикличность транскрипции *BMAL1* в дополнительной петле обратной связи усиливает или ослабляет действие основной петли за счёт антагонистических эффектов генов ядерных рецепторов ROR и REV-ERB на транскрипцию *BMAL1* [18].

Известно, что многие гены, вовлечённые в процессы функционирования сердечно-сосудистой системы, экспрессируются по циркадному типу, в частности гены, участвующие в поддержании структурной целостности сосудов [16], сосудистого тонуса, фибринолитической активности [9], водно-солевого обмена [17], которые, в свою очередь, регулируются генами циркадных ритмов и зависят от колебаний их экспрессии. На основании полученных данных и анализа литературы можно предположить, что снижение экспрессии основных циркадных генов у больных ЭАГ по сравнению с контролем может приводить к нарушению механизмов регуляции системы циркадных генов, что, в свою очередь, способно повлиять на экспрессию генов-мишеней. Рассматривают два механизма регуляции экспрессии генов-мишеней циркадными генами. В одном из них белки, кодируемые циркадными генами, непосредственно взаимодействуют с генами-мишенями, связываясь с определёнными последовательностями этих генов. Есть сведения, что в эндотелии сосудов экспрессия как минимум 29 генов регулируется циркадными белками, например, димер *CLOCK:BMAL1* и *PERIOD2* непосредственно регулируют транскрипцию гена ингибитора активатора плазминогена 1 типа (*PAI-1*) [12]. Другой механизм регуляции экспрессии генов-мишеней циркадными генами представляет собой опосредованное влияние на экспрессию генов через транскрипционные факторы, такие, как *DBP*, *HLF* и *TEF*, чья экспрессия находится под контролем *CLOCK:BMAL1* [10]. Показано, что при гипертрофии сердца у крыс значительно снижается уровень экспрессии генов *dbp*, *hlf*, and *tef*, кодирующих соответствующие транскрипционные факторы [25].

Таким образом, в настоящей работе была выявлена общая тенденция снижения уровней экспрессии циркадных генов *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в буккальном эпителии у больных ЭАГ по сравнению с контролем. Наблюдаемое нами снижение экспрессии изучаемых циркадных генов у людей, страдающих ЭАГ, может быть одной из причин нарушения транскрипционной активности генов-мишеней, участвующих в регуляции артериального давления.

Список литературы

1. Курбатова И.В., Коломейчук С. Н., Топчиева Л.В., Корнева В.А., Немова Н.Н. Экспрессия генов циркадных ритмов *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в клетках буккального эпителия человека в зависимости от полиморфных вариантов гена *CLOCK* // Доклады академии наук. — 2012. — Т. 446, №6. — С. 703—706.
2. Курбатова И.В., Топчиева Л.В., Коломейчук С.Н., Корнева В.А., Немова Н.Н. Полиморфные маркеры гена транскрипционного фактора *CLOCK* и риск возникновения эссенциальной артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца у жителей Республики Карелия // Актуальные проблемы лабораторной диагностики и биотехнологии: Всерос. науч.-практ. конф.: Сб. тез. — Кемерово, 2012. — С. 51—52.
3. Bjarnason G.A., Jordan R.C., Wood P.A., Li Q., Lincoln D.W., Sothorn R.B., Hrushesky W.J., Ben-David Y. Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases // Am. J. Pathol. — 2001. — Vol. 158, №5. — P. 1793—1801.
4. Chen S.T., Choo K.B., Hou M.F., Yeh K.T., Kuo S.J., Chang J.G. Deregulated expression of the *PER1*, *PER2* and *PER3* genes in breast cancers // Carcinogenesis. — 2005. — Vol. 26, №7. — P. 1241—1246.
5. Chu L.W., Zhu Y., Yu K., Zheng T., Yu H., Zhang Y., Sesterhenn I., Chokkalingam A.P., Danforth K.N., Shen M.C., Stanczyk F.Z., Gao Y.T., Hsing A.W. Variants in circadian genes and prostate cancer risk: a population-based study in China // Prostate Cancer Prostatic Dis. — 2008. — Vol. 11, №4. — P. 342—348.
6. Doi M., Hirayama J., Sassone-Corsi P. Circadian regulator *CLOCK* is a histone acetyltransferase // Cell. — 2006. — Vol. 125, №3. — P. 497—508.
7. Englund A., Kovanen L., Saarikoski S.T., Haukka J., Reunanen A., Aromaa A., Lonnqvist J., Partonen T. NPAS2 and *PER2* are linked to risk factors of the metabolic syndrome // J. Circadian Rhythms. — 2009. — Vol. 7, №5. — P. 1—9.
8. Gomez-Abellan P., Madrid J.A., Lujan J.A., Frutos M.D., Gonzalez R., Martinez-Augustin O., de Medina F.S., Ordovas J.M., Garaulet M. Sexual dimorphism in clock genes expression in human adipose tissue // Obes. Surg. — 2012. — Vol. 22, №1. — P. 105—112.
9. Guney H.Z., Uluoglu C., Hodoglugil U., Gorgun C.Z., Yamanoglu T.M., Abacioglu N., Zengil H. Biological-time-dependent differences in effect of verapamil on rat aorta and influence of endothelium // Chronobiol. Int. — 1999. — Vol. 16, №6. — P. 779—787.
10. Honma S., Ikeda M., Abe H., Tanahashi Y., Namihiira M., Honma K., Nomura M. Circadian oscillation of *BMAL1*, a partner of a mammalian clock gene *Clock*, in rat suprachiasmatic nucleus // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1998. — Vol. 250, №1. — P. 83—87.
11. Krugluger W., Brandstaetter A., Kallay E., Schueller J., Krexner E., Kriwanek S., Bonner E., Cross H.S. Regulation of genes of the circadian clock in human colon cancer: reduced period1 and dihydropyrimidine dehydrogenase transcription correlates in high-grade tumors // Cancer Res. — 2007. — Vol. 67, №16. — P. 7917—7922.
12. Maemura K., Takeda N., Nagai R. Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: role of the biological clock in cardiovascular diseases // J. Pharmacol. Sci. — 2007. — Vol. 103, №2. — P. 134—138.
13. Miyazaki M., Schroder E., Edelmann S.E., Hughes M.E., Kornacker K., Balke C.W., Esser K.A. Age-associated disruption of molecular clock expression in skeletal muscle of the spontaneously hypertensive rat // PLoS One. — 2011. — Vol. 6, №11, e27168. — P. 1—11.
14. Mrosovsky N., Edelstein K., Hastings M.H., Maywood E.S. Cycle of *period* gene expression in a diurnal mammal (*Spermophilus*

tridecemlineatus): implications for nonphotic phase shifting // J. Biol. Rhythms. — 2001. — Vol. 16, №5. — P. 471–478.

15. Reilly D.F., Westgate E.J., FitzGerald G.A. Peripheral circadian clocks in the vasculature // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2007. — Vol. 27, №8. — P. 1694–1705.

16. Rudic R.D., McNamara P., Reilly D., Grosser T., Curtis A.M., Price T.S., Panda S., Hogenesch J.B., FitzGerald G.A. Bioinformatic analysis of circadian gene oscillation in mouse aorta // Circulation. — 2005. — Vol. 112, №17. — P. 2716–2724.

17. Saifur R.M., Emoto N., Nonaka H., Okura R., Nishimura M., Yagita K., van der Horst G.T., Matsuo M., Okamura H., Yokoyama M. Circadian clock genes directly regulate expression of the Na(+)/H(+) exchanger NHE3 in the kidney // Kidney Int. — 2005. — Vol. 67, №4. — P. 1410–1419.

18. Sato T.K., Panda S., Miraglia L.J., Reyes T.M., Rudic R.D., McNamara P., Naik K.A., FitzGerald G.A., Kay S.A., Hogenesch J.B. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock // Neuron. — 2004. — Vol. 43, №4. — P. 527–537.

19. Scott E.M., Carter A.M., Grant P.J. Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man // Int. J. Obes. (Lond.). — 2008. — Vol. 32, №4. — P. 658–662.

20. Stamenkovic J.A., Olsson A.H., Nagorny C.L., Malmgren S., Dekker-Nitert M., Ling C., Mulder H. Regulation of core clock genes in human islets // Metabolism. — 2012. — Vol. 61, №7. — P. 978–985.

21. Takahashi J.S., Hong H.K., Ko C.H., McDearmon E.L. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease // Nat. Rev. Genet. — 2008. — Vol. 9, №10. — P. 764–775.

22. Von Schantz M. Phenotypic effects of genetic variability in human clock genes on circadian and sleep parameters // J. Genet. — 2008. — Vol. 87, №5. — P. 513–519.

23. Winter S.L., Bosnoyan-Collins L., Pinnaduwa D., Andrus I.L. Expression of the Circadian Clock Genes Per1 and Per2 in Sporadic and Familial Breast Tumors // Neoplasia. — 2007. — Vol. 9, №10. — P. 797–800.

24. Woon P.Y., Kaisaki P.J., Braganca J., Bihoreau M.T., Levy J.C., Farrall M., Gauguier D. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2007. — Vol. 104, №36. — P. 14412–14417.

25. Young M.E., Razeghi P., Taegtmeyer H. Clock genes in the heart: characterization and attenuation with hypertrophy // Circ. Res. — 2001. — Vol. 88, №11. — P. 1142–1150.

Expression of circadian genes *CLOCK*, *BMAL1* and *PER1* in buccal cells of donors with essential hypertension

Kurbatova I.V.¹, Topchieva L.V.¹, Korneva V.A.², Kolomeichuk S.N.¹, Nemova N.N.²

¹ — Institute of Biology Karelian Research Center Russian Academy of Sciences,

185910, 11 Pushkinskaya St., Petrozavodsk, Karelia, Russia, tel.: (8142) 571879, fax: (8142)769810, e-mail: nemova@krc.karelia.ru

² — Faculty therapy department of Petrozavodsk State University,

185000, 33 Kirova St., Petrozavodsk, Karelia, Russia, tel.: e-mail: vikkorneva@mail.ru

The analysis of differences in the expression rates of the main circadian genes *CLOCK*, *BMAL1*, and *PER1* in human oral mucosa cells between patients with essential hypertension (EH) and healthy individuals was carried out for the first time. The expression levels of the genes were calculated at 9:00 a.m., 1:00 p.m., and 5:00 p.m. Patients with EH exhibited lower expression levels of the *CLOCK* gene at 1:00 p.m. and 5:00 p.m. as compared with control group. The expression levels of the *BMAL1* gene were significantly lower at 9:00 a.m. and 1:00 p.m. in comparison with healthy individuals. Patients with EH exhibited lower expression levels of the *PER1* gene at all time points as compared to control group. The significant positive correlation between expression levels of *CLOCK* and *PER1*, *BMAL1* and *PER1* genes was shown in control group and donors with EH at all time points using Spearman rank correlation analysis.

Key words: cardiovascular diseases, essential hypertension, circadian genes

Частота мутаций в гене *SOD1* у российских пациентов с боковым амиотрофическим склерозом

Лысогорская Е.В., Абрамычева Н.Ю., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр неврологии» Российской академии медицинских наук

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — фатальное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью мотонейронов спинного и головного мозга, развитием параличей и гибелью пациентов от нарушения дыхательных и бульбарных функций. Около 10% случаев БАС связано с мутациями определённых генов, среди которых ведущее значение имеет ген Cu/Zn-супероксиддисмутазы (*SOD1*). Обследовано 206 пациентов (98 женщин и 108 мужчин) с БАС, включая 9 пациентов из восьми неродственных семей, страдающих семейной формой заболевания. В результате молекулярно-генетического анализа мутации *SOD1* выявлены в 50% семейных случаев и в 3% спорадических случаев заболевания. В статье представлены спектр выявленных мутаций у российских пациентов с БАС и наиболее показательные случаи семейной формы БАС, демонстрирующие необходимость проведения медико-генетического консультирования в отягощённых семьях.

Ключевые слова: боковой амиотрофический склероз, ген *SOD1*, мутационный анализ, медико-генетическое консультирование

Введение

БАС является неуклонно прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, которое характеризуется гибелью мотонейронов спинного и головного мозга, развитием параличей и гибелью пациентов от нарушения дыхательных и бульбарных функций, обычно спустя 2-5 лет от момента дебюта симптомов болезни [1]. Этиология БАС окончательно не установлена. Известно несколько теорий патогенеза БАС. Одной из них является теория оксидативного стресса, ключевым звеном которой является фермент антиоксидантной защиты клетки Cu/Zn-супероксиддисмутаза (СОД1). СОД1 локализован в цитозоле и представляет собой небольшой белок с молекулярной массой 32,5 кДа. Он ответственен за детоксикацию супероксидных радикалов и превращение их в молекулы кислорода и перекись водорода. Данный фермент кодируется геном *SOD1*, расположенным на хромосоме 21q22.1 [18].

SOD1 стал первым геном, для которого установлена ассоциация с БАС (локус ALS1, MIM #105400). Описание мутаций в гене *SOD1* при БАС сыграло большую роль в понимании патогенеза данного заболевания [18]. К настоящему времени описано свыше 160 мутаций в гене *SOD1* [<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>], подавляющее большинство которых является доминантными. Патогенетическая значимость многих мутаций доказана исследованиями на лабораторных животных и культурах клеток, а также при сегрегационном анализе в процессе обследования кровных родственников пациентов с семейной формой БАС [7, 14]. Показано, что ферментативная активность мутантного белка не изменяется, поэтому в настоящее время основной гипотезой цитотоксичности при повреждении гена является приобретение ферментом

СОД1 новых патологических функций, привнесённых мутациями и реализуемых преимущественно в двигательных нейронах (механизм «gain-of-function») [19].

Мутации в гене *SOD1*, по данным зарубежных исследователей, обуславливают около 20-30% семейных случаев и 5-7% спорадических случаев БАС [18]. Известны еще 18 генов, ассоциированных с развитием семейных (как правило, аутосомно-доминантных) случаев данного заболевания (табл. 1), однако выявляемость мутаций в них при БАС весьма низка [8, 15]. В нашей стране единственное исследование, посвящённое мутационному анализу гена *SOD1*, было проведено 10 лет назад и касалось сравнительно ограниченного числа пациентов-славян (51 чел.), лишь у трёх из которых были выявлены 2 точковые мутации гена [3]. В настоящей работе мы представляем результаты детального мутационного анализа гена *SOD1*, выполненного на крупнейшей когорте российских пациентов с БАС.

Материалы и методы

В период с 2007 по 2011 гг. было обследовано 206 больных БАС, обратившихся в Научный центр неврологии РАМН, в том числе 98 женщин (47,6%) и 108 мужчин (52,4%). Диагноз БАС устанавливался на основании стандартных международных критериев El Escorial [6]. В данное исследование были включены пациенты с «достоверным» и «вероятным» диагнозом БАС. Помимо спорадической формы БАС, составившей абсолютное большинство обследованных случаев, в исследуемую группу были включены также 9 пациентов из восьми неродственных семей, страдавших семейной формой заболевания. Таким образом, частота семейных случаев БАС в нашей когорте составила 4,3%. При полу-

чении сведений о наличии в семье двух и более родственников, страдающих БАС, положительный семейный анамнез подтверждался на основании представляемых медицинских документов или при непосредственном медицинском обследовании вторичных случаев.

Проведение данного исследования было одобрено локальным этическим комитетом Научного центра неврологии РАМН. Все пациенты были ознакомлены с условиями проведения исследования и подписывали информированное согласие на участие в нём.

Молекулярно-генетический анализ включал полное секвенирование кодирующей области гена *SOD1*. Образцы геномной ДНК выделяли из цельной крови с помощью набора для выделения Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Дизайн праймеров для каждого из пяти экзонов, включая фланкирующие интронные области длиной 100–200 п.н., представлен в табл. 2. Секвенирование проводили на генетическом анализаторе 3130 Applied Biosystems с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Типирование двух однонуклеотидных замен в гене *SOD1* проводилось методом аллельной дискриминации с помощью 5'-нуклеазного (TaqMan) анализа. При этом для детекции аллельных вариантов использовались четыре аллельспецифичных TaqMan зонда FAM, R6G, ROX, Cy5 с различными флуоресцентными метками, позволяющими надёжно различать гомо- и гетерозиготы при амплификации в режиме реального времени. Амплификация проводилась на приборе для осуществления полимеразной цепной реакции в реальном времени «АНК-32» компании «Синтол».

Результаты и обсуждение

При секвенировании *SOD1* нами в совокупности выявлено 11 мутаций в гетерозиготном состоянии у 14 неродственных пациентов с БАС, в том числе 8 мутаций у 10 неродственных пациентов в кодирующей области гена (табл. 3) и 3 мутации у четырёх пациентов в некодирующих областях *SOD1* (табл. 4).

Таблица 1

Описанные генетические локусы при БАС

Локус	Ген	Белковый продукт	Хромосомная локализация
ALS1	<i>SOD1</i>	Медь/цинк-содержащая супероксиддисмутаза	21q22.11
ALS2	<i>ALS2</i>	Алсин	2q33.2
ALS3	Не идентифицирован	—	18q21
ALS4	<i>SETX</i>	Сенатаксин	9q34.13
ALS5	<i>SPAST</i>	Спастин	2p24
ALS6	<i>FUS</i>	Химерный белок, ассоциированный со злокачественной липосаркомой	16p11.2
ALS7	Не идентифицирован	—	20p13
ALS8	<i>VAPB</i>	Везикуло-ассоциированный мембранный белок	20q13.33
ALS9	<i>ANG</i>	Ангиогенин	14q11.1
ALS10	<i>TARDBP</i>	TAR-ДНК-связывающий белок	1p36.22
ALS11	<i>FIG4</i>	SAC-домен-содержащий белок	6q21
ALS12	<i>OPTN</i>	Оптивин	10p13
ALS13	<i>ATXN2</i>	Атаксин-2	12q23-q24.1
ALS14	<i>VCP</i>	Валозин-содержащий белок	9p13
ALS15	<i>UBQLN2</i>	Убиквлин-2	Xp11.21
ALS16	<i>SIGMAR1</i>	Неопиоидный внутриклеточный рецептор сигма-1	9p13
ALS17	<i>CHMP2B</i>	Хроматин-модифицирующий белок 2B	3p11.2
ALS18	<i>PFN1</i>	Профилин-1	17p13.3

Таблица 2

Структура праймеров для амплификации экзонов гена *SOD1*

Экзон	Прямой праймер	Обратный праймер
1	GCCACGCCCCCGTGAAGA	CTCAGCACTTGGGCACCGCA
2	TGGCCACAGGGTGCTTGTGC	TGAGGGGTTTAACGTTTAGGGCT
3	TCCCTTCTCACTGTGGCTGTACCA	GCCCAGGAAGTAAAGCATTCCAGC
4	GGTGCAGCCCCATCTTCTTCCC	ACAAGTGAGAAACCCCAATCCTGGCA
5	AGGGTAGCGTGTGGTGGTCT	TCCCTAAAGCTTCAAGGACAGCC

Таблица 3

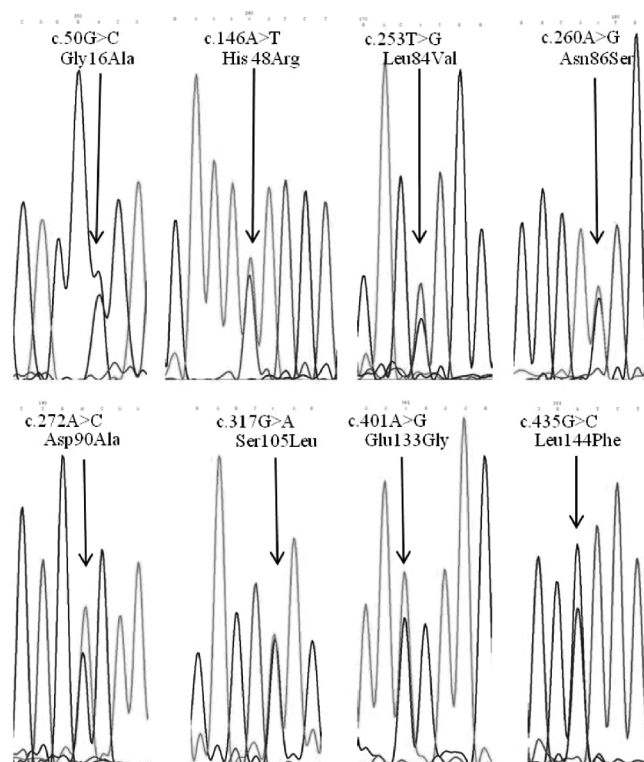
Выявленные кодирующие мутации в гене *SOD1*

ID пациента	Мутация*	Область	Возраст/пол	Форма заболевания	Литературная ссылка
187	Gly16Ala	Экзон 1	31/ж	Спинальная, спорадическая	[4]
15	His 48Arg	Экзон 2	50/м	Спинальная, спорадическая	
120	Leu84Val	Экзон 4	39/м	Бульбарная, семейная	[9]
145	Leu84Val	Экзон 4	29/м	Шейно-грудная, семейная	[9]
155	Asn86Ser	Экзон 4	54/ж	Шейно-грудная, спорадическая	[20]
224	Asn86Ser	Экзон 4	50/ж	Пояснично-крестцовая, семейная	[20]
206	Asp90Ala	Экзон 4	62/ж	Пояснично-крестцовая, спорадическая	[8]
116	Ser105Leu	Экзон 4	46/м	Спинальная, семейная	[20]
176	Glu133Gly	Экзон 5	34/ж	Шейно-грудная, спорадическая	[11]
17	Leu144Phe	Экзон 5	44/ж	Пояснично-крестцовая, спорадическая	[4]

Таблица 4

Выявленные некодирующие мутации в гене *SOD1*

ID пациента	Мутация*	Область	Возраст/пол	Форма заболевания	Литературная ссылка
62	c.-46C>T	Область промотора	42/м	Пояснично-крестцовая, спорадическая	Новая мутация
130	c.169+50delAACAGTA	Интрон 2	63/ж	Бульбарная, спорадическая	Новая мутация
163	c.169+50delAACAGTA	Интрон 2	65/ж	Шейно-грудная, спорадическая	Новая мутация
191	c.*249T>C	5'-фланкирующая область	46/ж	Шейно-грудная, спорадическая	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp

Рис. 1. Выявленные мутации в кодирующей области гена *SOD1*

Мутации в кодирующей области гена (рис. 1). Как видно в табл. 3, половина выявленных кодирующих мутаций была локализована в экзоне 4 гена. Все обнаруженные мутации были описаны ранее у больных БАС из других этнических групп [4, 13, 17]. Патогенетическая значимость большинства из указанных мутаций доказана; кроме того, для некоторых из них (наиболее часто встречающихся) достаточно чётко рассчитана пенетрантность, что позволяет определять прогноз заболевания у носителей в отягощённых семьях [5, 10].

Как показывает анализ фено-генотипических корреляций, практически все выявленные мутации характеризуются выраженным клиническим полиморфизмом. Так, описанная ранее [5] мутация Leu84Val была обнаружена у двух неродственных молодых мужчин с семейным БАС: в одном случае (рис. 2А) это был пациент, страдающий быстро прогрессирующей бульбарной формой заболевания с дебютом в 39 лет, мать и две родные тети которого также страдали БАС, а в другом (рис. 2Б) — мужчина 29 лет с медленно прогрессирующей шейно-грудной формой заболевания, в семье которого БАС страдали бабушка, отец и дядя по отцу, причем симптомы у них дебютировали только на 6-м десятилетии жизни. В двух случаях (один — семейный, рис. 2В, другой — спорадический) была обнаружена мутация Asn86Ser: у пациентки с семейным БАС имела место пояснично-крестцовая форма заболевания с дебютом в 35 лет и медленным прогрессированием, тогда как у её сестры

с пояснично-крестцовой формой симптомы манифестировали в 54 года и продолжительность болезни составила 7 лет. Ещё у одной больной с мутацией Asn86Ser без семейного анамнеза имела место шейно-грудная форма БАС с дебютом в возрасте 54 лет и продолжительностью жизни 10 мес. от момента постановки диагноза. В одном случае у пациента с семейной формой БАС (рис. 2Г) была обнаружена мутация Ser105Leu, часто встречаемая при семейной форме заболевания и в других популяциях [12, 18]: заболевание дебютировало в 42 года и прогрессирует весьма медленно (к настоящему моменту длительность болезни составляет более 9 лет). В этой же семье диагноз БАС установлен у матери пациента, а носительство мутации обнаружено у тетки пациента, не имеющей к 65 годам каких-либо клинических и электрофизиологических признаков поражения мотонейронов. По данным зарубежных авторов известно, что мутация Ser105Leu может характеризоваться неполной пенетрантностью [10].

Таким образом, в исследуемой группе пациентов частота мутаций в гене *SOD1* для семейных случаев заболевания составила 50% (4 семьи из восьми).

Мутации Gly16Ala, His48Arg, Glu133Gly, Leu144Phe, Asn86Ser и Asp90Ala были выявлены в шести спорадических случаях БАС. Частота кодирующих мутаций в исследуемом гене при спорадической форме заболевания составила в нашей выборке больных 3%.

Функциональное значение кодирующих мутаций *SOD1* было оценено нами методом молекулярного моделирования в лаборатории функциональной синаптологии отдела исследований мозга ФГБУ «НЦН» РАМН (в.н.с. А.В. Россохин). С целью построения модели белка и поиска его минимальной энергетической конформации использовалась программа ZMM. Во всех случаях кодирующие точковые мутации гена приводили к умеренному или значительному изменению энергии белка и повышению пространственной стабильности СОД1, что обычно сопровождается повышенной склонностью «инертной» мутантной молекулы к мисфолдингу и внутриклеточной агрегации. Таким образом, данные результаты подтверждают принадлежность БАС к классу так называемых *конформационных болезней* центральной нервной системы, характерной чертой которых является формирование в нейронах цитотоксичных нерастворимых белковых включений. Подробное описание проведённого *in silico* анализа мутаций гена *SOD1* представлено нами в самостоятельной публикации [2].

Мутации в некодирующих областях гена. У двух неродственных пациенток нами впервые была обнаружена делеция семи пар нуклеотидов с.169+50delAACAGTA в интроне 2. У обеих пациенток заболевание дебютировало в возрасте после 60 лет, однако фенотипические проявления болезни были весьма различными: в одном случае имела место медленно прогрессирующая шей-

но-грудная форма БАС, а в другом — быстро прогрессирующая бульбарная форма.

В обследованной нами группе были также впервые обнаружены замена с.-46C>T в промоторной области гена и замена с.*249T>C (rs16988412) в 5 интроне в области, влияющей на процесс сплайсинга. Данные области гена имеют большое функциональное значение, в связи с чем вышеуказанные замены могут являться патогенетически значимыми.

Для уточнения возможной патогенетической значимости обнаруженных интронных мутаций методами секвенирования (для мутации с.169+50delAACAGTA) и ПЦР в режиме реального времени (для с.-46C>T и с.*249T>C) были обследованы 385 образцов ДНК здоровых лиц из банка ФГБУ «НЦН» РАМН. Носительства рискованных аллелей в группе здоровых лиц выявлено не было. При этом замена с.*249T>C, описанная в базе SNP как полиморфизм с частотой минорного аллеля 0,5%, встречалась в группе пациентов с БАС также с частотой 0,5%.

Исследование функциональной значимости обнаруженных некодирующих мутаций (оценка сплайсинга и т.д.) не проводилось в связи с отсутствием образцов цельной крови или других биологических тканей (образцы геномной ДНК хранились в лаборатории на протяжении ряда лет, а соответствующие пациенты умерли, либо недоступны для повторного обследования). Подтверждение их патогенетической роли в патогенезе БАС требует дальнейших исследований. Именно в связи с этим для более консервативной оценки частоты мутаций в обследованных генах БАС нами учитывались только кодирующие варианты.

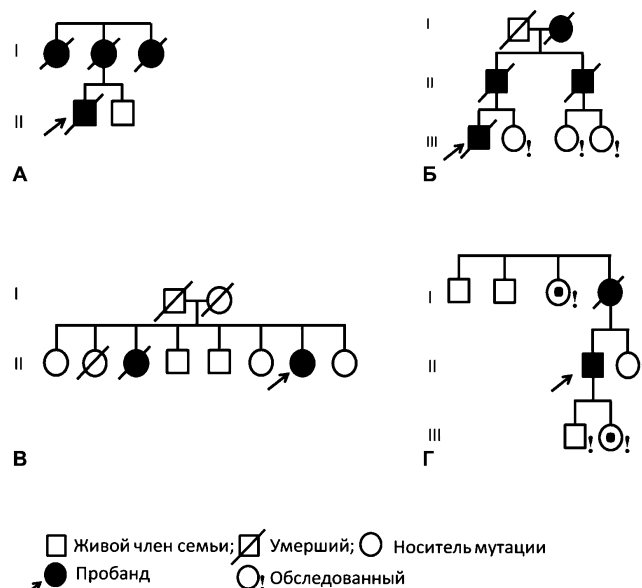


Рис. 2. Родословные пациентов с семейным БАС

Таким образом, в настоящей работе впервые на обширной (свыше 200 пациентов) российской выборке была оценена частота встречаемости мутаций в гене *SOD1* при семейной и спорадической форме БАС. При этом выявленная частота носительства мутаций при семейном БАС в российской популяции (50%) оказалась выше, чем описывают зарубежные исследователи (20–30%) [4, 18], тогда как частота мутаций *SOD1* при спорадической форме БАС (3%) оказалась сопоставимой с другими странами [4, 18]. Дальнейшее катамнестическое наблюдение за клинически здоровыми родственниками пациентов, являющихся носителями ряда исследованных мутаций *SOD1*, позволит уточнить данные о пенетрантности соответствующих мутаций и оптимизировать расчёты генетического риска при проведении медико-генетического консультирования отягощённых семей. Окончательное подтверждение патогенетической значимости выявленных в работе новых мутаций в некодирующих областях гена *SOD1* требует проведения дальнейших функциональных исследований с использованием различных подходов. Проведённое исследование продемонстрировало, что, аналогично большинству других изученных популяций мира, у российских пациентов с БАС ген *SOD1* является одним из ведущих молекулярных факторов, определяющих риск развития данного заболевания. Разработка подходов к воздействию на систему супероксиддисмутазы и, потенциально, других ферментов окислительного каскада рассматривается в числе наиболее перспективных возможностей терапии БАС [16].

Список литературы

- Иллариошкин С.Н. Генетика // Боковой амиотрофический склероз / Под ред. И.А. Завалишина. — М.: Евразия, 2007. — С. 229–255.
- Лысогорская Е.В., Россохин А.В., Абрамичева Н.Ю., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н. Мутации в гене *SOD1* при боковом амиотрофическом склерозе: возможности метода молекулярного моделирования // Молекулярная биология. — 2013. — В печати.
- Скворцова В.И., Лимборская С.А., Сломинский П.А. и др. Особенности спорадической болезни двигательного нейрона, ассоциированной с мутациями D90A и G12R, в российской популяции // Журн. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2003. — Т. 103. — С. 46–52.
- Andersen P.M., Sims K.B., Xin W.W. et al. Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes // Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord. — 2003. — Vol. 4. — P. 62–73.
- Aoki M., Abe K., Houi K. et al. Variance of age at onset in a Japanese family with amyotrophic lateral sclerosis associated with a novel Cu/Zn superoxide dismutase mutation // Ann. Neurol. — 1995. — Vol. 37. — P. 676–679.
- Brooks B.R., Miller R.G., Swash M., Munsat T.L. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis // Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord. — 2000. — Vol. 1. — P. 293–299.
- Cova E., Ghiroldi A., Guareschi S. et al. G93A *SOD1* alters cell cycle in a cellular model of Amyotrophic Lateral Sclerosis // Cell Signal. — 2010. — Vol. 22. — P. 1477–1484.
- Deng H.X., Chen W., Hong S.T. et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia // Nature. — 2011. — Vol. 477. — P. 211–215.
- Deng H.X., Tainer J.A., Mitsumoto H. et al. Two novel *SOD1* mutations in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis // Hum. Mol. Genet. — 1995. — Vol. 4. — P. 1113–1136.
- Gilhus N.E., Barnes M.P., Brainin M. Клинические рекомендации по неврологии Европейской федерации неврологических сообществ / Пер. с англ. — 2012. — С. 368–370.
- Hosler B.A., Nicholson G.A., Sapp P.C. et al. Three novel mutations and two variants in the gene for Cu/Zn superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis // Neuromuscul. Disord. — 1996. — Vol. 6. — P. 361–366.
- Kawamata J., Hasegawa H., Shimohama S. et al. Leu106-to-val (CTC-to-GTC) mutation of superoxide dismutase-1 gene in patient with familial amyotrophic lateral sclerosis in Japan // Lancet. — 1994. — Vol. 343. — P. 1501.
- Luigetti M., Conte A., Madia F. et al. Heterozygous *SOD1* D90A mutation presenting as slowly progressive predominant upper motor neuron amyotrophic lateral sclerosis // Neurol. Sci. — 2009. — Vol. 30. — P. 517–520.
- Marinkovic P., Reuter M.S., Brill M.S. et al. Axonal transport deficits and degeneration can evolve independently in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2012. — Vol. 109. — P. 4296–4301.
- Millecamps S., Salachas F., Cazeneuve C. et al. *SOD1*, *ANG*, *VAPB*, *TARDBP*, and *FUS* mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations // J. Med. Genet. — 2010. — Vol. 47. — P. 554–560.
- Miller T., Smith R., Pestronk A. et al. Results of a Phase 1, Double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of ISIS 333611 administered intrathecally to patients with familial ALS due to *SOD1* gene mutations // Neurology. — 2012. — Vol. 78 (Meeting Abstracts 1). — S25.001.
- Rabe M., Felbecker A., Waibel S. et al. The epidemiology of CuZn-SOD mutations in Germany: a study of 217 families // J. Neurol. — 2010. — Vol. 257. — P. 1298–1302.
- Rosen D.R., Siddique T., Patterson D. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis // Nature. — 1993. — Vol. 362. — P. 59–62.
- Sahawneh M.A., Ricart K.C., Roberts B.R. et al. Cu,Zn-superoxide dismutase increases toxicity of mutant and zinc-deficient superoxide dismutase by enhancing protein stability // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285. — P. 33885–33897.
- Sato T., Nakanishi T., Yamamoto Y. et al. Rapid disease progression correlates with instability of mutant *SOD1* in familial ALS // Neurology. — 2005. — Vol. 65. — P. 1954–1957.

Frequency of mutations in the *SOD1* gene in Russian patients with amyotrophic lateral sclerosis

Lysogorskaia E.V., Abramychева N.Iu., Zakharova M.N., Illarionov S.N.

Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by progressive loss of cortical and spinal motor neurons, the development of paralyses, and death from respiratory and bulbar failure. About 10% of ALS cases are caused by mutations in several genes, among which most important is Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*) gene. Two hundred and six ALS patients (98 females and 108 males) were examined, including 9 patients from 8 unrelated families with a familial form of ALS. On molecular genetic analysis, *SOD1* coding mutations were detected in 50% of familial cases and 3% of sporadic cases of the disease. In the paper, a spectrum of mutations revealed in Russian patients with ALS and most representative cases of a familial form of ALS demonstrating the need for medical genetic counseling in affected families are presented.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, *SOD1* gene, mutation analysis, medical genetic counseling

Вариабельность генов интерлейкина 4 и его рецептора в популяциях коренных народов Сибири*

Степанов В.А., Трифонова Е.А., Симонова К.В., Чередниченко А.А.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики СО РАМН,
634050, Набережная Ушайки 10, Томск, Россия, vadim.stepanov@medgenetics.ru

Исследовано генетическое разнообразие популяций четырёх этнических групп коренного населения Сибири (буряты, якуты, кеты, ханты) по SNP-маркерам генов интерлейкина 4 и α -цепи рецептора интерлейкина 4. В исследованных популяциях, за исключением хантов, выявлен близкий спектр частот аллелей, сходный уровень ожидаемой гетерозиготности и показана низкая степень генетической дифференциации популяций.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, коренные народы Сибири, интерлейкины

Интерлейкин 4 (IL4) является ключевым медиатором иммунного ответа, опосредованного Т-хелперами 2-го типа (Th2-ответ). Продукция интерлейкинов 4, 5 и 13 Т-хелперами второго типа активирует В-клетки, способствуя развитию гуморального иммунного ответа, в частности, при инфицировании гельминтами и ответе на токсины. Связывание интерлейкина 4 лимфоцитами осуществляется посредством его взаимодействия с рецептором, специфичным для IL4 и IL13. По данным полногеномных ассоциативных исследований и мета-анализа ассоциаций случай-контроль, ряд полиморфных маркеров генов интерлейкина 4 (IL4) и α -цепи его рецептора (IL4R) ассоциирован с повышенным производством иммуноглобулина Е, астмой, атопией, и эндотипами этих и ряда других заболеваний [6, 11, 16].

В связи с участием в иммунных реакциях на внешние патогены, гены IL4 и IL4R могли быть мишенями для естественного отбора в ходе расселения современного человека. Ряд недавних работ указывает на участие отбора в формировании спектра частот этих генов в современных популяциях человека и снижение частоты провоспалительных аллелей в популяциях умеренного и арктического климата [1, 2, 7, 14].

Задачей настоящей работы было определить частоты аллелей пяти SNP в генах интерлейкина 4 и его рецептора в популяционных выборках из четырёх коренных этнических групп Сибири — хантов, кетов, бурят и якутов.

На основании данных ассоциативных исследований было выбрано 2 SNP в гене IL4 (rs2070874 и rs2227284) и 3 SNP в гене IL4R (rs144651842, rs1801275 и rs1805015) (табл. 1). Аллели выбранных маркеров гена IL4 ассоциированы с уровнем IgE и астмой в нескольких этнических группах [3, 5, 8, 10, 15]. SNP гена IL4R демонстрируют ассоциации с атопией, аллергическим ринитом, астмой и экземой (табл. 1) [4, 9, 12, 13].

Ханты, живущие в Западной Сибири и говорящие на языке финно-угорской семьи, были представлены выборкой из пос. Казым Ханты-Мансийского АО (N=44). Буряты (N=50) были собраны пос. Курумкан в Республике Бурятия, якуты (N=44) — в пос. Бяди Республики Саха (Якутия). Буряты говорят на языке монгольской группы алтайской языковой семьи, а язык якутов относится к тюркской группе той же семьи. Кеты (N=42), живущие в среднем и нижнем течении Енисея и говорящие на одном из изолированных палеосибирских языков, были собраны в пос. Келлог Красноярского края.

ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови стандартным методом. Генотипирование осуществляли с помощью мультиплексной ПЦР методом тандемной масс-спектрометрии на анализаторе «Sequenom MassARRAY 4» (Sequenom, США) по протоколам производителя. Статистический анализ частот генов и генотипов проводили в пакете программ Arlequin.

Распределение генотипов, частоты аллелей и показатели генетического разнообразия по исследованным маркерам приведены в табл. 2. Два SNP гена IL4 оказались высокополиморфными с частотами минорного аллеля в диапазоне от 29 до 50%. Частота более редкого аллеля маркеров гена IL4R варьирует от 3,5 до 17%. Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга было зафиксировано лишь в одном случае из 20 — для rs1805015 гена IL4R у кетов. Точный тест дифференциации популяций выявил значимые отличия хантов от всех остальных популяций по rs2070874 и от популяций кетов и якутов по rs2227284 гена IL4. По маркерам гена IL4R исследованные популяции демонстрируют сходный спектр аллельных частот. Общий уровень генетического разнообразия варьирует в небольших пределах — от 0,326 у хантов до 0,361 у кетов.

* Работа частично финансировалась ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» (госконтракт №11.519.11.2036), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (соглашение №8042), Российским Фондом фундаментальных исследований (грант №12-04-00595а).

Таблица 1

Характеристика исследованных SNP

SNP (rs)	Позиция на хромосоме ¹	Локализация в гене	Мутация	Аллель, ассоциированный с заболеваниями
<i>IL4</i> (хромосома 5)				
rs2070874	132009710 (+)	5' UTR	C>T	T
rs2227284	132012725 (-)	Инtron	A>C	A
<i>IL4R</i> (хромосома 16)				
rs1805015	27374180 (+)	Экзон	T>C (Ser503Pro)	C
rs1801275	27374400 (+)	Экзон	A>G (Gln576Arg)	G
rs144651842	27356224 (+)	Экзон	G>A (Ala82Thr)	A
Примечание. ¹ Позиция на хромосоме дана по базе данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) с указанием цепи ДНК				

Таблица 2

Распределение генотипов и частоты аллелей генов *IL4* и *IL4R* в популяциях Сибири

Ген/SNP	Аллели/генотипы	Буряты	Ханты	Кеты	Якуты
<i>IL4</i> / rs2070874	C	0,500	0,705	0,450	0,512
	T	0,500	0,295	0,550	0,488
	CC	13	22	9	11
	CT	24	18	18	21
	TT	13	4	13	10
	PXB (p)	0,783	1,000	0,537	1,000
<i>IL4</i> / rs2227284	C	0,460	0,614	0,378	0,378
	A	0,540	0,386	0,622	0,622
	CC	10	16	6	7
	CA	26	22	19	17
	AA	14	6	16	17
	PXB (p)	1,000	1,000	1,000	0,508
<i>IL4R</i> / rs1805015	C	0,090	0,034	0,098	0,095
	T	0,910	0,966	0,902	0,905
	CC	0	0	2	0
	CT	9	3	4	8
	TT	41	41	35	34
	PXB (p)	1,000	1,000	0,029	1,000
<i>IL4R</i> / rs1801275	G	0,160	0,148	0,150	0,167
	A	0,840	0,852	0,850	0,833
	GG	0	0	2	2
	GA	16	13	8	10
	AA	34	31	30	30
	PXB (p)	0,327	0,567	0,186	0,303
<i>IL4R</i> / rs144651842	G	0,810	0,761	0,737	0,869
	A	0,190	0,239	0,263	0,131
	GG	32	26	24	32
	GA	17	15	11	9
	AA	1	3	5	1
	PXB (p)	0,668	0,681	0,092	0,527
H		0,351	0,326	0,361	0,333
Fst		0,014			

Примечание. PXB (p) — уровень значимости точного теста на соответствие равновесию Харди–Вайнберга; H — средняя ожидаемая гетерозиготность популяции по пяти SNP; Fst — среднее значение коэффициента генной дифференциации четырех популяций по пяти SNP

Межпопуляционные различия и генетическая дифференциация популяций

Ген / SNP	Значимые межпопуляционные различия (p) ¹	Fst (p)
<i>IL4</i> / rs2070874	Ханты-буряты (0,023), ханты-кеты (0,009), ханты-якуты (0,041)	0,038 (p=0,009)
<i>IL4</i> / rs2227284	Ханты-кеты (0,010), ханты-якуты (0,005)	0,037 (p=0,009)
<i>IL4R</i> / rs1805015	—	0,001 (p=0,400)
<i>IL4R</i> / rs1801275	—	-0,011 (p=0,991)
<i>IL4R</i> / rs144651842	—	0,008 (p=0,194)
Примечание. ¹ Приведены уровни значимости точного теста дифференциации популяций		

Близость коренных сибирских популяций по исследованным полиморфным маркерам подтверждается и невысоким средним значением коэффициента генетической дифференциации *Fst* (1,4%), при этом подразделённость по маркерам гена *IL4* относительно высока, а по SNP гена *IL4R* — незначительна.

Полученные в настоящей работе данные дополняют представление о вариабельности генов, вовлечённых в иммунный ответ, о генофондах народов Сибири и будут использованы в дальнейших работах по анализу иммунно-зависимой патологии и роли естественного отбора в формировании генетического разнообразия популяций человека.

Список литературы

1. Степанов В.А., Канделария П., Кхо С. и др. Деканализация иммунного ответа при расселении современного человека: связь генетического разнообразия в генах иммунной системы с климато-географическими факторами // Медицинская Генетика. — В печати.
2. Abi-Rached et al. The shaping of modern human immune systems by multiregional admixture with archaic humans // Science. — 2011. — Vol. 334, №6052. — P. 89–94.
3. Baschore M.J., Howard T.D., Lange L.A. et al. A comprehensive evaluation of *IL4* variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects // J. Allergy Clin. Immunol. — 2004. — Vol. 114. — P. 80–87.
4. Battle N.C., Choudhry S., et al. Ethnicity-specific gene-gene interaction between *IL-13* and *IL-4Ralpha* among African Americans with asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2007. — 1. — Vol. 175, №9. — P. 881–887.
5. Beghe B. et al. Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population // Clin. Exp. Allergy. — 2003. — Vol. 33. — P. 1111–1119.
6. Granada M., Wilk J.B., Tuzova M. et al. A genome-wide association study of plasma total IgE concentrations in the Framingham Heart Study // J. Allergy Clin. Immunol. — 2012. — Vol. 129. — P. 840–845.
7. Hancock A.M., Witonsky D.B., Alkorta-Aranburu G. et al. Adaptations to climate-mediated selective pressures in humans // PLoS Genetics. — 2011. — Vol. 7, №4. — e1001375. doi:10.1371/journal.pgen.1001375
8. Isidoro-Garcia M., Davila I., Laffond E. et al. Interleukin-4 (*IL4*) and interleukin-4 receptor (*IL4RA*) polymorphisms in asthma: a case control study // Clin. And Mol. Allergy. — 2005. — Vol. 3.
9. Izuhara K., Shirakawa T. Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy // Int. J. Mol. Med. 1999. — Vol. 3, №1. — P. 3–10.
10. Kabesch M., Tzotcheva I., Carr D. et al. A complete screening of the *IL4* gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood // J. Allergy Clin. Immunol. — 2003. — Vol. 112. — P. 893–898.
11. Li Y., Guo B., Zhang L. et al. Association between C-589T polymorphisms of interleukin-4 gene promoter and asthma: a meta-analysis // Respir. Med. — 2008. — Vol. 102. — P. 984–982.
12. Migliaccio C., Patuzzo C. et al. No linkage or association of five polymorphisms in the interleukin-4 receptor alpha gene with atopic asthma in Italian families // Eur. J. Immunogenet. — 2003. — Vol. 30, №5. — P. 349–353.
13. Nieters A., Linseisen J., Becker N. Association of polymorphisms in *Th1*, *Th2* cytokine genes with hayfever and atopy in a subsample of EPIC-Heidelberg // Clin. Exp. Allergy. — 2004. — Vol. 34, №3. — P. 346–353.
14. Sabeti P.C., Schaffner S.F., Fry B. et al. Positive natural selection in the human lineage // Science. — 2006. — Vol. 312. — P. 1614–1620.
15. Suzuki I., Hizawa N., Yamaguchi E., Kawakami Y. Association between a C+33T polymorphism in the *IL-4* promoter region and total serum IgE levels // Clin. Exp. Allergy. — 2000. — Vol. 30. — P. 1746–1749.
16. Yang H.J. Association between the interleukin-4 gene C-589T and C+33T polymorphisms and asthma risk: a meta-analysis // Arch. Med. — res. 2–13. — Vol. 44. — P. 127–135.

Variability of interleukin 4 and its receptor genes in native populations of Siberia

Stepanov V.A., Trifonova E.A., Simonova K.V., Cherednichenko A.A.

Research Institute for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch.
Nab. Ushayky 10, 634050 Tomsk, Russia, e-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru

Genetic diversity of SNP markers of Interleukin 4 alpha and Interleukin 4 receptor genes was investigated in 4 populations of native Siberian ethnic groups (Buryat, Yakut, Ket and Khant). In the populations under study, except Khants, the close spectrum of allele frequencies and similar level of expected heterozygosity were revealed and low level of genetic differentiation was found.

Key words: genetic diversity, native Siberian populations, interleukins