

Главный редактор
ГИНТЕР Е.К.
 академик РАН, д.б.н., профессор
Заместители главного редактора
ПУЗЫРЕВ В.П.
 академик РАН, д.м.н., профессор
БАРАНОВ В.С.
 чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
Ответственный секретарь
ИЖЕВСКАЯ В.Л.
 д.м.н.
Редакционная коллегия
АРЧАКОВ А.И.
 академик РАН, д.б.н., профессор
ВОЕВОДА М.И.
 чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
ДУРНЕВ А.Д.
 чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
ИВАНОВ В.П.
 д.б.н., профессор
ИЛЛАРИОШКИН С.Н.
 д.м.н., профессор
КОЗЛОВА С.И.
 д.м.н., профессор
КОПНИН Б.П.
 д.б.н., профессор
КУЦЕВ С.И.
 д.м.н.
КУЧИНСКАС В. (Kucinskas V.)
 академик Литовской АН, д.б.н., профессор
ЛИМБОРСКАЯ С.А.
 д.б.н., профессор
МАЦЕК М. (Macek M. Jr.)
 доктор медицины и педиатрии (MD),
 доктор философии по медицине и молекуляр-
 ной генетике (PhD), профессор
МИХАЙЛОВА Л.К.
 д.м.н., профессор
НАЗАРЕНКО Л.П.
 д.м.н., профессор
НОВИКОВ П.В.
 д.м.н., профессор
НОСИКОВ В.В.
 д.б.н., профессор
РОГАЕВ Е.И.
 д.б.н., профессор
РУБЦОВ Н.Б.
 д.б.н., профессор
СВЕРДЛОВ Е.Д.
 академик РАН, д.б.н., профессор
СЕРЕДЕНИН С.Б.
 академик РАН, д.м.н., профессор
СМИРНОВ В.Н.
 академик РАН, д.м.н., профессор
СТЕПАНОВ В.А.
 д.б.н., профессор
ЧЕХОНИН В.П.
 академик РАН, д.б.н., профессор
ЧУЧАЛИН А.Г.
 академик РАН, д.м.н., профессор

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

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

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

© Российское общество медицинских генетиков
 © Российская академия медицинских наук
 © Медико-генетический научный центр РАМН
 © ООО «Издательство «Гениус Медиа»
 Тираж 200 экз.

Медицинская ГЕНЕТИКА

Ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал

2014 г. Том 13. №4 (142)

СОДЕРЖАНИЕ

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

- Султанова Р.И., Хусаинова Р.И., Надыршина Д.Д.,
 Нургалиева А.Х., Хуснутдинова Э.К.**
 Клинико-генетические аспекты интракраниальных аневризм3
- Шильникова Е.М., Мазилина М.А., Федорова И.Д.**
 Нарушение целостности ДНК сперматозоидов человека:
 причины, методы исследования, влияние на исход программ
 вспомогательных репродуктивных технологий 11
- Хусаинова Р.И., Хуснутдинова Э.К.**
 Современные представления
 о генетических аспектах остеопороза20

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Батенева Е.И., Максименко В.А., Кадочникова В.В.,
 Кофиади И.А., Трофимов Д.Ю., Рагимов А.А., Алексеев Л.П.**
 Выявление мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* –
 перспективность проведения генетического скрининга
 на базе организаций службы крови30
- Волков А.Н., Лошакова Л.Ю., Падыюкова А.Д.**
 Полиморфизм генетических маркёров
rs2245803 (Lys18Thr) и *rs1784423* (Val275Ala) гена *MMP20*
 у детей дошкольного возраста с различным уровнем кариеса35
- Баканова М.Л., Минина В.И., Савченко Я.А.,
 Рыжкова А.В., Головина Т.А., Титов В.А., Вержбицкая Н.Е.,
 Вафин И.А., Рагожина С.Е.**
 Хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови
 у больных раком лёгкого, проживающих в Кемеровской области39
- Минайчева Л.И., Куровский А.В., Назаренко Л.П.**
 Сравнительный анализ
 частоты врождённых пороков развития
 у новорожденных в сибирских популяциях44

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

Executive editor
IZHEVSKAYA V.L.

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

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

Medical GENETICS

Monthly reviewed scientific and practical journal

2014. Volume 13. №4 (142)

Content

REVIEWS

<i>Sultanova R.I., Khusainova R.I., Nadirshina D.D., Nurgalieva A.X., Khusnutdinova E.K.</i> Clinical and genetic aspects of intracranial aneurysm.....	3
<i>Shilnikova E.M., Mazilina M.A., Fedorova I.D.</i> Human sperm DNA fragmentation: origins, methods and impact on reproductive outcome.....	11
<i>Khusainova R.I., Khusnutdinova E.K.</i> Modern concepts of osteoporosis genetic aspects.....	20

ARTICLES

<i>Bateneva E.I., Maksimenko V.A., Kadochnikova V.V., Kofiadi I.A., Trofimov D.Yu., Ragimov A.A., Alexeev L.P.</i> Identification of <i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> mutations – genetic screening availability on blood service basis.....	30
<i>Volkov A.N., Loshakova L.J., Padukova A.D.</i> Polymorphism of <i>rs2245803</i> (Lys18Thr) and <i>rs1784423</i> (Val275Ala) markers of the <i>MMP20</i> gene in preschool children with different severity of dental caries.....	35
<i>Bakanova M.L., Minina V.I., Savchenko Y.A., Ryzhkov A.V., Golovina T.A., Titov V.A., Vergbitskaya N.E., Vafin I.A., Ragozhina S.E.</i> Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes in lung cancer patients of Kemerovo region	39
<i>Minaycheva L.I., Kurovskiy A.V., Nazarenko L.P.</i> Comparative analysis of the frequencies of congenital malformations in newborns among Siberian populations.....	44

Клинико-генетические аспекты интракраниальных аневризм

Султанова Р.И., Хусаинова Р.И., Надыршина Д.Д., Нургалиева А.Х., Хуснутдинова Э.К.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный университет», г.Уфа, ул. Заки Валиди, 32; e-mail: r-ka@mail.ru

Аневризмы сосудов головного мозга (МКБ-10 I72) — заболевания многофакторной природы, приводящие к спонтанным субарахноидальным кровоизлияниям (САК). Каждый год более чем у 30 тыс. людей происходят разрывы аневризм, что приводит к особо тяжёлым формам инсульта. Половина этих людей умирает, 25% становятся инвалидами из-за утраты речи, зрения и координации движений, у оставшихся 25% повышен риск повторных инсультов. Существуют очевидные доказательства вклада генетических факторов в патогенез заболевания. В представленном обзоре проведён анализ современных тенденций в изучении предрасположенности к аневризмам сосудов головного мозга.

Ключевые слова: интракраниальные аневризмы, гены-кандидаты, мутации, полиморфизм ДНК

Введение

Аневризма сосудов головного мозга, церебральная аневризма или интракраниальная аневризма (ИА) — разновидность аневризм, при которых поражается одна из артерий головного мозга. Распространённость заболевания колеблется от 1 до 8% в различных популяциях мира [25, 40]. Аневризмы сосудов головного мозга вследствие их разрыва приводят к особо тяжёлым формам инсульта (САК), частота которых достигает 6 на 100 тыс. населения в год, и являются актуальной медицинской и социальной проблемой [67]. Половина больных после разрыва аневризмы умирает, 25% становятся инвалидами из-за утраты речи, зрения и координации движений, у оставшихся 25% повышен риск повторных инсультов [48, 52]. Частота САК в России варьирует от 6 до 19,4 на 100 тыс. населения в год [5].

Этиология и патогенез ИА служат предметом изучения в течение длительного времени. Доказано влияние ряда факторов, таких, как артериальная гипертензия, курение, употребление алкоголя и кокаина, наличие сопутствующих заболеваний соединительной ткани [19, 42, 45, 50, 61]. Существуют очевидные доказательства, что предрасположенность к аневризмам имеет значительный генетический компонент. Исследования кандидатных генов привели к идентификации относительно небольшого числа генов, вовлечённых в патогенез ИА. Несколько групп исследователей выявили, что дефекты коллагена III типа, основного компонента стенки артерий, являются фактором риска ИА, в других исследованиях такие ассоциации не были обнаружены, что, видимо, связано с различиями структуры генофонда изученных популяций [32, 39, 66]. Также выявлена ассоциация ИА с генами, вовлечёнными в процессы регуляции сосудистого тонуса, среди которых гены ангиотензинпревращающего фермента (*ACE*) и белка аполиipoproteина E (*ApoE*), полиморфные варианты которых, по

данным ряда исследователей, ассоциированы и с эссенциальной гипертензией [41, 61]. Обнаружена значимость в патогенезе заболевания полиморфных вариантов генов, продукты которых вовлечены в сигнальные пути трансформирующего фактора роста бета, серин-треонин киназ, хемокинов, кальция, нейротрофина, участвуют в клеточном цикле, локальной адгезии, апоптозе [10]. Несмотря на достигнутый прогресс, проблема генетической предрасположенности к аневризмам сосудов головного мозга чрезвычайно актуальна и ещё далека от разрешения.

Целью данной работы является систематизация накопленных данных об эпидемиологии, классификации, этиологии, патогенезе и молекулярно-генетических основах аневризм сосудов головного мозга.

Эпидемиология аневризм сосудов головного мозга

Сообщения об артериальных аневризмах церебральных сосудов появились в первой половине XVIII века, хотя имеются сведения, что заболевание, схожее по проявлениям с системными аневризмами, было известно в древности [4]. Однако прижизненная диагностика артериальных аневризм головного мозга была редкостью. В 1927 г. E. Moniz ввёл в практику нейрохирургии церебральную ангиографию, и диагностика аневризм упростилась, спустя 10 лет W.E. Dandy впервые произвёл удачное хирургическое лечение разрыва аневризмы [2].

В отличие от других сосудистых заболеваний головного мозга, аневризмы чаще наблюдаются у лиц молодого и среднего возраста и обнаружены даже у детей (0,5—4,6%) [24, 40]. Частота аневризм выше у подростков (15—19 лет) — 0,51 на 100 000 по сравнению с детьми младшей возрастной группы, у которых её частота не превышает 0,06 (0—4 года), 0,05 (5—9 лет), 0,09 (10—14 лет) [27].

Распространённость ИА среди населения старше 30 лет составляет от 3,6 до 6,5 на 100 000 [25, 64]. Соотношение больных женщин и мужчин составляет 3:1. САК, вследствие разрыва ИА, происходит примерно в 1,24 раза чаще у женщин, чем у мужчин [55] и в 2,1 раза чаще у представителей негроидной расы, чем у европеоидов [13]. Более половины (51%) аневризм приходится на артериальные аневризмы. Мировая статистика показывает, что из пяти носителей артериальной аневризмы три погибают, один становится инвалидом и только один сохраняет трудоспособность. Главная причина этого связана с возникновением САК у относительно молодых людей и плохими исходами [20, 29]. На долю САК приходится четверть летальных исходов вследствие цереброваскулярных заболеваний [6, 53]. В то же время своевременная диагностика и хирургическое лечение дают хороший результат (послеоперационная летальность составляет около 5%).

Данные Всемирной Организация Здравоохранения (ВОЗ) показали 10-кратное изменение (с поправкой на возраст) ежегодной заболеваемости САК в Европе и Азии, от 2,0 на 100 000 населения в Китае до 22,5 случаев на 100 000 населения в Финляндии [16].

Частота САК в России варьирует от 6 до 19,4 на 100 тыс. населения в год [5], по данным регистра по результатам частота геморрагических инсультов в России увеличилась за последние годы и составила 0,57 на 1000 населения в год [1].

Патогенез и классификация заболевания

Прогрессу в понимании патогенеза ИА препятствует его многофакторная природа. Около 4–5% аневризм развивается в связи с попаданием в артерии мозга инфицированных эмболов. В происхождении крупных сферических и S-образных аневризм несомненную роль играет атеросклероз. Возникновение мешотчатых аневризм связывают с врождённой неполноценностью артериальной системы головного мозга [5].

Гемодинамические нагрузки на сосуды являются факторами, играющими важную роль в патогенезе аневризм [43, 45, 51, 60, 61]. Формированию ИА могут способствовать как региональные (артериовенозные мальформации, фиброзно-мышечная дисплазия и др.), так и системные (гипертоническая болезнь, поликистоз почек, коарктация аорты) гемодинамические нарушения.

Немалую роль играют полученные травмы [11]. Очень редко ИА развиваются при метастазировании некоторых опухолей (миксомы предсердия, хориокарциномы и недифференцированные карциномы) [4]. Воспалительные и иммунологические реакции также могут быть связаны с формированием ИА [14].

Аневризмы могут быть одиночными (70–75%) или множественными (25–30%) [30]. При диагностике заболевания должны учитываться факторы, касающиеся как

самих аневризм (размер, морфология, наличие тромба, местоположение), так и факторы самого пациента (возраст, медицинская история, семейный анамнез, наличие вредных привычек и сопутствующих заболеваний) [38]. Семейные случаи аневризм составляют 7–20% и, как правило, не связаны ни с одним из наследственных заболеваний соединительной ткани [54].

Низкая частота САК по сравнению с распространённостью неразорвавшихся ИА указывает на необходимость выявления ключевых факторов, приводящих к разрыву аневризмы, для успешной ранней диагностики и лечения. Послеоперационная летальность при ранней диагностике составляет около 5%. Ранние ретроспективные исследования показали, что размер ИА является главным предиктором разрыва [70]. В среднем ежегодный риск разрыва ИА диаметром <10 мм составляет 1,1% [28].

Артериальные аневризмы сосудов головного мозга, как и аневризмы другой локализации, представляют собой патологическое выпячивание стенки артерии на небольшом её участке.

Внутричерепные аневризмы классифицируют по морфологическим формам, величине и по сосуду, в котором они расположены.

Классификацию аневризм головного мозга, основанную на этиологическом и патогенетическом принципах, предлагает Медведев с соавторами [6]. По этой классификации выделяют:

1. Бифуркационно-гемодинамические ИА — БГИА (ранее называвшиеся врождёнными);
2. ИА при некоторых наследственных мезенхимопатиях;
3. Дегенеративно-некротические ИА;
4. Травматические ИА (при черепно-мозговой травме);
5. Воспалительные ИА;
6. Эмболические ИА;
7. Дизэмбриогенетические ИА и аневризмоподобные образования;
8. Ятрогенные ИА;
9. Прочие ИА.

Роль генетических факторов в развитии артериальных аневризм

Генетические факторы вносят существенный вклад в патогенез ИА. Приблизительно 3% случаев САК происходят у родственников первой степени родства и считаются семейными случаями. Семейные случаи САК наблюдаются при моногенных заболеваниях, в том числе при аутосомно-доминантном поликистозе почек (ADPKD), вызванном мутациями в генах *PKD1* и *PKD2*, при аутосомно-рецессивном поликистозе почек (ARPKD), вызванном мутациями в гене *PKHD1* [18, 43], и других синдромах, таких, как синдромы Элерса—Данлоса типа 4 [47, 49], Марфана [60], фиброзно-мышечной дисплазии [19], нейрофиброматозе [49] и синдроме Альпорта [65].

Проводятся активный поиск генов-кандидатов развития аневризм сосудов головного мозга и выявление ассоциаций полиморфных вариантов кандидатных генов с аневризмами [32, 39, 66]. Обнаружено участие полиморфных вариантов гена эндотелиальной синтазы оксида азота (*eNOS*) и интерлейкина 6 (*IL-6*) в формировании предрасположенности к ИА. Белок *eNOS* катализирует синтез NO, регулирует базальный сосудистый тонус, мозговой кровоток и пролиферацию гладкомышечных клеток эндотелия артерий [15]. Полиморфизм с.Т786С гена *eNOS* является маркером риска развития и разрыва ИА. IL-6 — провоспалительный цитокин, его повышенный уровень был обнаружен при разрыве аневризмы в предоперационной и интраоперационной ситуациях [58], следовательно, увеличение уровня IL-6 в плазме играет важную роль в патогенезе заболевания. Аллель С полиморфного варианта G572С увеличивает уровень IL-6 в плазме и является маркером повышенного риска ИА, в то время как аллель С полиморфизма С174G вызывает снижение уровня IL-6 и является протективным в отношении ИА.

Одним из направлений изучения генетической предрасположенности к ИА является исследование генов, участвующих в процессах регуляции сосудистого тонуса. Наиболее привлекательны в этом плане гены ангиотензинпревращающего фермента (*ACE*) и белка аполиipoproteина E (*ApoE*), полиморфные варианты которых ассоциированы с эссенциальной гипертензией, по данным ряда исследователей [40, 60]. Генами-кандидатами также являются ген перлекана в локусе 1p, который кодирует протеогликан гепарансульфат, участвующий в поддержании внеклеточного матрикса (*ECM*) артериальной стенки [56] и ген калликреина 8 (*KLK8*), играющего роль в воспалении, контроле артериального давления и коагуляции [69].

Несколько групп исследователей предположили, что дефекты коллагена III типа являются фактором риска ИА [39, 42, 45, 50, 66]. Коллаген III типа — второй по распространённости коллаген в организме человека после коллагена I типа — является основным компонентом стенки больших артерий и обнаруживается в меньшем количестве во многих тканях, богатых коллагеном I типа [51]. Обнаружены маркеры, ассоциированные с ИА, в локусе 7q11, где расположен ген эластина [44], который, как и коллаген, является одним из компонентов стенки артерий.

Большой интерес представляют продукты гена эндотелиального фактора роста сосудов (*VEGF*), которые влияют на развитие новых кровеносных сосудов (ангиогенез) и выживание незрелых кровеносных сосудов (сосудистая поддержка), связываясь с двумя близкими по строению мембранными тирозинкиназными рецепторами (рецептором-1 VEGF и рецептором-2 VEGF), активируя их. Эти рецепторы экспрессируются клетками эндотелия стенки кровеносных сосудов [16, 21]. Связывание VEGF с этими рецепторами запускает сигнальный каскад, который, в ко-

нечном итоге, стимулирует рост эндотелиальных клеток сосудов, их выживание и пролиферацию. Эндотелиальные клетки участвуют в таких разнообразных процессах, как вазоконстрикция и вазодилатация, презентация антигенов, а также служат очень важными элементами всех кровеносных сосудов — как капилляров, так и вен или артерий. Таким образом, стимулируя эндотелиальные клетки, VEGF играет центральную роль в процессе ангиогенеза. Роль VEGF в развитии аневризм сосудов головного мозга ещё предстоит выяснить.

Матриксные металлопротеиназы (MMP) — семейство внеклеточных цинкзависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса. Они играют роль в ремоделировании тканей, ангиогенезе, пролиферации, миграции и дифференциации клеток. Обнаружена повышенная экспрессия генов *MMP1*, *MMP2* и *MMP9* в стенках сосудов с аневризмами [29, 63], полиморфные варианты генов матриксных металлопротеиназ, ассоциированных с ИА, предстоит идентифицировать.

Возможно, что мутации в гене *VHL* ассоциированы с развитием аневризм, так как приводят к нарушению регуляции различных белков и медиаторов, участвующих в поддержании структуры артериальной стенки [62, 74], в том числе VEGF, MMP, коллагена III типа, фибронектина, эластазы, ламинина, альфа-1-антитрипсина, фактора роста фибробластов, трансформирующего фактора роста (TGF), тромбоцитарного фактора роста (PDGF), полицистина, фибриллина [74] и фактора, индуцируемого гипоксией (HIF) [31, 74]. При исследовании гена *VHL* у больных ИА чаще, чем в контроле, встречались 3 изменения в интронах (с.341-6С>Т, с.463+8С>Т и с.463+43А>G), однако различия не достигли статистически значимых значений, возможно, из-за небольшого объёма выборки. При секвенировании гена *VHL* обнаружена мутация с256С>Т, приводящая к замене пролина на серин в последовательности аминокислот [25, 31, 32]. Предполагается связь между ИА с болезнью Хиппеля—Линдау, обусловленной мутациями в гене *VHL*, а также с гемангиобластомой [62].

В настоящее время появились новые методы генетических исследований с использованием полногеномного скрининга и проведением анализа ассоциаций заболевания с сотнями тысяч полиморфных вариантов различных генов (GWAS), основанные на использовании программы НарМар в сочетании с техникой биочипов высокого разрешения. Были предприняты попытки полногеномного исследования ассоциаций с использованием чипа, включающего ~500,000 однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNPs) с аневризмами сосудов головного мозга. Обнаружена ассоциация полиморфных вариантов генов, продукты которых вовлечены в сигнальные пути трансформирующего фактора роста бета, серин-треонин киназ, хемокинов, кальция, нейротрофина, участвующих в клеточном цикле, локальной адгезии, апоптозе [10, 46].

GWAS семейных случаев ИА выявили несколько хромосомных локусов [31], в том числе локусы, ассоциированы с ИА в различных популяциях: 1p34.3 — p36.13 [20], 7q11 [9], 19q13.3 и Xp22. Локус 5q22 -31, расположенный вблизи гена версикана, также является кандидатным для развития ИА, так как версикан играет важную роль во внеклеточном матриксе [56].

По данным исследований Ясуно с соавторами, были обнаружены ассоциации ИА с генами *BOLL/PLCL1*, *SOX17*, регулируемыми развитие зародышевых клеток и эмбриональное развитие, и кластером генов ингибиторов циклинзависимых киназ (*CDKN2A-CDKN2B*), расположенных в локусах 2q33.1 8q11.23 и 9p23.1 и вовлечённых в TGF-бета метаболический путь. Последующее изучение той же группы генов подтвердило ассоциацию ИА с генами *SOX17* и *CDKN2A-CDKN2B*, тогда как ассоциации генов *BOLL* и *PLCL1* с развитием ИА не были подтверждены. Кроме того, были описаны 3 однонуклеотидных полиморфизма в генах *CNNM2*, *STARD13* и *RBBP8*, ассоциированные с ИА. Значимые ассоциации были обнаружены с тремя дополнительными локусами, расположенными в генах *EDNRA*, *NDUFA12/NR2C1/FGD6/VEZT* и *RRBP1*. Эти же авторы определили два гена — *BET1L* и *ALDH2*, которые оказались ассоциированными, хотя и незначительно, с ИА [73].

Совсем недавно было обнаружена значительная связь двух геномных локусов 4q31.22 и 9p21.3, расположенных вблизи генов эндотелина (*EDNRA*) и *CDKN2BAS* с развитием ИА в японской популяции [36]. Считается, что сигнальные пути эндотелина-1 и двух его рецепторов играют важную роль в поддержании баланса вазоконстрикции и вазодилатации. До сих пор ни один этих генов не был определён в качестве гена-кандидата ИА. В результате последующих исследований этих генов были получены противоречивые результаты, вероятно, потому, что большинство из них проводилось на выборках небольшого размера [31].

Гены метаболических путей митогенактивируемых киназ *MAP3K7 (TAK1)* и ядерного фактора активации Т-клеток *NFATC2* ассоциированы с ИА в европейских и японской популяциях. При этом гены *HSPA1L*, *PRKGA*, *BRAF*, *RPS6KA2*, *MAP3K2*, *MAP4K2*, *PPP3CA*, *MAPK10*, *FGF12*, *FLNB*, *CHUK*, *MAP3K12* ассоциированы с ИА только в европейской популяции, а гены *DUSP10*, *RAF1*, *NR4A1*, *NFKB1*, *CACNG2*, *CDC25B*, *FOS*, *PLA2G4A*, *RPS6KA3*, *MAP3K5*, *RASGRP3*, *RASGRF1*, *MAPK14*, *RAC1*, *NFATC4*, *CACNA1C* — в японской популяции, гены *SMAD6*, *SMAD3*, *SMAD2*, *SMURF1*, *TGBF2* — в обеих популяциях. Кроме этого, обнаружены дополнительные гены (*AGVR2B*, *SMAD9*, *SMAD7*, *GDF5*, *SMAD1*, *BMP7*, *BMPR1B*, *BMPR1A*, *BMP6*), которые ассоциированы с ИА в европейской популяции, но не обнаружена их связь с ИА у японцев [56].

Gaal с соавторами исследовали риск ИА у лиц, первоначально отобранных для GWAS гипертонии. Их анализ показал, что локус 5q23.2, где расположен ген *PRDM6*, имел самую сильную ассоциацию с ИА. Это достаточно привлекательный ген-кандидат для дальнейшего исследования взаимосвязи между гипертонией и развитием ИА. Полиморфные варианты в этой области также были описаны в связи с их ассоциацией с инфарктом миокарда, аневризмами брюшной аорты и ишемическим инсультом [17].

Отдельное внимание стоит уделить генам, продукты которых вовлечены в сигнальные пути трансформирующего фактора роста бета (TGF-бета), а также двух его рецепторов. Обнаружены ассоциации данного гена с ИА при GWAS [56].

Механизмы действия TGF-бета на клетки различного происхождения раскрыты ещё не полностью. Известно, что TGF-бета, связываясь с комплексом рецепторов I и II типов, активирует серин-треонин протеинкиназный домен рецептора II.

Киназная активность рецептора II стимулирует фосфолипазу C, в результате действия последней из инозитолфосфолипидов образуются инозитолтрифосфат и диацилглицерол. Инозитолтрифосфат стимулирует выход кальция из эндоплазматического ретикулума. Внутриклеточный кальций совместно с диацилглицеролом активируют протеинкиназу C. При этом G-протеин также индуцирует активность протеинкиназы A. В тех типах клеток, в которых TGF-бета стимулирует пролиферацию, белок гена ретинобластомы фосфорилируется и транскрипционный фактор E2F (а возможно, и другие факторы транскрипции) подвергается конформационным изменениям. E2F перемещается в ядро, где усиливает транскрипцию, что приводит к пролиферации клетки.

В тех типах клеток, в которых TGF-бета ингибирует пролиферацию, подавляется транскрипция гена *CDK4*, который необходим для активации циклинзависимой протеинкиназы 2. Это приводит к тому, что не образуется комплекс СОК2—циклин E, необходимый для фосфорилирования белка ретинобластомы, что предотвращает активацию генов раннего ответа и блокирует деление клетки. Выключение гена *TGF-β* приводит к развитию фатальной генерализованной воспалительной патологии, в основе которой лежит аутоиммунный процесс. Следовательно, он является элементом обратной регуляции иммунного ответа и, прежде всего, воспалительной реакции, а также стимулирует ангиогенез [3].

Таким образом, с развитием современных технологий генотипирования наблюдается значительный прогресс в идентификации кандидатных генов ИА, однако предстоит большая работа по определению конкретных механизмов участия выявленных локусов в патофизиологии заболевания и определении индивидуального риска развития ИА.

Эпигенетические исследования интракраниальных аневризм

Термин *эпигенетика* относится к наследственным изменениям в экспрессии генов, которые возникают без первичного изменения ДНК. Примерами эпигенетических изменений являются метилирование ДНК и деацетилирование гистонов (оба процесса приводят к подавлению экспрессии генов), а также участие некодирующих РНК.

На сегодняшний день, эпигенетические исследования аневризм сосудов головного мозга направлены на изучение роли микроРНК, которые вовлечены в посттранскрипционное регулирование генной экспрессии путём связывания с целевыми (таргетными) матричными РНК. МикроРНК взаимодействуют с таргетной РНК путём комплементарного сочетания микроРНК и 3' UTR концом мРНК. Если соединение установлено успешно, мРНК деградирует, в то время как неудачное спаривание между ними ведёт к молчанию гена в ходе трансляционной супрессии [8]. Среди тысяч генов-мишеней, которые регулируются микроРНК [35], многие принадлежат биологическим путям, вовлечённым в иммунную реакцию и апоптоз [37]. Так же, как аневризмы сосудов других частей тела, ИА характеризуются апоптозом гладкомышечных клеток, деградацией внеклеточного матрикса, сильным воспалительным ответом, и увеличением окислительного стресса в стенке сосуда [23].

Тканеспецифичность и фазаспецифичность являются важными характеристиками экспрессии микроРНК [26]. Разные уровни экспрессии показывают, что физиологические функции микроРНК различаются в различных тканях [33]. МикроРНК обнаруживаются в сыворотке в очень стабильной форме [68], которая способна выдержать повторное замораживание и размораживание [7, 68], что делает их привлекательными биомаркерами заболеваний человека.

По результатам исследования роли микроРНК были получены различные данные, по которым регулирование либо подавляется (HSA-микроРНК-4314 и HSA-микроРНК-574-5p), либо повышается (микроРНК-21, микроРНК-22, микроРНК-720 и микроРНК-3665, микроРНК-3679-5p, HSA-микроРНК-1471, HSA-микроРНК-3945, HSA-микроРНК-4253) у больных ИА по сравнению с группами контроля. Перечисленные микроРНК могут играть важную роль в регуляции формирования и развития аневризм. Например, HSA-микроРНК-106b, HSA-микроРНК-22 и HSA-микроРНК-498 регулируют активность рецепторов VEGF, HSA-микроРНК-671 положительно регулирует пролиферацию клеток гладких мышц, как и HSA-микроРНК-574, которая дополнительно положительно регулирует морфогенез кровеносных сосудов через EDN1. HSA-микроРНК-21 может вызвать апоптоз клетки с помощью внеклеточных сигналов, HSA-микроРНК-22 негативно влияет на пролиферацию гладких мышечных клеток через TRIB1 [72],

микроРНК-145 влияет на толщину стенки сосудов, её отсутствие может уменьшить толщину сосудов, обуславливая гипотрофию гладкомышечных клеток [71].

В одном из исследований, которое стоит отметить, было выявлено несколько микроРНК (miR-133a-1/miR-1-2), расположенных на хромосоме 18q11.2 и ассоциированных с семейными случаями ИА [57].

Ген *TP53*, кодирующий транскрипционный фактор p53, играет важную функцию в контроле цикла клетки, апоптозе и поддержании целостности ДНК [34, 59]. Важность белка p53 в регуляции клеточного цикла и целостности ДНК такова, что он был назван «хранителем генома» [34]. При отсутствии повреждений генетического аппарата белок p53 находится в неактивном состоянии, а при появлении повреждений ДНК активируется. Результатом активации p53 является остановка клеточного цикла и репликации ДНК; при сильном стрессовом сигнале — запуск апоптоза. В регуляции активности белка p53 ведущая роль принадлежит посттрансляционным модификациям белка и его взаимодействиям с другими белками. Хорошо известно, что p53 может регулировать экспрессию микроРНК, особенно кластера микроРНК-34 [12, 22, 53]. Был обнаружен однонуклеотидный полиморфизм rs4938723 в промоторной области гена *TP53* в сайте связывания с микроРНК-34b, который ассоциирован с повышенным риском ИА [22].

Изучение эпигенетических факторов заболевания находится на ранних этапах развития, полученные сведения о роли микроРНК в патогенезе ИА являются первыми шагами и требуются большие усилия, чтобы получить диагностически значимые эпигенетические маркёры, прогнозирующие рост, развитие аневризм и их разрыв.

Заключение

Таким образом, на сегодняшний день накоплен большой объём информации об эпидемиологии, этиологии и патогенезе, а также факторах риска развития ИА, таких, как сопутствующие заболевания, гемодинамические нарушения, влияние курения; выявлены гендерные и этнические различия в распространённости заболевания. Идентифицированы некоторые генетические факторы и изучается роль эпигенетических механизмов в формировании аневризм сосудов головного мозга. Несмотря на достигнутый прогресс, проблема генетической предрасположенности к аневризмам сосудов головного мозга чрезвычайно актуальна и ещё далека от разрешения. Необходимо комплексное исследование широкого спектра полиморфных локусов кандидатных генов в различных популяциях, что может послужить основой для разработки алгоритмов пресимптоматической ДНК-диагностики и профилактики заболевания, основанных на понимании генетических механизмов развития ИА.

Список литературы

1. Геморрагический инсульт / Под ред. В.И. Скворцовой, В.В. Крылова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. — 160 с.
2. Злотник Э.И. Аневризмы сосудов головного мозга. — Минск: Беларусь, 1967. — 296 с.
3. Зубова С.Г. Экспрессия трансформирующего фактора роста бета и фактора некроза опухолей альфа в процессе ответа макрофага на активацию: Дисс. на соискание учёной степени кандидата биологических наук: 14.00.14, 03.00.04., 2000. — СПб. — 116 с.
4. Скороход А.А., Бричковская Т.В. Артериальные аневризмы головного мозга: этиология, патогенез // Минск: Медицинский журнал (Белоруссия). — 2007. — №3. — С. 4–7.
5. Лебедев В.В., Гельфенбейн М.С., Евзиков Г.Ю., Белозеров Г.Е. Диагностика и хирургическое лечение острых нарушений мозгового кровообращения по ишемическому типу. — М.: Материалы городского семинара нейрохирургов, 1996. — С. 9–13.
6. Медведев Ю.А., Мацко Д.Е. Классификация аневризм головного мозга, основанная на этиологическом и патогенетическом принципах. Патологическая анатомия хирургических заболеваний нервной системы. — СПб.: Научные труды, 1991. — С. 32–104.
7. Alevizos I., Illei G.G. MicroRNA as biomarkers in rheumatic diseases // *Nat. Rev. Rheumatol.* — 2010. — Vol. 6. — P. 391–398.
8. Angaji S.A., Hedayati S.S., Poor R.H. et al. Application of RNA interference in treating human diseases // *J. Genet.* — 2010. — Vol. 89. — P. 527–537.
9. Baldauf J., Kiwit J., Synowitz M. Cerebral aneurysms associated with von Recklinghausen's neurofibromatosis: report of a case and review of the literature // *Neurology India.* — 2005. — Vol. 53. — P. 213–215.
10. Bakir-Gungor B., Sezerman O.U. The identification of pathway markers in intracranial aneurysm using genome-wide association data from two different populations // *PLoS One.* — 2013. — Vol. 8(3). — e57022.
11. Benoit B.G., Wortzman G. Traumatic cerebral aneurysms. Clinical features and natural history // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* — 1973. — Vol. 36(1). — P. 127–138.
12. Bommer G.T., Gerin I., Feng Y. et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes // *Current Biology.* — 2007. — Vol. 17(15). — P. 1298–1307.
13. Broderick J.P., Brown R.D. Jr, Sauerbeck L. et al. Greater rupture risk for familial as compared to sporadic unruptured intracranial aneurysms // *Stroke.* — 2009. — Vol. 40(6). — P. 1952–1957.
14. Chalouhi N., Ali M.S., Jabbour P.M. et al. Biology of intracranial aneurysms: role of inflammation // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2012. — Vol. 32(9). — P. 1659–1676.
15. Faraci F.M., Brian Jr J.E. Nitric oxide and the cerebral circulation // *Stroke.* — 1994. — Vol. 25. — P. 692–703.
16. Frosen J., Piippo A., Paetau A. et al. Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases // *Stroke.* — 2004. — Vol. 35(10). — P. 2287–2293.
17. Gaal E.I., Salo P., Kristiansson K. et al. International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies. Intracranial aneurysm risk locus 5q23.2 is associated with elevated systolic blood pressure // *PLoS Genet.* — 2012. — Vol. 8. — e1002563.
18. Gabow P.A. Autosomal dominant polycystic kidney disease // *N. Engl. J. Med.* — 1993. — Vol. 329. — P. 332–342.
19. Gloft H.J., Kallmes D.F., Kallmes M.H. et al. Prevalence of cerebral aneurysms in patients with fibromuscular dysplasia: a reassessment // *J Neurosurg.* — 1998. — Vol. 88(3). — P. 436–440.
20. Grobelny T.J. Brain aneurysms: epidemiology, treatment options, and milestones of endovascular treatment evolution // *Disease-a-Month.* — 2011. — Vol. 57. — P. 647–655.
21. Guo F., Li Z., Song L., Han T. et al. Increased apoptosis and cysteinyl aspartate specific protease-3 gene expression in human intracranial aneurysm // *J. Clin. Neurosci.* — 2007. — Vol. 14(6). — P. 550–555.
22. He H., Jazdzewski K., Li W. et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2005. — Vol. 102. — P. 19075–19080.
23. He L., He X., Lim L.P. et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network // *Nature.* — 2007. — Vol. 447(7148). — P. 1130–1134.
24. Inagawa T., Hirano A. Autopsy study of unruptured incidental intracranial aneurysms // *Surgical Neurology.* — 1990. — Vol. 34(6). — P. 361–365.
25. International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms Investigators. Unruptured intracranial aneurysms — risk of rupture and risks of surgical intervention // *New England Journal of Medicine* — 1998. — Vol. 339(24). — P. 1725–1733.
26. Ji R., Cheng Y., Yue J. et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation // *Circ. Res.* — 2007. — Vol. 100. — P. 1579–1588.
27. Jordan L.C., Johnston S.C., Wu Y.W. et al. The importance of cerebral aneurysms in childhood hemorrhagic stroke: a population-based study // *HJ.* — 2009. — Vol. 40(2). — P. 400–405.
28. Juvola S., Porras M., Poussa K. Natural history of unruptured intracranial aneurysms: probability of and risk factors for aneurysm rupture // *Journal of Neurosurgery.* — 2000. — Vol. 93(3). — P. 379–387.
29. Kim S.C., Singh M., Huang J. et al. Matrix metalloproteinase-9 in cerebral aneurysms // *Neurosurgery.* — 1997. — Vol. 41(3). — P. 642–666.
30. Krex D., Schackert H.K., Schackert G. Genesis of cerebral aneurysms—an update // *Acta Neurochirurgica.* — 2001. — Vol. 143. — P. 429–448.
31. Krichek B., Inoue I. The genetics of intracranial aneurysms // *Journal of Human Genetics.* — 2006. — Vol. 51. — P. 587–594.
32. Kuivaniemi H., Prockop D.J., Wu Y. et al. Exclusion of the gene for type III collagen (COL3A1) as a common cause of intracranial aneurysms or cervical artery dissections: results from sequence analysis of the coding sequences of type III collagen from 55 unrelated patients // *Neurology.* — 1993. — Vol. 43. — P. 2652–2658.
33. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A. et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse // *Curr. Biol.* — 2002. — Vol. 12. — P. 735–739.
34. Levine A.J. p53 — the cellular gatekeeper for growth and the division // *Cell.* — 1997. — Vol. 88(3). — P. 323–331.
35. Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets // *Cell.* — 2005. — Vol. 120. — P. 15–20.
36. Low S.K., Takahashi A, Cha P.C. et al. Genome-wide association study for intracranial aneurysm in the Japanese population identifies three candidate susceptible loci and a functional genetic variant at EDNRA // *Human Molecular Genetics.* — 2012. — Vol. 21(9). — P. 2102–2110.
37. Lynam-Lennon N., Maher S.G., Reynolds J.V. The roles of microRNA in cancer and apoptosis // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* — 2009. — Vol. 84. — P. 55–71.
38. Mackey J., Brown Jr R.D., Moomaw C.J. et al. Unruptured intracranial aneurysms in the familial intracranial aneurysm and international study of unruptured intracranial aneurysms cohorts: dif-

- ferences in multiplicity and location // *Journal of Neurosurgery*. — 2012. — Vol. 117. — P. 60–64.
39. Majamaa K., Myllyla V.V. Disorder of collagen biosynthesis in patients with cerebral artery aneurysm // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1993. — Vol. 1225. — P. 48–52.
40. Menghini V.V., Brown Jr R.D., Sicks J.D. et al. Incidence and prevalence of intracranial aneurysms and hemorrhage in Olmsted County, Minnesota, 1965 to 1995 // *Neurology*. — 1998. — Vol. 51. — P. 405–411.
41. Milewicz D.M., Byers P.H., Reveille J. et al. A dimorphic Alu Sb-like insertion in COL3A1 is ethnic-specific // *J. Mol. Evol.* — 1996. — Vol. 42(2). — P. 117–123.
42. Neil-Dwyer G., Bartlett J.R., Nicholls A.C. et al. Collagen deficiency and ruptured cerebral aneurysms: a clinical and biochemical study // *J. Neurosurg.* — 1983. — Vol. 59. — P. 16–20.
43. Neumann H.P., Bacher J., Nabulsi Z. et al. Adult patients with sporadic polycystic kidney disease: The importance of screening for mutations in the PKD1 and PKD2 genes // *Int. Urol. Nephrol.* — 2012. — Vol. 44. — P. 1753–1762.
44. Onda H., Kasuya H., Yoneyama T. et al. Genomewide-linkage and haplotype- association studies map intracranial aneurysm to chromosome 7q11 // *American Journal of Human Genetics*. — 2001. — Vol. 69. — P. 804–819.
45. Ostergaard J.R., Oxlund H. Collagen type III deficiency in patients with rupture of intracranial saccular aneurysms // *J. Neurosurg.* — 1987. — Vol. 67. — P. 690–696.
46. Peng G., Luo L., Siu H. et al. Gene and pathway-based second-wave analysis of genome-wide association studies // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2010. — Vol. 18(1). — P. 111–117.
47. Pepin M., Schwarze U., Superti-Furga A. et al. Clinical and genetic features of Ehlers–Danlos syndrome type IV, the vascular type // *N. Engl. J. Med.* — 2000. — Vol. 342. — P. 673–680.
48. Peters D.G., Kassam A.B., Feingold E. et al. Molecular anatomy of an intracranial aneurysm: coordinated expression of genes involved in wound healing and tissue remodeling // *Stroke*. — 2001. — Vol. 32(4). — P. 1036–1042.
49. Pfohman M., Criddle L.M. Epidemiology of intracranial aneurysm and subarachnoid hemorrhage // *J. Neurosci. Nurs.* — 2001. — Vol. 33. — P. 39–41.
50. Pope F.M., Nichols A.C., Narcisi P. et al. Some patients with cerebral aneurysms are deficient in type III collagen // *Lancet*. — 1981. — Vol. 1. — P. 973–975.
51. Prockop D.J., Kivirikko K.I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy // *Annu Rev. Biochem.* — 1995. — Vol. 64. — P. 403–434.
52. Qureshi A.I., Suri M.F., Nasar A. et al. Trends in hospitalization and mortality for subarachnoid hemorrhage and unruptured aneurysms in the United States // *Neurosurgery*. — 2005. — Vol. 57(1). — P. 1–8.
53. Raver-Shapira N., Marciano E., Meiri E. et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated Apoptosis // *Molecular Cell*. — 2007. — Vol. 26(5). — P. 731–743.
54. Ronkainen A., Hernesniemi J., Tromp G. Special features of familial intracranial aneurysms: report of 215 familial aneurysms // *Neurosurgery*. — 1995. — Vol. 37(1). — P. 43–46.
55. Rooij N.K., Linn F.H., van der Plas J.A. et al. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends // *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry*. — 2007. — Vol. 78. — P. 1365–1372.
56. Ruigrok Y.M., Tan S, Medic J. et al. Genes involved intracranial aneurysms // *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. — 2008. — Vol. 79. — P. 722–724.
57. Ruigrok Y.M., Rinkel G.J. From GWAS to the clinic: risk factors for intracranial aneurysms // *Genome Med.* — 2010. — Vol. 2. — P. 61.
58. Sablotzki A., Ebel H., Muhling J. et al. Dysregulation of immune response following neurosurgical operations // *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. — 2000. — Vol. 44. — P. 82–87.
59. Sager R. Tumor suppressor genes: the puzzle and promise // *Science*. — 1989. — Vol. 246(4936). — P. 1406–1412.
60. Schievink W.I. Marfan syndrome and intracranial aneurysms // *Stroke*. — 1999. — Vol. 30. — P. 2767–2768.
61. Shievink W.I. Genetics of intracranial aneurysms // *Neurosurgery*. — 1997. — Vol. 40. — P. 651–663.
62. Sharma M.S., Jha A.N. Ruptured intracranial aneurysm associated with von Hippel–Lindau syndrome: A molecular link // *J. Neurosurg.* — 2006. — Vol. 104. — P. 90–93.
63. Takemura Y., Hirata Y., Sakata N. et al. Histopathologic characteristics of a saccular aneurysm arising in the non-branching segment of the distal middle cerebral artery // *Pathol. Res. Pract.* — 2010. — Vol. 206(6). — P. 391–396.
64. Ujii H., Sato K, Onda H. et al. Clinical analysis of incidentally discovered unruptured aneurysms // *Stroke*. — 1993. — Vol. 24. — P. 1850–1860.
65. Vaicys C., Hunt C.D., Heary R.F. Ruptured intracranial aneurysm in an adolescent with Alport’s syndrome — A new expression of type IV collagenopathy: Case report // *Surg. Neurol.* — 2000. — Vol. 54. — P. 68–72.
66. Van den Berg, Limburg M., Pals G. et al. Some patients with intracranial aneurysms have a reduced ratio of type III type I collagen: a case-control study // *Neurology*. — 1997. — Vol. 49. — P. 1546–1551.
67. Van Gijn J. Cerebral vasoconstriction, headache and sometimes stroke: one syndrome or many // *Brain*. — 2007. — Vol. 130. — P. 3060–3062.
68. Wang K, Zhang S., Marzolf B. et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2009. — Vol. 106. — P. 4402–4407.
69. Weinsheimer S., Ronkainen A., Khusnutdinova E.K. et al. Association of kallikrein gene polymorphisms with intracranial aneurysms // *Stroke*. — 2007. — Vol. 38(10). — P. 2670–2676.
70. Wiebers D.O., Whisnant J.P., Sundt Jr T.M. et al. The significance of unruptured intracranial saccular aneurysms // *Journal of Neurosurgery*. — 1987. — Vol. 66(1). — P. 23–29.
71. Xin M., Small E.M., Sutherland L.B. et al. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury // *Genes Dev.* — 2009. — Vol. 23. — P. 2166–2178.
72. Yugang Jiang, Mingming Zhang, Hua He et al. MicroRNA/mRNA profiling and regulatory network of intracranial aneurysm // *BMC Medical Genomics*. — 2013. — Vol. 6. — P. 36.
73. Yasuno K., Bilguvar K., Bijlenga P. et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci // *Nat. Genet.* — 2010. — Vol. 2. — P. 420–425.
74. Zhang B., Fugleholm K., Day L.B. et al. Molecular pathogenesis of subarachnoid haemorrhage // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* — 2003. — Vol. 35. — P. 1341–1360.

Clinical and genetic aspects of intracranial aneurysm

Sultanova R.I., Khusainova R.I., Nadirshina D.D., Nurgalieva A.X., Khusnutdinova E.K.

Bashkir State University,
Ufa, Zaki Validi, 32,
e-mail: r-ka_@mail.ru

Aneurysms of brain vessels (МКБ-10 172) are a complex disease of the multiple-factor nature, bringing to spontaneous subarachnoidal hemorrhages. Every year more than 30 thousand people suffer from a rupture of intracranial aneurysms that leads to especially heavy forms of a stroke. Among these people: 50% die of this illness, 25% become disabled people in connection with the loss of speech, sight and coordination of movements. At the remained 25% the risk of repeated strokes is increased. There are obvious proofs that predisposition to aneurysms has a considerable genetic component. The analysis of modern trends of studying the molecular-genetic bases of the risk the development of aneurysms is carried out in this review.

Key words: intracranial aneurysm, candidate genes, mutation, polymorphism of DNA

Нарушение целостности ДНК сперматозоидов человека: причины, методы исследования, влияние на исход программ вспомогательных репродуктивных технологий

Шильникова Е.М.¹, Мазилина М.А.², Федорова И.Д.¹

¹ — ФГБУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН, 199034, Менделеевская линия д.3, Санкт-Петербург, тел., факс +7(812)3289822, e-mail: www.ott.ru

² — ФГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Менделеевская линия д.7/9, тел., факс +7(812)3281590, e-mail: www.spbu.ru

Описаны причины нарушения целостности ДНК сперматозоидов человека, охарактеризованы основные методы исследования фрагментации ДНК сперматозоидов, представлены данные литературы о влиянии фрагментации ДНК сперматозоидов на исход программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Ключевые слова: фрагментация ДНК сперматозоида, окислительный стресс, апоптоз, вспомогательные репродуктивные технологии

Введение

По данным Всемирной Организации Здравоохранения, у 15% супружеских пар детородного возраста выявлено бесплодие. Бесплодным считается брак, в котором отсутствует беременность в течение года регулярной половой жизни без применения контрацепции [9]. Термин *бесплодие* относится к паре, при этом вклад мужского фактора в этиологию бесплодия достигает 50%, однако в половине случаев причины мужского бесплодия неизвестны [48].

В 15—30% случаев мужское бесплодие обусловлено генетическими нарушениями [49]. Значительный вклад в этиологию мужского бесплодия вносят эпигенетические нарушения, например aberrантное метилирование генома сперматозоида. Причиной снижения мужского репродуктивного потенциала могут быть и структурные нарушения генома сперматозоида, например нарушение целостности ДНК.

Основные параметры спермограммы (концентрация, доля подвижных и морфологически нормальных форм сперматозоидов) являются важными для оценки сперматогенеза, однако их количественное выражение не является строгим диагностическим критерием бесплодия, снижение качества эякулята по всем показателям можно наблюдать и у фертильных мужчин [27]. Таким образом, в основе мужского бесплодия не всегда лежат нарушения, которые будут отражаться в изменении показателей параметров спермиологического анализа.

Современными методами исследования показано, что в 20% случаев идиопатического бесплодия причиной отсутствия беременности является нарушение целостности ДНК сперматозоидов [40]. Оценка целостности

ДНК сперматозоидов имеет прогностическое значение и наряду с параметрами стандартного спермиологического анализа (концентрация, подвижность и доля морфологически нормальных форм сперматозоидов в эякуляте) диагностически значима [39].

1. Причины фрагментации ДНК сперматозоида

Фрагментацию ДНК определяют по наличию/отсутствию однонитевых и двунитевых разрывов. Основными причинами фрагментации ДНК сперматозоида считают нарушение компактизации хроматина в процессе спермиогенеза, окислительный стресс и апоптоз.

1.1. Нарушение компактизации хроматина сперматозоида в спермиогенезе

Результатом сперматогенеза является формирование высокоспециализированной половой клетки — сперматозоида. На заключительном этапе сперматогенеза — спермиогенезе — происходит созревание сперматид: формируются основные морфологические структуры сперматозоида, удаляется цитоплазма. Определённые изменения происходят и с хроматином созревающей гаметы, в результате чего объём ядра сперматозоида уменьшается в 6 раз по сравнению с объёмом ядра соматической клетки [6]. Конденсация хроматина происходит вследствие синтеза специфических белков ядерного матрикса и замены гистоновых белков на протамины. В сперматозоидах человека не все гистоновые белки замещаются на протамины. До 10—15% остаточных гистонов в ядре сперматозоида расположены не случайным образом: в генах, которые должны быть доступны для

транскрипции сразу после оплодотворения, например в промоторах генов, кодирующих некоторые сигнальные белки, участвующие в раннем эмбриональном развитии, генах транскрипционных факторов (ТФ), а также в импринтированных генах, кластерах микроРНК [7].

Протамины — основные белки, молекулярная масса которых вдвое меньше молекулярной массы гистоновых белков (5—8 kDa). До 79% аминокислотных остатков в молекуле протамины представлены аргинином. Являясь основной аминокислотой, аргинин образует ионные связи с фосфатными группами ДНК, что способствует более сильному связыванию и, следовательно, более плотной упаковке ДНК в структуру, называемую *тороидом*. Помимо аргинина значительное количество аминокислотных остатков в молекуле протамины представлено цистеином. Цистеин играет важную роль в образовании дисульфидных связей в процессе созревания сперматозоида в придатке яичка [6]. Выделяют два типа протаминов: протамин Р1 и семейство протаминовых белков Р2, включающее белки Р2, Р3 и Р4 [32]. Изначально гистоновые белки заменяются на обогащённые аргинином и лизином транзитные белки ТР1 и ТР2, которые впоследствии замещаются на протамины [30]. Считают, что транзитные белки контролируют изменения в структуре хроматина при его конденсации. Так, ТР1 дестабилизирует ДНК сперматозоида, а ТР2 играет роль в инициации конденсации хроматина и прекращении транскрипционной активности в спермиогенезе [17]. Многие белки участвуют как в процессе компактизации, так и в процессе репарации разрывов ДНК: транзитные белки, белки семейства PARP. Универсальным маркером двунитевых разрывов ДНК является особая посттрансляционная модификация гистона γ H2AFX, служащая для привлечения белков репарации к месту разрыва [37].

Замещение гистоновых белков на протамины сопровождается разрезанием и последующим восстановлением структуры ДНК. Топоизомераза II является эндогенной нуклеазой, которая вносит разрывы в ДНК, необходимые для снятия торсионного напряжения, а также обеспечивает последующее лигирование ДНК с образованием интермедиата фермент — 5'-конец нуклеиновой кислоты [28]. Отсутствие лигазной активности может быть вызвано рядом причин, например появлением изоформ фермента, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга или протеолитической активности, и наличием специфического контекста хроматина. Кроме того, белок TDP1 (tyrosyl phosphodiesterase protein 1) способен расщепить образующийся в ходе работы топоизомеразы интермедиат [24].

Поскольку сперматиды являются гаплоидными клетками, то репарация разрывов ДНК по типу гомологичной рекомбинации из-за отсутствия сестринской хроматиды невозможна. Вероятно, репарация повреждений ДНК происходит иными путями, например с помощью негомологичного воссоединения концов

(NHEJ), однако точные пути репарации ДНК в сперматиде до сих пор остаются неизученными [50].

В норме в придатке яичка в ходе созревания сперматозоида целостность ДНК полностью восстанавливается. Наличие разрывов в ДНК сперматозоида после созревания в придатке яичка свидетельствует о том, что произошло нарушение упаковки ДНК и процесс созревания гамет не завершился должным образом [14].

Нарушение процесса замены гистонов на протамины, а также изменение соотношения протаминов разных типов приводит к снижению фертильности [11]. Нерепарированные разрывы ДНК нарушают структуру хроматина половой клетки, делая её более чувствительной к действию повреждающих агентов. Так, например, показано, что употребление алкоголя и курение приводит к увеличению доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК [50].

1.2. Окислительный стресс

Окислительный стресс представляет собой процесс повреждения клетки в результате окисления, при этом активные формы кислорода (АФК) являются основными компонентами, участвующими в нарушении окислительно-восстановительного статуса клетки. АФК — метаболиты, возникающие в результате восстановления молекулярного кислорода. К АФК относят супероксид $O_2^{\cdot -}$, пероксид водорода H_2O_2 , пероксильные радикалы ROO^{\cdot} , гидропероксид $ROOH$, пероксинитриты $ONOO^{\cdot}$, оксид азота (II). АФК могут взаимодействовать между собой, например при взаимодействии $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 в присутствии металлов, железа или меди, которые могут менять свою валентность, происходит образование $O_2^{\cdot -}$. АФК способны эффективно окислять белки, липиды и нуклеиновые кислоты. Присутствие АФК необходимо для таких процессов, как пролиферация и дифференцировка клеток, однако увеличение концентрации АФК вызывает окислительный стресс, который, как полагают, является основной причиной нарушения мужской репродуктивной функции.

Мишенью АФК являются полиненасыщенные жирные кислоты плазматической мембраны (ПМ) сперматозоида. Двойные связи полиненасыщенных жирных кислот легко вступают во взаимодействие с АФК, запуская тем самым каскад перекисного окисления липидов, что приводит к нарушению целостности ПМ сперматозоида и, как следствие, нарушению подвижности сперматозоида, акросомной реакции и слиянию с ПМ ооцита [19].

Другой мишенью АФК является ДНК сперматозоида. Так же, как и в случае перекисного окисления липидов в присутствии металлов с переменной валентностью, образуется гидроксильный радикал, который реагирует с сахарами, пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, образуя метаболиты. Так, модифицированное основание 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин (8-OH-dG) является одним из метаболитов, образующимся в результате присоединения гидроксильного ра-

дикала к атому углерода в восьмом положении молекулы гуанина. Появление модифицированных в результате окисления оснований ДНК приводит к дестабилизации гликозидной связи между основанием и остатком сахара и формированию апуринового или апириминового сайтов. Апуриновые или апириминовые сайты, в свою очередь, дестабилизируют структуру ДНК, приводя к появлению разрывов [50].

Антиоксиданты представляют собой ингибиторы окисления. К естественным антиоксидантам относят α -токоферол, витамин, способный эффективно связывать пероксильный и алкоксильный радикалы, образующиеся в результате перекисного окисления липидов ПМ [44]. К антиоксидантам относятся такие компоненты семенной плазмы, как витамин С, триптофан, таурин, мочевая кислота [38].

Компонентами антиоксидантной защиты сперматозоида являются также цитоплазматическая и митохондриальная формы супероксиддисмутазы (SOD) и глутатионпероксидазы (GPX), а также редуктазы. Фермент SOD обеспечивает реакцию дисмутации, в ходе которой образуется пероксид водорода, метаболизируемый GPX. Внеклеточные формы SOD и GPX входят в состав секрета придатка яичка и семенной плазмы [50].

Поскольку сперматозоид — высокоспециализированная клетка с минимальным количеством цитоплазмы, внеклеточная антиоксидантная защита является основной, особенно в период созревания сперматозоида в придатке яичка. Снижение уровня антиоксидантной защиты секрета половых желез может быть причиной появления разрывов ДНК сперматозоидов вследствие окислительного стресса. С другой стороны, снижение антиоксидантного потенциала семенной плазмы может быть не результатом, а следствием окислительного стресса. Иными словами, АФК, генерируемые сперматозоидами в результате таких причин, как, например, нарушение работы электрон-транспортной цепи митохондрий или NADPH-оксидазного комплекса, локализованного на ПМ, снижают уровень антиоксидантов в семенной плазме [50].

Источником АФК могут служить лейкоциты, представленные в эякуляте в основном макрофагами и нейтрофилами [19]. Субклиническая концентрация лейкоцитов не влияет на целостность ДНК сперматозоидов, однако при таких патологических состояниях, как лейкоцитоспермия, снижается уровень внеклеточной антиоксидантной защиты и АФК могут атаковать ДНК сперматозоидов [8].

1.3. Апоптоз

Апоптоз представляет собой результат реализации генетически запрограммированной клеточной гибели.

В процессе апоптоза с клеткой происходит ряд морфологических и биохимических изменений, как-то: уменьшение объема, набухание цитоплазматической мембраны, конденсация и преимущественно перифе-

рическая локализация хроматина, так называемая маргинация, а также формирование апоптотических телец. В отличие от апоптоза некроз представляет собой неэнергозатратный процесс, при котором происходит разбухание клетки и клеточных органелл, сопровождающееся разрывом плазматической мембраны и лизисом клетки. Воспалительный процесс при апоптозе не развивается, поскольку происходит быстрый фагоцитоз клеток. Характерной чертой апоптоза является экстернализация фосфатидилсерина с внутреннего на внешний листок ПМ клетки, результатом чего является повышенная проницаемость мембраны. Изменяется и трансмембранный потенциал митохондрий. В результате изменения проницаемости мембран митохондрий открываются ионные каналы, в цитоплазму клетки выходят такие факторы индукции апоптоза, как АИФ (apoptosis-inducing factor). Изменение мембранного потенциала митохондрий приводит к появлению АФК в клетке [50].

С внешней мембраны митохондрий в цитоплазму клетки мигрирует белок цитохром *c* (Araf-2). Взаимодействие цитохрома *c* и цитоплазматических белков Araf-1 и Araf-3 (apoptotic protease activation factor) запускает активацию каспаз клетки, что в конечном итоге и приводит клетку к гибели. Активированный цитохромом *c* белок Araf-1 связывается с прокаспазой 9, в результате чего активируется инициаторная каспаза 9, запускающая дальнейший каскад каспаз 3, 6 и 7. В таком механизме запуска апоптоза участвуют также полимераза PARP и члены семейства Bcl-2. Данный путь запуска апоптоза является основным. Существуют и другие пути. Например, Fas-опосредованный путь запуска апоптоза, при котором происходит связывание лиганда FasL с рецептором Fas, в результате чего активируются каспазы 8 или 10. Кроме того, для всех путей запуска апоптоза характерна взаимосвязь. Так, при Fas-опосредованном запуске апоптоза каспаза 8 расщепляет проапоптотический белок семейства Bcl-2 Bid, в результате чего цитохром *c* выходит в цитоплазму клетки [43].

Процесс сперматогенеза человека характеризуется строгой временной и пространственной упорядоченностью. Основные этапы сперматогенеза протекают в семенных канальцах яичек, откуда потом незрелые сперматозоиды выходят в просвет канальцев и в составе секрета мигрируют в придаток яичка, где и происходит их полное созревание. В норме обычно в 75% мужских половых клеток на стадии сперматогониев запускается процесс апоптоза [31].

В апоптоз могут вступать как сперматогонии, так и сперматоциты и сперматиды, однако чаще апоптозу подвержены половые клетки на стадии сперматогоний и круглых сперматид. Зрелые сперматозоиды также могут иметь признаки, характерные для клетки, вступившей в апоптоз [50].

Погибшие в результате апоптоза клетки или фагоцитируются клетками Сертоли, или выходят в просвет семен-

ных канальцев. При нарушении сперматогенеза число половых клеток, вступающих в апоптоз, увеличивается [18].

В ходе сперматогенеза с помощью апоптоза контролируется сверхпродукция половых клеток и поддерживается оптимальное соотношение развивающихся половых клеток к клеткам Сертоли, элиминируются аномальные половые клетки. Супрессия гена индуктора апоптоза *Bax* приводит к нарушению формирования плотных контактов между клетками Сертоли и, как следствие, нарушению гематотестикулярного барьера [50]. Апоптоз также участвует в удалении цитоплазмы созревающей сперматиды. Так, в резидуальном тельце обнаружены каспазы и другие белки, участвующие в регуляции апоптоза. Цитоплазматическая капля фагоцитируется клетками Сертоли. Таким образом, механизм апоптоза обеспечивает удаление лишней цитоплазмы без гибели клеток.

Семенники являются иммунопривилегированным органом, т.е. имеют особый иммунный статус, при котором появление некоторого антигена не приводит к воспалительному иммунному ответу. В поддержании иммунной привилегии участвуют клетки Сертоли, экспрессирующие Fas-лиганд (*FasL*), который, в свою очередь, связываясь с рецептором *Fas*, расположенным на мембране активированных Т-клеток, запускает в последних апоптоз. При нарушении нормальной работы клеток Сертоли уровень экспрессии *FasL* может повышаться. Связывание лиганда с рецептором плазматической мембраны сперматозоидов запускает апоптоз половой клетки [26].

В регуляции апоптоза принимают участие члены белкового семейства *Bcl-2*: проапоптотические, например *Bax*, *Bak*, *Bcl-xs*, *Bad*, и антиапоптотические, например *Bcl-2*, *Bcl-xL*. Соотношение про- и антиапоптотических белков определяет судьбу клетки. Так, при сверхэкспрессии генов белков *Bax* и *Bak* наблюдаются инактивация белка *Bcl-2* и вступление клетки в апоптоз [25]. Каспазы или сериновые протеазы клетки обеспечивают расщепление внутриклеточных белков. Инактивация каспаз приводит к подавлению апоптоза [36]. В регуляции апоптоза половых клеток человека участвуют и другие белки, так, например, транскрипционный фактор *c-myc*, ген которого является протоонкогеном; протоонкоген *c-kit*. Запуск апоптоза при повреждении ДНК клетки обеспечивается деградацией белка *PARP* [50].

К запуску апоптоза в половых клетках может привести ряд факторов, таких, как нарушение баланса гормонов, факторов роста, цитокинов и регуляторных факторов, а также некоторые внешние воздействия, например радиация, травмы, инфекции [50].

Доля сперматоцитов и сперматид с фрагментированной ДНК у пациентов с нарушениями сперматогенеза выше, чем среди пациентов с нормальным сперматогенезом. При нарушении сперматогенеза и блокировании данного процесса на стадии круглых сперматид доля сперматоцитов I порядка и сперматид с фрагментированной в результате апоптоза ДНК выше, чем у пациен-

тов, для которых характерен блок сперматогенеза на стадии удлинённых сперматид. Поскольку перераспределение фосфатидилсерина между листками ПМ происходит на более поздних этапах созревания половой клетки, то фагоцитоза сперматид не происходит [50]. Также показано, что снижение концентрации сперматозоидов в эякуляте связано не со снижением пролиферативной активности сперматогенного эпителия, а с активацией апоптотических процессов и деградацией сперматогенных клеток до завершающих этапов сперматогенеза [1].

Хотя окислительный стресс считают основным источником повреждений ДНК, несомненно, что все вышперечисленные события, приводящие к фрагментации ДНК сперматозоида, взаимосвязаны. Так, в 2009 г. была предложена гипотеза, объясняющая причины повреждения ДНК сперматозоида [5]. На первом этапе под действием факторов, вызывающих окислительный стресс, нарушается репарация разрывов ДНК, внесённых топоизомеразой для снятия торсионного напряжения, нарушается упаковка хроматина, запускается апоптоз. На втором этапе ДНК, которая вследствие нарушений в ходе спермиогенеза становится более доступной для АФК, подвергается действию АФК, которые вызывают её повреждение.

2. Методы детекции фрагментации ДНК сперматозоида

Основные параметры спермиологического анализа — исследование концентрации, подвижности и доли морфологически нормальных форм сперматозоидов в эякуляте, несомненно, имеют важное прогностическое и диагностическое значение. Однако по результатам спермограммы нельзя судить о структурно-функциональном состоянии генома сперматозоида. Действительно, методами детекции фрагментации ДНК сперматозоидов было показано, что в 20% случаев идиопатического бесплодия причиной снижения фертильности служило нарушение целостности ДНК сперматозоидов [40].

Методы оценки фрагментации ДНК сперматозоида делят на прямые и непрямые. Прямые методы позволяют выявить уже имеющиеся повреждения ДНК, в то время как непрямые позволяют оценить восприимчивость ДНК к повреждению при действии повреждающих агентов. Наиболее широко используются прямые (методы TUNEL и ДНК-комет) и непрямые (окрашивание акридиновым оранжевым и исследование структуры хроматина сперматозоидов) методы исследования.

2.1. Метод TUNEL

(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick-end labelling assay)

Метод TUNEL основан на флуоресцентном мечении одно- и дунитевых разрывов ДНК сперматозоида с помощью фермента терминальной нуклеотидтрансферазы (TdT), которая присоединяет к свободному 3'-концу по-

вреждённой ДНК меченный флуорохромом дезоксиуридинтрифосфат (dUTP) с последующей детекцией флуоресцентного сигнала с использованием цитофлуориметра или флуоресцентного микроскопа.

К настоящему времени для данного метода нет чётко установленных пороговых значений доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК. Многие лаборатории, основываясь на данных своих исследований, устанавливают внутренние пороговые значения. Такие факторы, как использование разных протоколов исследования, подготовка образцов спермы к анализу, количество проанализированных клеток и другие, могут повлиять на результат исследования. Тем не менее, метод TUNEL широко применяют в лабораторной практике и он имеет важное прогностическое значение для оценки доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК. Так, по данным нескольких исследований, пороговое значение доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК для метода TUNEL составляет порядка 20—30% [41].

2.2. Метод ДНК-комет

Метод ДНК-комет (Comet Assay) основан на электрофоретическом разделении высокомолекулярных и низкомолекулярных фрагментов ДНК единичного сперматозоида. В электрическом поле релаксированные петли и фрагменты ДНК вытягиваются по направлению к аноду, что придаёт наблюдаемым объектам вид «комет». Интактная ДНК с более высоким молекулярным весом концентрируется в «голове» так называемой «кометы», в то время как низкомолекулярная фрагментированная ДНК составляет «хвост кометы». После разделения ДНК электрофорезом треки визуализируют путём окрашивания флуоресцентным красителем. По длине и степени свечения «хвоста» на электрофореграмме судят о степени повреждения ДНК анализируемого сперматозоида.

Под действием щелочи при наличии разрывов в ДНК нарушается структурная организация хроматина, утрачивается сверхспирализация ДНК, что приводит к релаксации этой макромолекулы, формируются фрагменты ДНК, не связанные с клеткой [12]. В нейтральных условиях (рН 8—9) можно детектировать двунитевые разрывы ДНК [29].

Метод ДНК-комет широко используют в лабораторной практике, несмотря на отсутствие стандартного протокола исследования. Тем не менее, в ряде работ подтверждена клиническая значимость данного теста. Так, показано, что такие параметры, как частота оплодотворения и качество эмбрионов при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО), коррелируют с показателями данного теста [42].

В настоящее время для метода ДНК-комет нет чётко установленных пороговых значений [4]. Считают, что анализ 50 сперматозоидов является информативным и

позволяет судить о доле сперматозоидов с повреждённой ДНК во всем эякуляте [23].

2.3. Оценка целостности ДНК сперматозоида путём окрашивания красителем акридиновым оранжевым

Акридиновый оранжевый (АО) является флуорохромным красителем, используемым для окрашивания нуклеиновых кислот. Мономеры АО интеркалируют между параллельными основаниями двуцепочечной ДНК, при этом краситель флуоресцирует в зелёном свете (525 нм). Если полимеры АО связываются с однонитевой ДНК, краситель флуоресцирует в красном или оранжевом свете (630 нм). Метахроматические свойства данного красителя используют для оценки целостности ДНК сперматозоидов.

Первоначально краситель АО использовали для окрашивания нуклеиновых кислот соматических клеток. Для окрашивания ДНК половых клеток АО был впервые применён в 1980 г. [15]. Сообщали о дифференциальном окрашивании сперматозоидов из эякулята, при этом было показано, что при нарушении репродуктивной функции доля сперматозоидов, флуоресцирующих в красном спектре, повышена.

Краситель АО также применяют для исследования степени зрелости хроматина. В процессе транспорта созревающего сперматозоида по придатку яичка тиоловые группы, входящие в состав протаминов, окисляются, образуя дисульфидные связи, что обеспечивает дополнительную компактизацию и стабилизацию ДНК. Сперматозоиды с наименьшим количеством дисульфидных связей между белками протаминами более чувствительны к действию денатурирующих агентов, например кислоты или высокой температуры. Последующее окрашивание АО позволяет выявлять долю незрелых сперматозоидов в эякуляте.

Оценка целостности ДНК и степени зрелости хроматина сперматозоида с помощью красителя АО имеет ряд ограничений, связанных с методикой окрашивания: приготовлением препаратов, временем экспонирования подготовленных препаратов в красителе, детекцией спектра флуоресценции. Тем не менее, окрашивание АО применяют как дополнительный метод исследования качества спермы в лабораториях ЭКО. Результаты данного теста коррелируют с такими показателями стандартного спермиологического анализа, как концентрация, подвижность, прогрессивная подвижность, доля морфологически нормальных форм сперматозоидов. Показано, что доля сперматозоидов, флуоресцирующих в красном спектре, у пациентов выше, чем у доноров спермы. В ряде исследований показана корреляция результатов данного метода с частотой оплодотворения и наступления беременности [50]. Для теста с применением АО нет чётко установленных пороговых значений. По данным некоторых исследователей, доля сперматозоидов, флуоресцирующих в красном спектре, не должна превышать 50% [20].

2.4. Метод исследования структуры хроматина сперматозоидов (SCSA)

Метод SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) является единственным методом оценки уровня фрагментации ДНК сперматозоида, который широко применяют в клинической практике. Кратковременное воздействие низкого pH на опытный образец спермы приводит к частичной денатурации ДНК в местах разрывов, делая её доступной для связывания с красителем АО. Флуоресцентный сигнал детектируют посредством цитофлуориметра, что обеспечивает высокую точность и объективность измерений. Так, показано, что разница значений для одного и того же образца, по данным метода SCSA, не превышает 1%.

Важными показателями данного метода являются индекс фрагментации — DFI (DNA fragmentation index, %), отражающий общий уровень фрагментации ДНК сперматозоидов, и HDS (high DNA staining sperm, %), отражающий долю сперматозоидов с нехарактерной структурой хроматина, содержащей аномальное количество незамещённых гистонов.

Показатели теста SCSA имеют важное клиническое значение. Так, при индексе фрагментации выше 30% частота наступления клинической беременности после проведения ЭКО снижена, а частота наступления спонтанной беременности приближается к нулю [16]. При индексе фрагментации ДНК более 30% рекомендовано проведение внутриплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ICSI — IntraCytoplasmic Sperm Injection), при этом, если индекс фрагментации ДНК выше 50%, рекомендовано проведение ICSI с использованием тестикулярных сперматозоидов [21]. Показано, что такие показатели, как частота оплодотворения, дробления и качество эмбрионов в циклах ICSI с использованием эякулированных или тестикулярных сперматозоидов, достоверно не различаются [21].

Описанные методы детекции фрагментации ДНК сперматозоидов наиболее часто используют в современной лабораторной практике. Значения доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК, полученные в результате использования разных методов, представляют собой величины, которые нельзя сравнивать напрямую, предполагая лишь некоторую корреляцию между собой. Основное внимание исследователей сосредоточено на установлении пороговых значений доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК, при превышении которых такие показатели, как частота оплодотворения, а также частота наступления биохимической и клинической беременностей, будут снижаться.

3. Влияние фрагментации ДНК сперматозоида на исход программ ЭКО

Разработка и внедрение ВРТ в практику здравоохранения в течение последних 30 лет позволили не только диагностировать бесплодие, но и кардинально повысить

эффективность его лечения, исследовать механизмы нарушения репродуктивной функции. ВРТ представляют собой комплекс мероприятий, проводимых с целью наступления беременности и рождения здорового ребёнка при невозможности забеременеть и выносить плод естественным путём. Развитие методов ВРТ позволяет преодолевать проблему бесплодия. Тем не менее, только 30% попыток ЭКО заканчиваются наступлением беременности и рождением ребёнка [50].

При применении ВРТ выбор метода оплодотворения зависит от показателей параметров спермиологического анализа. Несомненно, что три основных параметра спермограммы (концентрация, доля подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов) являются важными для оценки сперматогенеза, однако их количественное выражение не является строгим диагностическим критерием бесплодия и пациенты с аномальными параметрами спермограммы могут иметь детей без использования ВРТ [27]. Таким образом, в основе мужского бесплодия не всегда лежат нарушения, определяемые изменением значений параметров спермограммы.

Одним из наиболее простых методов ВРТ является внутриматочная инсеминация, которая представляет собой процедуру введения предварительно обработанного эякулята в полость матки в близкое к овуляции время. Частота наступления беременности после проведения внутриматочной инсеминации составляет 10—20% [10]. Так, было показано, что при увеличении доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК в эякуляте частота наступления клинической беременности после внутриматочной инсеминации снижается [10, 13].

Классическая методика ЭКО, или оплодотворение *in vitro*, предполагает осуществление оплодотворения вне женского организма. При определённых формах мужского бесплодия, связанных со снижением концентрации, подвижности и некоторыми формами тератозоспермии, используют метод ICSI, предложенный в 1992 г. профессором Van Steirteghem [33]. Данным методом ядро сперматозоида доставляется непосредственно в цитоплазму ооцита, минуя естественные биологические барьеры, что может привести к оплодотворению яйцеклетки сперматозоидом, имеющим генетические и эпигенетические аномалии.

В литературе не существует единого мнения о влиянии увеличения доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК в эякуляте на частоту наступления беременности после процедур ЭКО или ЭКО с ICSI. Показано, что при низком содержании сперматозоидов с фрагментированной ДНК в эякуляте частота беременности после процедуры ЭКО не отличается от частоты наступления беременности после ЭКО с ICSI. Однако при увеличении доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК в эякуляте частота биохимической и клинической беременностей при проведении ЭКО значительно ниже, чем при ЭКО с ICSI [22, 34].

По данным литературы, нарушение целостности ДНК сперматозоидов также снижает эффективность оплодотворения, нарушает частоту делений дробления и формирование бластоцисты [50].

Нарушение целостности ДНК сперматозоида также влияет и на течение беременности, приводя к её остановке. Метаанализ данных показал, что доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК коррелирует с частотой прерывания беременности вне зависимости от метода оплодотворения. Так, при увеличении доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК в эякуляте частота спонтанного прерывания беременности составляет около 37%, при этом, если количество сперматозоидов с повреждённой ДНК в эякуляте соответствует норме, частота спонтанных аборт составляет 10% [50].

Нарушение целостности ДНК сперматозоида может служить причиной появления врождённых пороков и генетических заболеваний плода. При оплодотворении ооцита сперматозоидом с фрагментированной ДНК системы репарации ооцита могут исправить около 8% повреждённой ДНК сперматозоида [3]. Однако репарация ДНК с ошибками может привести к появлению делеций и нарушению правильной последовательности оснований в ДНК. Действительно, показано, что до 80% структурных перестроек хромосом, возникших *de novo*, имеет отцовское происхождение [45, 46]. Кроме того, у детей, в эякуляте отцов которых доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК была повышена, частота раковых заболеваний в раннем возрасте была в 4–5 раз выше популяционной [50].

Следует отметить, что на целостность ДНК сперматозоида могут повлиять и внешние факторы. Доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК в подготовленном для оплодотворения образце может значительно отличаться от соответствующего показателя в нативной сперме. Так, при центрифугировании образца спермы в градиенте плотности силиконовых частиц в большинстве случаев доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК снижается, в то время как при инкубировании предобработанной для оплодотворения спермы при температуре +37°C более 2 ч — повышается [35, 47].

Помимо нативной для оплодотворения может быть использована и криоконсервированная сперма. Замораживание и последующее размораживание эякулята вызывает перекисное окисление липидов мембраны сперматозоидов и повышение концентрации АФК, что приводит к увеличению доли сперматозоидов с повреждённой ДНК. Считают, что добавление антиоксидантов в среду для криоконсервации, а также замораживание осаждённой в градиенте плотности спермы может нивелировать негативный эффект криоконсервации [2].

Значительный прогресс в диагностике причин нарушения репродуктивной функции мужчин позволил охарактеризовать этиологию идиопатического бесплодия, одной из причин которого является фрагментация ДНК сперматозоидов. Изучение механизмов повреждения ДНК сперматозоида позволит не только прояснить ряд

фундаментальных вопросов, связанных с важнейшими этапами созревания мужской половой клетки, но и будет иметь практическую значимость, связанную, прежде всего, с развитием новых методов диагностики и предотвращения повреждений ДНК в гаметях. Дальнейшие исследования будут направлены на развитие методов, позволяющих охарактеризовать тип повреждения ДНК, частоту повреждённой ДНК в клетке, а также методов прижизненной селекции гамет с интактной ДНК.

Список литературы

1. Федорова И.Д. Цитогенетическая характеристика эякулированных клеток сперматогенного ряда человека: Автореф. дисс. на соискание учёной степени к.биол.н.: 03.00.15. — СПб., 2004. — 143 с.
2. Ahmad L., Jalali S., Shami S.A., Akram Z., Batool S., Kalsoom O. Effects of cryopreservation on sperm DNA integrity in normospermic and four categories of infertile males // *Syst. Biol. Reprod. Med.* — 2010. — Vol. 56, №1. — P. 74–83.
3. Ahmadi A., Ng S.C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa // *J. Exp. Zool.* — 1999. — Vol. 284, №6. — P. 696–704.
4. Aitken R.J., De Iulius G.N. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells // *Reprod. Biomed. Online.* — 2007. — Vol. 14, №6. — P. 727–733.
5. Aitken R.J., De Iulius G.N., McLachlan R.I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line // *Int. J. Androl.* — 2009. — Vol. 32. — P. 46–56.
6. Andrabi J. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation // *Assist. Reprod. Genet.* — 2007. — Vol. 24. — P. 561–569.
7. Bench G.S., Friz A.M., Corzett M.H., Morse D.H., Balhorn R. DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects // *Cytometry.* — 1996. — Vol. 23. — P. 263–271.
8. Brackett N.L., Ibrahim E., Grotas J.A., Aballa T.C., Lynne C.M. Higher sperm DNA damage in semen from men with spinal cord injuries compared with controls // *J. Androl.* — 2008. — Vol. 29. — P. 93–101.
9. Bulletin of the World Health Organization. — WHO press. — 2010. — Vol. 88. — Suppl. 12. — P. 877–953.
10. Bungum M., Humaidan P., Axmon A., Spano M., Bungum L., Erenpreiss J. et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome // *Hum. Reprod.* — 2007. — Vol. 22. — P. 174–179.
11. Carrell D.T., Emery B.R., Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? // *Hum. Reprod. Update.* — 2007. — Vol. 13, №3. — P. 313–327. Katsuki Y., Nakada S., Yokoyama T., Imoto I., Inazawa J., Nagasawa M., Mizutani S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18754864> // *Cancer Sci.* — 2008. — Vol. 99, №8. — P. 1539–1545.
12. Collins A.R., Dobson V.L., Dusinska M., Kennedy G., Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? // *Mutat. Res.* — 1997. — Vol. 375, №2. — P. 183–193.
13. Duran E.H., Morshedi M., Taylor S., Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study // *Hum. Reprod.* — 2002. — Vol. 17. — P. 3122–3128.
14. Erenpreiss J., Bars J., Lipatnikova V., Erenpreiss J., Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity // *J. Androl.* — 2001. — Vol. 22. — P. 45–53.
15. Evenson D.P., Darzynkiewicz Z., Melamed M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility // *Science.* — 1980. — Vol. 210. — P. 1131–1133.

16. Evenson D.P., Jost L.K., Marshall D., Zinaman M.J., Clegg E., Purvis K., de Angelis P., Claussen O.P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic // *Hum. Reprod.* — 1999. — Vol. 14. — P. 1039–1049.
17. Fuentes-Mascorro G., Serrano H., Rosado A. Sperm chromatin // *Arch. Androl.* — 2000. — Vol. 45. — P. 215–225.
18. Gandini L., Lombardo F., Paoli D., Caponecchia L., Familiari G., Verlengia C., Dondero F., Lenzi A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa // *Hum. Reprod.* — 2000. — Vol. 15, №4. — P. 830–839.
19. Gharagozloo P., Aitken R.J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy // *Hum. Reprod.* — 2011. — Vol. 26, №7. — P. 1628–1640.
20. Gopalkrishnan K., Hurkadli K., Padwal V., Balaiah D. Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups of infertile men // *Andrologia.* — 1999. — Vol. 31, №5. — P. 277–282.
21. Greco E., Scarselli F., Iacobelli M., Rienzi L., Ubaldi F., Ferrero S., Franco G., Anniballo N., Mendoza C., Tesarik J. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa // *Hum. Reprod.* — 2005. — Vol. 20, №1. — P. 226–230.
22. Host E., Lindenberg S., Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* — 2000. — Vol. 79. — P. 559–563.
23. Hughes C.M., Lewis S.E.M., McKelvey-Martin V.J., Thompson W. Reproducibility of human sperm DNA measurements using the single cell gel electrophoresis assay // *Mutat. Res.* — 1997. — 347. — P. 261–268.
24. Interthal H., Chen H.J., Champoux J.J. Human Tdp1 cleaves a broad spectrum of substrates, including phosphoamide linkages // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280, №43. — P. 36518–36528.
25. Kane D.J., Sarafian T.A., Anton R., Hahn H., Gralla E.B., Valentine J.S., Ord T., Bredesen D.E. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species // *Science.* — 1993. — Vol. 262, №5137. — P. 1274–1277.
26. Lee J., Richburg J.H., Shipp E.B., Meistrich M.L., Boekelheide K. The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially upregulated in Sertoli cell. Versus germ cell injury of the testis // *Endocrinology.* — 1999. — Vol. 140. — P. 852–858.
27. Lewis S.E.M. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? // *Reprod.* — 2007. — Vol. 134. — P. 31–40.
28. McPherson S.M., Longo F.J. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids // *Eur. J. Histochem.* — 1993. — Vol. 37. — P. 109–128.
29. McVicar C.M., McClure N., Williamson K. et al. Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm // *Fertil Steril.* — 2004. — Vol. 81, №1. — P. 767–774.
30. Meistrich M.L., Mohapatra B., Shirley C.R., Zhao M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis // *Chromosoma.* — 2003. — Vol. 111. — P. 483–488.
31. Milligan C.E., Schwartz L.M. Programmed cell death during animal development // *Br. Med. Bull.* — 1997. — Vol. 53, №3. — P. 570–590.
32. Oliva R. Protamines and male infertility // *Hum. Reprod.* — 2006. — Vol. 12. — P. 417–435.
33. Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte // *Lancet.* — 1992. — Vol. 340, №8810. — P. 17–18.
34. Payne J.F., Raburn D.J., Couchman G.M., Price T.M., Jamison M.G., Walmer D.K. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques // *Fertil Steril.* — 2005. — Vol. 84, №2. — P. 356–364.
35. Peer S., Eltes F., Berkovitz A., Yehuda R., Itsykson P., Bartoov B. Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37 degrees C? // *Fertil Steril.* — 2007. — Vol. 88, №6. — P. 1589–1594.
36. Pentikainen V., Erkkila K., Dunkel L. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9950791> // *Am. J. Physiol.* — 1999. — Vol. 276, №2. — P. 310–316.
37. Pilch D.R., Sedelnikova O.A., Redon C., Celeste A., Nussenzweig A., Bonner W.M. Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites // *Biochem. Cell Biol.* — 2003. — Vol. 81, №3. — P. 123–129.
38. Rhemrev J.P., van Overveld F.W., Haenen G.R. et al. Quantification of the Non Enzymatic Fast and Slow TRAP in a post-addition assay in human seminal plasma and the antioxidant contributions of various seminal compounds // *J. Androl.* — 2009. — Vol. 21. — P. 913–920.
39. Sakkas D., Alvarez J.G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis // *Fertil Steril.* — 2010. — Vol. 94, №4. — P. 1027–1036.
40. SCSA Diagnostic Business Briefing. Sperm DNA Fragmentation. The role of the Urologist // *Male Infertility.* — 2005. — 4 p.
41. Sharma R.K., Sabanegh E., Mahfouz R., Gupta S., Thiyagarajan A., Agarwal A. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility // *Urology.* — 2010. — Vol. 76, №6. — P. 1380–1386.
42. Simon L., Brunborg G., Stevenson M., Lutton D., McManus J., Lewis S.E. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome // *Human Reprod.* — 2010. — Vol. 25. — P. 1594–1608.
43. Sinha-Hikim A.P., Lue Y., Diaz-Romero M., Yen P.H., Wang C., Swerdloff R.S. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis // *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* — 2003. — Vol. 85. — P. 175–182.
44. Suleiman S.A., Elamin Ali M., Zaki Z.M.S., et al. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E // *J. Androl.* — 1996. — Vol. 17. — P. 530–537.
45. Thomas N.S., Durkie M., Van Zyl B., Sanford R., Potts G., Youngs S., Dennis N., Jacobs P. Parental and chromosomal origin of unbalanced de novo structural chromosome abnormalities in man // *Hum. Genet.* — 2006. — Vol. 119, №4. — P. 444–450.
46. Tomar D., Magenis E., Chamberlin J., Allen L., Olson S., Dowlon T., Barton S., Sheehy R., Waggoner D. Preferential Paternal origin Of de novo Structural chromosome rearrangements // *Am. J. hum. Genet.* — 1984. — Vol. 34. — P. 115.
47. Tomlinson M.J., Moffatt O., Manicardi G.C., Bizzaro D., Afnan M., Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception // *Hum. Reprod.* — 2001. — Vol. 16, №10. — P. 2160–2165.
48. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition. — WHO press. — 2010. — 271 p.
49. Yoshida A., Miura K., Shirai M. Cytogenetic survey of 1,007 males // *Urol. Int.* — 1997. — Vol. 58. — P. 166–176.
50. Zini A., Agarwal A. (Eds.) *Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction.* — Springer, 2011. — 512 p.

**Human sperm DNA fragmentation:
origins, methods and impact on reproductive outcome**

Shilnikova E.M.¹, Mazilina M.A.², Fedorova I.D.¹

¹ — Ott's Institution of Obstetrics and gynecology,
199034, Mendeleevskaya line, d.3, Saint-Petersburg,
p.,f. +7(812)3289822, e-mail: www.ott.ru

² — Saint-Petersburg State University,
199034, Mendeleevskaya line d. 7/9, Saint-Petersburg,
p.,f. +7(812)3281590, e-mail: www.spbu.ru

Human sperm DNA fragmentation origins are described, the widely used methods to assess sperm DNA fragmentation is characterized, impact on reproductive outcome is discussed.

Key words: sperm DNA fragmentation, oxidative stress, apoptosis, assisted reproductive technologies

Современные представления о генетических аспектах остеопороза

Хусаинова Р.И., Хуснутдинова Э.К.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа, e-mail: ritakh@mail.ru

В последние годы в области изучения генетики многофакторных заболеваний в целом и остеопороза (ОП) в частности наблюдается стремительный взлёт. С середины 1990-х годов по 2007 г. были сделаны многочисленные попытки идентифицировать отдельные гены, обуславливающие наследственный компонент ОП. Эти попытки полагались на анализ сцепления в семьях и исследования ассоциаций кандидатных генов, были обнаружены порядка 100 генов-кандидатов ОП, однако зачастую результаты этих исследований были противоречивы и не воспроизводились в других исследованиях. Ситуация начала меняться с 2007 г. с публикации первого исследования полногеномного анализа ассоциации (GWAS) сотен тысяч однонуклеотидных полиморфизмов (SNP, ОНП) с МПКТ и морфологией костных черт. После этой публикации было зарегистрировано более 25 GWAS исследований фенотипов, связанных с ОП, которые определили почти 100 независимых ассоциаций. В данном обзоре проведён анализ современных тенденций и направлений комплексного изучения генетики ОП.

Ключевые слова: остеопороз, минеральная плотность костной ткани, переломы, полногеномное исследование ассоциаций

Введение

ОП — распространённое заболевание, которым страдают порядка 200 млн чел. во всём мире [59]. Он характеризуется низкой минеральной плотностью костной ткани (МПКТ) и микроархитектурными нарушениями кости, которые вместе значительно увеличивают риск переломов [4]. Остеопоротические переломы являются огромным бременем для общественного здравоохранения с точки зрения смертности и заболеваемости, в первые 6 мес. после перелома шейки бедра, смертность составляет 18% [80].

То, что предрасположенность к ОП имеет генетический компонент, хорошо известно. На самом деле, МПКТ — важный предиктор риска перелома, является одним из самых наследуемых признаков у человека. Результаты близнецовых и семейных исследований неизменно показывают, что до 80% вариабельности МПКТ обусловлены генетическими факторами [52, 55]. Уровень МПКТ меняется с возрастом, и его возрастная вариация также находится под генетическим контролем [47]. Более того, количественные ультразвуковые параметры кости [28] и маркёры метаболизма кости [79] также высоко наследуемы и 40—65% дисперсии этих черт обусловлено генетическими различиями между отдельными людьми. Более 20 лет назад Seeman с соавторами продемонстрировали, что низкий уровень МПКТ является существенным механизмом, определяющим семейные случаи переломов. Они показали, что МПКТ в поясничном отделе позвоночника и шейки бедра была ниже у дочерей женщин с остеопоротическими переломами, чем у дочерей женщин, не имеющих ОП [67]. Была зарегистрирована значительная наследуемость МПКТ в юношеском возрасте и менопаузе у взрослых [31, 69], означающая генетический вклад в приобретение пика костной массы. Предполагается также, что гены вносят значительный вклад в вариабельность воз-

раст-зависимой потери костной массы, однако существует лишь несколько небольших исследований, где сообщалось об умеренной наследуемости костной потери [31, 33, 47, 68]. Тем не менее, точной оценки генетического вклада в потерю костной массы не хватает из-за трудностей в надёжной оценке уровня МПКТ, так как специфические траектории изменения МПКТ являются нелинейными и сильно зависят от возраста, что делает крайне важным получение многократных измерений в течение времени в стандартизированном формате [50]. Несмотря на эти трудности, были идентифицированы гены, связанные с изменением МПКТ, многие из них могут участвовать в метаболических путях, которые больше вовлечены в склонность к потере уровня МПКТ, чем в приобретение пика костной массы.

С начала 1990-х годов до середины последнего десятилетия поиск генов, обуславливающих предрасположенность к ОП, был затруднён и не имел больших успехов. С внедрением технологии GWAS ситуация стала меняться. За короткий период времени исследования значительно ускорили темпы открытия генов, что привело к идентификации почти 100 независимых ассоциаций с признаками, связанными с ОП. Однако исследования GWAS не выявляют точные «причинные» гены и не предоставляют функциональный контекст ассоциаций.

Ранние попытки определить конкретные гены, связанные с изменением уровня МПКТ и риском переломов, были сосредоточены на выявлении биологически мотивированных генов-кандидатов и тестировании конкретных вариантов генотипов, ассоциированных с МПКТ (или переломами). Несмотря на большое количество опубликованных результатов положительных ассоциаций, за редким исключением (например, гены рецептора эстрогена 1 (ER1) и рецепторы, связанные с белками липопротеинов низкой плотности 4 и 5

(LRP4, LRP5)), большинство ассоциаций, о которых сообщалось, оказалось трудно воспроизвести. В течение последних 6—7 лет, с достижениями в области геномных технологий, были опубликованы результаты многочисленных полногеномных исследований ассоциаций (GWAS) однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОМП) с уровнем МПКТ и со связанными с ним фенотипами.

Целью данной работы является освещение современных достижений в области комплексного изучения генетики ОП.

Полногеномные исследования ассоциаций

Изучение генетических вариантов, связанных со сложными фенотипами с помощью подхода GWAS имеет определённые преимущества перед другими подходами:

1) GWAS имеет большую статистическую мощьность, чем при использовании анализа сцепления для выявления частых, специфичных для болезни, генетических вариантов с низкой пенетрантностью [26];

2) имеет большую разрешающую способность с генотипированием миллионов однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОМП, SNP) в геноме, чтобы сузить локусы, обуславливающие болезнь, в одном гене или даже одного полиморфного варианта вместо сцепленного «локуса», который включает в себя от 10 до 100 генов;

3) использует «независимый» подход [54], не требующий предварительных знаний о молекулярном участии генов-кандидатов в патофизиологии заболевания, что предоставляет возможности для открытия нового гена;

4) открывает перспективу сокращения времени и усилий, необходимых для поиска новых генетических детерминант для многофакторных заболеваний.

Полногеномные исследования ассоциаций стали возможными благодаря нескольким предшествующим открытиям:

1) феномен неравновесия по сцеплению (LD) в геноме человека [57, 60];

2) очевидность концепции «частые заболевания / частые варианты» (CDCV) [60];

3) завершение Международного проекта НарМар (для частых вариантов последовательностей с частотами минорных аллелей >1%) [3], а также проекта «1000 геномов» [1000 Genomes Project Consortium, 2010], создавшего каталог полиморфных вариантов генома человека (как частых, так и редких [46], а также структурных вариантов [75]);

4) разработка технологии с высокой пропускной способностью с алгоритмами точного генотипирования [56], необходимыми для анализа сотен тысяч ОМП параллельно, а их стоимость позволила генотипировать большое количество людей, которые были фенотипически хорошо охарактеризованы;

5) разработка методов статистического анализа миллионов импутированных ОМП (фактически не генотипированных, взятых из базы данных НарМар) на основе структуры сцепления (LD) в эталонных популяциях [40] и эффективное тестирование вариантов, ассоциированных с фенотипом [10].

Исследования GWAS получили такое широкое распространение, что был создан каталог открытий на веб-сайте Национального института исследований генома человека (<http://genome.gov/GWASStudies>) [25].

В исследованиях GWAS сканируется весь геном и, как правило, сотни тысяч однонуклеотидных полиморфных вариантов (частоты минорных аллелей ОМП >5%) используются для идентификации хромосомных участков, где расположены гены, которые могут влиять на исследуемый признак. GWAS можно рассматривать как большую серию исследований генов-кандидатов «случай—контроль», но выполняемую в одном эксперименте на основе чипов. GWAS является подходом, «свободным от гипотезы», потому что не делается никаких предположений о месте и/или функциональной значимости ассоциированных локусов или их продуктов [26]. Более того, включение в исследование тысяч людей означает, что метод GWAS увеличил мощьность для выявления вариантов генов со скромным эффектом. Таким образом, большой размер выборки является преимуществом, но это также может быть недостатком, потому что варианты с низкой величиной эффекта, идентифицированные исследованиями GWAS, могут иметь меньшее клиническое значение. Тем не менее, метод GWAS был весьма успешным для выявления генетического вклада в развитие сложных признаков.

Применение метода GWAS при изучении ОП началось позже, чем в других областях. Самое раннее GWAS при ОП исследовало связь между 71 тыс. генетическими вариантами и уровнем МПКТ в различных отделах скелета и выявило доказательство ассоциаций 40 ОМП. Некоторые из них были расположены в генах, ранее ассоциированных с ОП: *MTHFR*, *ESR1*, *LRP5*, *VDR* и *COL1A1* [34], — но ни одна из этих ассоциаций не достигла уровня полногеномной значимости ($p < 5 \times 10^{-8}$) [73]. В другом исследовании GWAS были изучены 300 000 локусов в исландской популяции, варианты в генах *ZBTB40*, *ESR1*, *OPG*, *RANKL* и локус в области 6p21 были ассоциированы с МПКТ на уровне полногеномной значимости. В этом исследовании некоторые локусы также предположительно были ассоциированы с риском переломов, в том числе варианты в хромосомных регионах 1p36 и 2p16, в генах *OPG*, *LRP4*, *RANK* и *MHC*. В то же время, комбинированное исследование, включающее изучение как кандидатных генов, так и GWAS, в Великобритании и Роттердамской когорте обнаружило, что варианты генов *TNFRSF11B* и *LRP5* были связаны с МПКТ, в то время как вариант гена *LRP5* также был ассоциирован с риском переломов [62].

В настоящее время с применением технологии GWAS проведён поиск ассоциаций ОНП с уровнем МПКТ в разных участках скелета: в поясничном отделе позвоночника [15, 16, 29, 34, 35, 36, 37, 62, 64, 73, 74, 81], в шейке бедра [15, 16, 23, 29, 34, 36, 35, 37, 62, 64], в бедренной кости [15, 73, 74, 81], всего тела [78], в запястье [76], в луче [8], в голени [8] и в корковом объёме большеберцовой кости методом периферической количественной компьютерной томографии (pQCT) [53], а также анализ структуры бедра (HSA) [29, 34, 45, 86], перелома бедра [23] и болезни Педжета [2].

Большинство исследований проведено с использованием ДНК-чипов, содержащих от 300 тыс. до 550 тыс. ОНП. Для того, чтобы иметь возможность непосредственно сравнить результаты исследований разных авторов с применением различных ДНК-чипов, в крупномасштабных исследованиях GWAS также использовались около 2 млн частых ОНП (MAF \geq 5%), импутированных из базы данных НарМар на основе структуры генетического сцепления (LD) в европейских популяциях [2, 8, 16, 53, 64]. Это усиливает эффективность исследований без дополнительного генотипирования и, таким образом, позволяет более комплексно исследовать ассоциации без каких-либо дополнительных затрат.

Большинство исследований GWAS скелетных фенотипов использовало образцы смешанных популяций женщин до менопаузы, женщин в постменопаузе и мужчин в широком возрастном диапазоне (18—99 лет), хотя средний возраст, как правило, составлял 50 лет или более. Существует общее убеждение, что это, вероятно, будет способствовать выявлению специфичных генетических вариантов, характерных для мужчин и женщин, предрасположенных к ОП, у которых генетическая регуляция роста костей в более молодом возрасте и потеря костной массы после достижения пика костной массы может быть разной. Тем не менее, большинство исследований GWAS было сделано с привлечением всех имеющихся образцов, чтобы максимизировать размер выборки и, таким образом, усилить статистическую мощность. Несколько исследований GWAS были сосредоточены только на детях [78], подростках [53], женщинах репродуктивного возраста [35], женщинах в постменопаузе [15, 37] и пожилых женщинах [62]. Однако относительно небольшие размеры выборок ограничили статистическую мощность этих исследований. Большая часть исследований GWAS населения Восточной Азии (за исключением [8, 23, 36, 37]) привлекла образцы ДНК и европейского происхождения.

Полиморфный вариант rs1021188, расположенный вблизи гена *TNFSF11* (*RANKL*), был ассоциирован с корковым объёмом МПКТ у подростков. Ассоциация этого локуса не зависела от других ОНП, расположенных внутри или рядом с этим геном, которые были ассоциированы с МПКТ шейки бедра и позвонков у взрослых в других исследованиях GWAS. Локус в гене *CATSPERB* [35] был ассоциирован с МПКТ шейки бед-

ра только у женщин в пременопаузе. Этот локус расположен на расстоянии около 500 т.п.н. от локуса *RPS6KA5*, который был ассоциирован с МПКТ шейки бедра и позвоночника у пожилых мужчин и женщин [16]. *FONG*-локус был ассоциирован с МПКТ только в японской популяции [36]. С другой стороны, локусы в генах *Jag1* [37] и *FAM3C* [76] были ассоциированы с МПКТ в популяциях и Восточной Азии, и Европы. Большая часть опубликованных результатов исследований GWAS скелетных фенотипов не имела достаточной мощности, чтобы проверить генетические эффекты, специфичные для пола. Был найден только один локус в области Xp22.31 (рядом с геном *FAM9B*), ассоциированный с МПКТ позвоночника у мужчин [16, 41].

Одно исследование GWAS выполнялось на корковом объёме МПКТ большеберцовой кости с помощью pQCT измерения сечения кости (коркового или губчатой кости), дающего возможность изучить различные скелетные отсеки в кости, что невозможно при использовании двумерной рентгеновской остеоденситометрии (DEXA) [53]. Локус rs1021188 в гене *TNFSF11* (*RANKL*), ассоциированный с кортикальным объёмом МПКТ, не зависит от ранее идентифицированного ОНП (rs9594738) в той же области, ассоциированного с МПКТ, измеренного с помощью DEXA [74]. Этот результат показывает аллельную неоднородность *RANKL* локуса. Локус rs1021188 был также связан с увеличением эндостальной окружности, указывая на то, что *RANKL* может регулировать эндостальное расширение.

Несколько исследований GWAS выполнялись на тазобедренной геометрии в популяциях Европы, в том числе соотношении корковой толщины (BR), площади поперечного сечения, вала угла шейки бедренной кости (NSA), потери устойчивости ширины шейки бедра в самом узком месте (NW), длины шейки бедра и проксимального размера бедренной кости [29, 34, 45, 86]. Ассоциации с потерей устойчивости ширины шейки бедра в самом узком месте (NW) на уровне полногеномной значимости были найдены для ОНП, расположенного в области 1p13.2 (*RAP1A*) и 18q11.2 (*OSBPL1A*) [29]. Ассоциации на уровне полногеномной значимости с валом угла шейки бедренной кости (NSA) были найдены для ОНП, расположенного на хромосоме 2q11.2 (*TBC1D8*) [29]. Полиморфизм в гене *RTP3* был ассоциирован с корковой толщиной (BR) бедренной кости в популяциях Европы и Китая [86].

Самое крупное исследование GWAS, опубликованное на сегодняшний день, — исследование консорциума по поиску генетических факторов ОП (GEFOS), которое включало более 32 тыс. образцов из 17 различных популяций и независимую выборку из более 50 тыс. чел. для репликации исследований [16]. В этом исследовании выявлено 56 локусов, в значительной степени ассоциированных с МПКТ, 14 из которых были также ассоциированы с переломами. С тех пор были идентифицированы несколько дополнительных локусов, в том числе

в «неевропейских» популяциях, в результате чего общее количество локусов, ассоциированных с уровнем МПКТ, достигло 66 [63]. Эффект этих локусов одинаково мал, на каждый приходится гораздо меньше, чем 1% от общей вариабельности МПКТ, и даже суммарно все идентифицированные локусы составляют менее 6% от общей вариабельности МПКТ шейки бедра [16].

Два метаанализа GWAS показали, что варианты генов *ZBTB40*, *ESR1*, *LRP4*, *LRP5*, *TNFRSF11*, *SOST* и *TNFRSF11A* были ассоциированы с МПКТ [61, 64], а варианты генов *LRP5*, *SOST* и *TNFRSF11A* были ассоциированы с риском переломов [61]. Общие результаты исследований GWAS и метаанализов GWAS показывают, что гены, вовлечённые в RANK-RANKL-OPG-пути (гены *TNFRSF11B*, *TNFRSF11A* и *TNFRSF11*), Wnt- β -катениновый путь (гены *LRP5*, *LRP4* и *SOST*), эстрогеновые эндокринные пути (ген *ESR1*) и область 1p36 (ген *ZBTB40*) были в значительной степени ассоциированы с ОП. Последний метаанализ GWAS с участием 81 949 случаев заболевания и 102 444 контроля идентифицировал 56 локусов, которые ассоциированы с МПКТ, 13 из которых были ассоциированы и с переломами [16]. Некоторые из этих локусов или ОНП кластеры расположены в пределах или вблизи генов, которые кодируют белки, участвующие в системе RANK-RANKL-OPG, дифференциации мезенхимальных стволовых клеток, эндохондральном окостенении и Wnt сигнальном пути.

Стремясь идентифицировать новые генетические варианты, связанные с минеральной плотностью костной ткани, и подтвердить ранее выявленные, провели трёхступенчатый метаанализ полногеномных ассоциаций (GWAS) в выборке, состоящей из 27 061 чел. В стадии 1 проанализированы 7 исследований GWAS и у 11 140 чел. проведён поиск ассоциаций с уровнем МПКТ в поясничном отделе позвоночника, бедра и шейки бедра, в стадии 2 осуществлена репликация 33 ОНП у 9258 чел. и в стадии 3 — новая валидация трёх ОНП у 6663 чел. Объединив результаты всех трёх этапов, определили два новых локуса, которые ранее не были ассоциированы с МПКТ на уровне полногеномной значимости ($p = 5,0 \times 10^{-8}$): 14q24.2 (*rs227425*, $p = 3,98 \times 10^{-13}$, *SMOC1*) в объединённой выборке мужчин и женщин и 21q22.13 (*rs170183*, $p = 4,15 \times 10^{-9}$, *CLDN14*) у женщин. Два недавно выявленных ОНП были также значимыми генетическими факторами развития ОП (GEFOS, $n = 32960$, сводные результаты). В ходе исследования были подтверждены 13 локусов, которые, как сообщалось ранее, были ассоциированы с МПКТ: 1p36.12 (*ZBTB40*), 1p31.3 (*GPR177*), 4p16.3 (*FGFRL1*), 4q22.1 (MEPE), 5q14.3 (*MEF2C*), 6q25 0,1 (*C6orf97*, *ESR1*), 7q21.3 (*FLJ42280*, *SHFM1*), 7q31.31 (*FAM3C*, *WNT16*), 8q24.12 (*TNFRSF11B*), 11p15.3 (*SOX6*), 11q13.4 (*LRP5*), 13q14.11 (*AKAP11*) и 16q24 (*FOXL1*). Анализ экспрессии генов в остеогенных клетках показал потенциальную функциональную значимость двух генов-кандидатов (*SMOC1* и *CLDN14*) в костном метаболизме [85].

На сегодняшний день реплицировано 66 локусов, ассоциированных с МПКТ по результатам исследований GWAS. «Реплицированные» локусы определяются как:

1) ОНП с полногеномным уровнем значимости ассоциаций на этапе открытия (GWAS) и статистическая значимость на стадии репликации;

2) ОНП, не достигшие полногеномного уровня значимости ассоциаций на первой стадии исследований, но с полногеномным уровнем значимости ассоциаций при совместном метаанализе первого этапа GWAS и стадии репликации;

3) ОНП, близкие к полногеномному уровню значимости ассоциаций на первой стадии, но достигшие статистической значимости на этапе репликации после применения коррекции на множественное тестирование.

Полногеномный уровень значимости p (α -уровень) варьировал между исследованиями ($\alpha = 6 \times 10^{-7}$ до 5×10^{-8}) в зависимости от количества генотипированных и импутированных ОНП, а также от методов, которые были применены для коррекции множественного тестирования. Аннотация главных ассоциированных ОНП несколько проблематична, так как во многих случаях они могут быть расположены в нескольких генах или в межгенных участках.

Следует отметить, что большинство генов, связанных с МПКТ (за исключением *LRP5*), выявленных в исследованиях генов-кандидатов, не было подтверждено исследованиями GWAS. Среди 66 локусов, ассоциированных с МПКТ при исследованиях GWAS, были подтверждены только 7 генов (*LRP5*, *SOST*, *ESR1*, *TNFRSF11B*, *TNFRSF11A*, *TNFRSF11* и *PTH*) из почти 100 ранее выявленных ассоциаций кандидатных генов [43, 44, 63, 70, 82]. Это явление не является чем-то необычным и характерно для исследований GWAS и других сложных признаков или фенотипов, таких, как сахарный диабет 2-го типа и артериальное давление. Существует несколько потенциальных объяснений этого феномена, которые включают:

1) ложноотрицательные результаты исследований GWAS из-за очень строгих требований к уровню значимости;

2) недостаточная статистическая мощность для выявления ранее идентифицированных ассоциаций со скромными генетическими эффектами;

3) генетическая гетерогенность субпопуляций внутри метаанализа исследований GWAS (например, различные географические точки и фенотипические характеристики), что делает затруднительным обнаружение генетических ассоциаций;

4) генетические эффекты с сильными ген-генными и ген-средовыми взаимодействиями;

5) ложноположительные результаты предыдущих ассоциаций кандидатных генов из-за небольшого размера выборки и без соответствующей репликации.

Другими словами, исследования GWAS обнаружили новые генетические варианты, которые ранее не были выявлены. Идентификация новых вариантов, связанных с МПКТ, явно удалась и стала убедительной демонстрацией силы GWAS. Тем не менее, большинство регионов протяжённостью 10—50 т.п.н., идентифицированных при исследованиях GWAS, содержат большое количество генов, поэтому существует неопределённость в отношении этих генов в качестве причинных вариантов. Более того, большинство вариантов, выявленных GWAS, находятся в некодирующих областях генома и их функциональное значение до сих пор не определено. Несмотря на то, что полиморфные варианты, включённые в исследования GWAS, как правило, нейтральны (т.е. не имеют функциональных эффектов), они могут быть сцеплены с многочисленными окружающими ОНП, которые могут влиять на экспрессию генов или их функцию [17].

В большинстве исследований GWAS, представленных к настоящему времени, процент дисперсии, объясняемый всеми ассоциированными локусами, скромнен. Из всех скелетных фенотипов, исследование GWAS болезни Педжета дало наибольшую долю риска (~13% от семейного риска болезни Педжета) [2]. О самом сильном эффекте одного ОНП сообщили в исследовании GWAS китайской популяции [81]. Лocus в гене *ADAMTS18* объяснил примерно 3,8% от общего изменения МПКТ бедра, а в гене *TGFBR3* объяснил 1,2% общей дисперсии МПКТ позвоночника [81]. С другой стороны, в исследованиях GWAS популяций Европы на большую часть ОНП приходится лишь от 0,09 до 0,5% дисперсии МПКТ. Rivadeneira с соавторами предполагают, что все ассоциированные с МПКТ локусы 20 исследований GWAS вместе объяснили только 2,9% вариации МПКТ позвоночника и 1,9% вариации уровня МПК шейки бедра в европейских популяциях [64]. Как сообщалось в крупнейшем метаанализе GWAS, 56 локусов, ассоциированных с МПКТ, вместе объяснили только 5,8% вариативности МПКТ шейки бедра [16].

Все вышеперечисленные факты свидетельствуют, что результаты исследований GWAS до настоящего времени не объяснили большинство генетических различий в вариативности МПКТ, несмотря на достаточную мощность исследований для определения скромных генетических эффектов. Этот феномен «недостающей или пропущенной наследуемости» обычно выявляют и при исследовании многих других сложных признаков и фенотипов [49].

Несмотря на перспективы открытия новых генов, связанных со скелетными фенотипами, тайна «недостающей наследуемости» [48] вызывает сомнения в значимости исследований GWAS и гасит надежду их использования для развития персонализированной медицины. Был предложен ряд объяснений феномена «пропавшей наследуемости», в том числе:

- 1) недостаточный размер выборки для обнаружения вариантов с меньшим эффектом;
- 2) частые ОНП в качестве «суррогатных» маркёров плохо ассоциированы с причинными/функциональными вариантами;
- 3) аллельная неоднородность с несколькими независимыми вариантами в одном и том же локусе;
- 4) редкие варианты (незначительная частота аллеля <1%), которые плохо обнаруживаются существующими методами генотипирования;
- 5) другие структурные вариации;
- 6) недостаточный учёт ген-генных и ген-средовых взаимодействий;
- 7) синтетические ассоциации (объединение нескольких вариантов фенотипа) [14, 21].

Таким образом, на сегодняшний день исследования GWAS выявили более 60 локусов, ассоциированных с ОП, и предоставили ценную информацию о генетической составляющей заболевания. Будущие исследования GWAS с участием большего числа индивидов, несомненно, идентифицируют ещё больше локусов, ассоциированных с фенотипами ОП, и обеспечат гораздо более чёткое представление о характере и составе генетической архитектуры заболевания.

Новые направления в исследовании остеопороза

Полногеномные исследования предназначены для выявления ассоциаций с высоким разрешением через беспристрастное сканирование генома. Однако GWAS не свойственно идентифицировать отдельные причинные гены, а также эти исследования не обеспечивают функциональную информацию. Это важный момент, так как применение генетических открытий для новых методов лечения зависит от открытия генов и выяснения их функции. Кроме того, ясно, что сложные костные фенотипы, такие, как МПК, не определяются исключительно кумулятивными эффектами отдельных генетических влияний, но вместо этого являются результатом возникающих свойств биологических сетей [66]. Это приводит к необходимости новых подходов, которые могут расширить, дополнить и повысить эффективность результатов исследований GWAS, генерируя системный уровень заболевания [18, 51]. Как и для многих других многофакторных заболеваний, будущее геномных исследований при ОП почти наверняка будет включать тщательное исследование роли редких вариантов, открытых путём глубокого секвенирования генов-кандидатов ОП, а также тех, которые обнаружены с помощью различных других источников, в том числе экзомного секвенирования и проекта 1000 геномов.

Исследование ассоциаций, направленное на поиск редких вариантов, будет потенциально полезно по двум причинам. Во-первых, потому что GWAS не использует варианты с незначительными частотами аллелей (менее 5%) и прямое генотипирование этих полиморфных ва-

риантов является единственным способом оценить низкочастотный спектр аллельной вариации. Во-вторых, редкие варианты, находящиеся в экзонах генов, могут включать такие, которые нарушают функцию гена, таким образом, потенциально оказывая большое влияние на проявление фенотипа. Даже если эти мутации встречаются редко, их идентификация может предоставить важную информацию о роли этого конкретного гена (и, возможно, молекулярного пути) в биологии костей.

В дополнение к ОНП, варианты количества копий (CNVs) составляют значительную часть геномной изменчивости [58] и влияют на 20% вариации в экспрессии генов [49, 72]. CNVs, как правило, больше, чем 1 кб длины ДНК, являются структурными изменениями геномной последовательности, что приводит к аномальному количеству копий сегмента ДНК к клетке. Несколько исследований оценили CNVs в ДНК-чипах, которые использовались для генотипирования ОНП, и выполнили анализ ассоциаций CNVs генома с переломом шейки бедра [83], геометрией тазобедренного сустава [13, 42] и уровнем МПКТ [13]. Частые CNV-делеции (76,8% случаев гомозигот по делеции), захватывающие ген *UGT2B17*, были ассоциированы с переломом бедра у китайцев в исследовании «случай—контроль», выборки на стадии GWAS состояли из 350 чел. с переломами бедра и 350 чел. — без переломов и на стадии репликации результатов — 399 чел. с переломами бедра и 400 чел. в качестве контроля [83]. По сравнению с лицами с делецией обеих копий гена *UGT2B17* люди, несущие, по крайней мере, одну копию *UGT2B17*, имели повышенный риск перелома бедра, OR = 1,58 (95%ДИ, 1,12—2,22). Тем не менее, эта ассоциация не была воспроизведена в последующем исследовании 1347 пожилых европейских женщин (34,1% людей с гомозиготными делециями) [7].

Другие подходы к идентификации генетических вариантов, ассоциированных с МПКТ и/или риском переломов, находятся в зачаточном состоянии. Эпигенетические факторы, которые не изменяют саму последовательность ДНК, а скорее, экспрессию гена, могут играть важную роль. Наиболее известными эпигенетическими механизмами являются метилирование ДНК и модификации гистонов, которые действуют на уровне транскрипции генов, и микроРНК, которые оказывают влияние на посттранскрипционном уровне. Эпигенетические маркёры могут изменить программу дифференциации клеток, в том числе дифференциацию линии остеобластов и/или могут быть важными регуляторами костного ремоделирования в остеокластогенезе [11]. На самом деле, последние данные свидетельствуют о том, что механизмы метилирования могут повлиять на транскрипцию *RANKL* и экспрессию *OPG* [12]. Предполагается, что эпигенетические маркёры могут быть модифицированы факторами питания, эмбриональными (внутриматочными) факторами роста и/или другими факторами окружающей среды, хотя в настоящее время

не ясно, какие модифицирующие факторы и ключевые эпигенетические маркёры наиболее актуальны для ОП. Решение этих вопросов затруднено по ряду причин, в том числе определение соответствующих эпигенетических маркёров и измерения клеточной и/или тканевой специфичности эпигенетических маркёров. Несмотря на эти проблемы, исследование эпигенетического контроля регулирования костного метаболизма может иметь практические последствия, например некоторые деметилирующие агенты уже используются для лечения опухолевых заболеваний [38, 65].

Совершенно иной методологический подход для идентификации новых мишеней ОП использовался Hayashi с соавторами в 2012 г. [24]. Они предположили, что культивируемые остеобласты мыши выделяют белки в дополнение к остеопротегерину (мощный ингибитор остеокластов), которые регулируют метаболизм костей. Авторы фракционировали среды из культивированных остеобластов, полученных из остеопротегерин-дефицитных мышей, и идентифицировали белок *Semaphorin-3A* в полученных остеобластах, который ингибирует образование остеокластов. Важно отметить, что этот белок не только подавляет резорбцию кости остеокластами, но и увеличивает образование остеобластов костной ткани. У *Semaphorin-3A*-дефицитных мышей была остеопения, а внутривенное введение *Semaphorin-3A* предотвратило индуцированную овариэктомией потерю костной массы.

Semaphorin-3A снижает костную резорбцию и повышает остеогенез через различные сигнальные пути. Ингибирующее действие на резорбцию кости было опосредовано через связывание *Semaphorin-3A* с *Neuropilin-1*, который мешал *RANKL*-индуцированной дифференциации остеокластов путём ингибирования *immunogceptor tyrosine-based activation motif* (мотива тирозин-основанной активации иммунорецептора) и *RhoA* сигнальных путей. Напротив, стимулирующий эффект *Semaphorin-3A* на формирование костной ткани был достигнут при посредничестве канонического *Wnt / β-катенина* сигнального пути. Текущие методы лечения ОП не в состоянии разъединить костную резорбцию и формирование кости. Антирезорбтивное лечение ингибирует резорбцию костей и в то же время, хотя и в меньшей степени, ингибирует образование костной ткани, в то время как анаболическое лечение увеличивает образование костной ткани и, хотя и в меньшей степени, усиливает костную резорбцию [24, 84]. Таким образом, механизм действия *Semaphorin-3A* очень необычен, так как разъединяет два компонента костной ткани, что может быть использовано для терапевтического использования и привести к открытию нового класса двойного действия терапевтических агентов для ОП [24, 84].

В другом исследовании, опубликованном в 2012 г., используя другой методологический подход, Sjogren с соавторами предположили, что бактерии в кишечнике могут повлиять на костный метаболизм [71]. Кишечник

человека населен триллионами бактерий, известных как микрофлора кишечника, которая в совокупности содержит в 150 раз больше генов, чем геном человека. Микрофлора кишечника приобретает по рождению, имеет совместную эволюцию с человеческим геномом и может рассматриваться как многоклеточный орган, который взаимодействует и влияет на своего хозяина во многих отношениях [39]. Состав микрофлоры кишечника модулируется рядом факторов окружающей среды на протяжении всей жизни, такими, как диета и лечение антибиотиками. Некоторые заболевания были связаны с нарушением регуляции кишечной микрофлоры, в том числе болезнь Крона, рак толстой кишки, бронхиальная астма, сахарный диабет и ожирение.

Sjogren с соавторами использовали модели стерильных мышей, чтобы проверить свою гипотезу, и показали, что эти мыши обнаруживают повышенную костную массу по сравнению с контрольными мышами и что колонизация бактериями мышей с нормальной микрофлорой кишечника быстро нормализует костную массу [71]. Образование остеокластов было снижено у стерильных мышей, и воздействие на остеокласт-опосредованную резорбцию кости было связано со снижением экспрессии остеолитических цитокинов TNF в кости и снижением частоты CD4⁺T-клеток в костном мозге. Авторы предположили, что ингибирующее действие микрофлоры кишечника на костную массу опосредовано через воздействие на иммунный статус кости, который, в свою очередь, регулируется остеокластами, резорбирующими кость. Роль микрофлоры кишечника в регуляции костной массы поддерживается в другом исследовании 2012 г., которое продемонстрировало, что лечение антибиотиками в начале жизни, которое изменяет состав микрофлоры кишечника, увеличивает костную массу у молодых мышей [9]. Эти исследования гарантируют дальнейшие исследования для оценки микрофлоры кишечника в качестве потенциальной новой терапевтической мишени при ОП.

Подходы глубокого ресеквенирования предоставляют возможность тестировать ассоциации со всеми вариантами последовательности ДНК (частыми и редкими вариантами, а также структурными вариантами), которые, в некоторой степени, более подробные, чем текущие исследования GWAS [22, 40]. Глубокий анализ перспективных целевых регионов у лиц с экстремальными фенотипами может быть наиболее перспективной стратегией для доступа к редким генетическим вариантам, и такой подход имеет большой потенциал для обнаружения редких и структурных вариантов, отсутствующих на чипах, применяемых в исследованиях GWAS. Сейчас активно начинают применяться тестирование ассоциаций между редкими, структурными вариантами и скелетными фенотипами. Исследователи, участвующие в близнецовых исследованиях Framingham (Великобритания), многоцентровом исследовании остеопороза в Канаде, исследовании сердца Cardiovascular Heart Stu-

dy, женского здоровья Women's Health Study и Rotterdam Study (Нидерланды), начали активно использовать методы секвенирования генома следующего поколения и полноэкзомное секвенирование с целью поиска локусов, не выявленных в предыдущих исследованиях GWAS. Первые результаты этих усилий должны быть получены в ближайшем будущем.

С развитием технологий для массивного параллельного генотипирования ОНП, расширяется емкость коммерческих чипов, что позволяет повысить мощность GWAS «следующего поколения» до 5 млн ОНП в ДНК-чипах от Affymetrix и Illumina [27]. Кроме того, недавнее появление экзомных чипов (ExOME) также позволит выявить как частые, так и редкие функциональные варианты в экзонах. Эти чипы намного более доступны, чем секвенирование следующего поколения целой экзомной последовательности, и такие исследования осуществляются в настоящее время в десятках научных центров по всему миру, изучающих скелетные фенотипы.

Для большинства многофакторных заболеваний с гетерогенной патофизиологией не может быть точно определен только один фенотип [5, 19]. Часто схожие эндофенотипы заболевания могут быть ассоциированы с теми же наборами генов [20]. Одновременное тестирование эндофенотипов заболевания является мощным подходом для идентификации генов предрасположенности и выявления плейотропных эффектов генов, непосредственно влияющих на несколько черт. Изучая многочисленные скелетные эндофенотипы, включая МПКТ бедра, позвоночника, пятки и геометрических тазобедренных показателей, в исследовании ОП Framingham был сделан вывод, что большинство сходств между количественными фенотипами костей могут быть связаны с плейотропными эффектами генов [30, 32].

Другой подход к поиску плейотропии заключается в привлечении результатов крупных GWAS-консорциумов и исследовании перекрывающихся топовых ОНП между двумя фенотипами. Несколько генов, ассоциированных с уровнем МПКТ позвоночника и шейки бедра, также были ассоциированы и с другими «нескелетными» фенотипами, такими, как камни в почках (ген *CLDN14*) [77], уровень глюкозы натощак (ген *ITGA1*) [6] язвенный колит (ген *Wnt4-ZBTB40*), болезнь Крона (ген *TNFSF11*), рост (гены *MEF2C* и *FUBP3*) и рак молочной железы (*C6orf97-ESR1*) [87]. Эти наблюдения позволяют предположить, что плейотропные генетические эффекты могут существовать между МПКТ и другими фенотипами, которые традиционно не рассматриваются вместе с костными фенотипами.

Таким образом, усилия, направленные на определение конкретных генов, участвующих в патогенезе заболевания, должны обеспечить дальнейшее понимание молекулярных основ ОП и, в конечном итоге, привести к разработке новых терапевтических мишеней и стратегии профилактики заболевания.

Список литературы

1. 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing // *Nature*. — 2010. — 467. — P. 1061–1073.
2. Albagha O.M., Wani S.E., Visconti M.R. et al. Genome-wide association identifies three new susceptibility loci for Paget's disease of bone // *Nat. Genet.* — 2011. — Vol. 43. — P. 685–689.
3. Altshuler D.M., Gibbs R.A., Peltonen L. et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations // *Nature*. — 2010. — 467. — P. 52–58.
4. Anonymous: Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis // *The American Journal of Medicine*. — 1993. — 94. — P. 646–650.
5. Barabasi A.L. Network medicine—from obesity to the «disease» // *N. Engl. J. Med.* — 2007. — Vol. 357. — P. 404–407.
6. Billings L., Hsu Y.H., Ackerman R. et al. Leveraging genome-wide association data to detect genetic pleiotropy at loci associated with glycemic and skeletal phenotypes // *Diabetes*. — 2012. — Vol. 61. — P. 2176–2186.
7. Chew S., Mullin B.H., Lewis J.R. et al. Homozygous deletion of the UGT2B17 gene is not associated with osteoporosis risk in elderly Caucasian women // *Osteoporos Int.* — 2011. — Vol. 22. — P. 1981–1986.
8. Cho Y.S., Go M.J., Kim Y.J. et al. A large-scale genome-wide association study of Asian populations uncovers genetic factors influencing eight quantitative traits // *Nat. Genet.* — 2009. — Vol. 41. — P. 527–534.
9. Cho I., Yamanishi S., Cox L. et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity // *Nature*. — 2012. — Vol. 488. — P. 621–626.
10. de Bakker P.I., Yelensky R., Pe'er I. et al. Efficiency and power in genetic association studies // *Nat. Genet.* — 2005. — Vol. 37. — P. 1217–1223.
11. Delgado-Calle J., Garmilla P., Riancho J.A. Do epigenetic marks govern bone mass and homeostasis? // *Curr. Genomics*. — 2012. — Vol. 13. — P. 252–263.
12. Delgado-Calle J., Sanudo C., Fernandez A.F. et al. Role of DNA methylation in the regulation of the RANKL-OPG system in human bone // *Epigenetics*. — 2012. — Vol. 7. — P. 83–91.
13. Deng F.Y., Zhao L.J., Pei Y.F. et al. Genome-wide copy number variation association study suggested VPS13B gene for osteoporosis in Caucasians // *Osteoporos Int.* — 2010. — Vol. 21. — P. 579–587.
14. Dickson S.P., Wang K., Krantz I. et al. Rare variants create synthetic genome-wide associations // *PLoS Biol.* — 2010. — 8:e1000294.
15. Duncan E.L., Danoy P., Kemp J.P. et al. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk // *PLoS Genet.* — 2011. — 7:e1001372.
16. Estrada K., Styrkarsdottir U., Evangelou E. et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture // *Nat. Genet.* — 2012. — Vol. 44. — P. 491–501.
17. Farber Charles R. Systems Genetics: A Novel Approach to Dissect the Genetic Basis of Osteoporosis // *Curr. Osteoporos. Rep.* — 2012. — Vol. 10(3). — P. 228–235.
18. Farber C.R., Lusa A.J. Future of osteoporosis genetics: enhancing genome-wide association studies // *J. Bone Miner. Res.* — 2009. — Vol. 24. — P. 1937–1942.
19. Freimer N., Sabatti C. The human phenome project // *Nat. Genet.* — 2003. — Vol. 34. — P. 15–21.
20. Goh K.I., Cusick M.E., Valle D. et al. The human disease network // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2007. — Vol. 104. — P. 8685–8690.
21. Goldstein D.B. The importance of synthetic associations will only be resolved empirically // *PLoS Biol.* — 2011. — 9:e1001008.
22. Gorlov I.P., Gorlova O.Y., Sunyaev S.R. et al. Shifting paradigm of association studies: value of rare single-nucleotide polymorphisms // *Am. J. Hum. Genet.* — 2008. — Vol. 82. — P. 100–112.
23. Guo Y., Tan L.J., Lei S.F. et al. Genome-wide association study identifies ALDH7A1 as a novel susceptibility gene for osteoporosis // *PLoS Genet.* — 2010. — 6:e1000806.
24. Hayashi M. et al. Osteoprotection by semaphorin 3A // *Nature*. — 2012. — Vol. 485. — P. 69–74.
25. Hindorf L., Sethupathy P., Junkins H. et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2009. — Vol. 106. — P. 9362–9367.
26. Hirschhorn J.N., Daly M.J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits // *Nat. Rev. Genet.* — 2005. — Vol. 6. — P. 95–108.
27. Hoffmann T.J., Kvale M.N., Hesselson S.E. et al. Next generation genome-wide association tool: design and coverage of a high-throughput European-optimized SNP array // *Genomics*. — 2011. — Vol. 98. — P. 79–89.
28. Howard G.M., Nguyen T.V., Harris M. et al. Genetic and environmental contributions to the association between quantitative ultrasound and bone mineral density measurements: a twin study // *J. Bone Miner. Res.* — 1998. — Vol. 13. — P. 1318–1327.
29. Hsu Y., Beck T.J., Brown S.J. et al. Meta-analysis of genome-wide association study (GWAS) identifies several genes for hip bone geometry in Caucasians: the Genetic Factors for Osteoporosis (GEFOS) Consortium // *J. Bone Miner. Res.* — 2010. — Vol. 25 (Suppl. 1). — S448.
30. Hsu Y.H., Chen X., Zillikens C. et al. Multi-phenotype genome-wide association meta-analysis on both lean body mass and BMD identified novel pleiotropic genes that affected skeletal muscle and bone metabolism in European descent Caucasian populations // *J. Bone Miner. Res.* — 2011. — Vol. 26 (Suppl. 1). — S56.
31. Hui S.L., Koller D.L., Foroud T.M. et al. Heritability of changes in bone size and bone mass with age in premenopausal white sisters // *J. Bone Miner. Res.* — 2006. — Vol. 21. — P. 1121–1125.
32. Karasik D., Hsu Y.H., Zhou Y. et al. Genome-wide pleiotropy of osteoporosis-related phenotypes: the Framingham Study // *J. Bone Miner. Res.* — 2010. — Vol. 25. — P. 1555–1563.
33. Kelly P.J., Nguyen T., Hopper J. et al. Changes in axial bone density with age: a twin study // *J. Bone Miner. Res.* — 1993. — Vol. 8. — P. 11–17.
34. Kiel D.P., Demissie S., Dupuis J. et al. Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study // *BMC Med. Genet.* — 2007. — Vol. 8 (Suppl. 1). — S14.
35. Koller D.L., Ichikawa S., Lai D. et al. Genome-wide association study of bone mineral density in premenopausal European-American women and replication in African-American women // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2010. — Vol. 95. — P. 1802–1809.
36. Kou I., Takahashi A., Urano T. et al. Common variants in a novel gene, FONG on chromosome 2q33.1 confer risk of osteoporosis in Japanese // *PLoS One*. — 2011. — 6:e19641.
37. Kung A.W.C., Xiao S.-M., Cherny S. et al. Association of JAG1 with bone mineral density and osteoporotic fractures: a genome-wide association study and follow-up replication studies // *American Journal of Human Genetics*. — 2010. — Vol. 86. — P. 229–239.
38. La Thangue N.B. Histone deacetylase inhibitors and cancer therapy // *J. Chemother.* — 2004. — Vol. 16. — Suppl. 4. — P. 64–67.
39. Ley R.E., Hamady M., Lozupone C. et al. Evolution of mammals and their gut microbes // *Science*. — 2008. — Vol. 320. — P. 1647–1651.

40. Li Y., Vinckenbosch N., Tian G. et al. Resequencing of 200 human exomes identifies an excess of low-frequency non-synonymous coding variants // *Nat. Genet.* — 2010. — Vol. 42. — P. 969–972.
41. Liu C.T., Estrada K., Yerges-Armstrong L.M. et al. Assessment of gene-by-sex interaction effect on bone mineral density // *J. Bone Miner. Res.* — 2012. — Vol. 27 (10). — P. 2051–2064.
42. Liu S.L., Lei S.F., Yang F. et al. Copy number variation in CNP267 region may be associated with hip bone size // *PLoS One.* — 2011. — 6:e22035.
43. Liu Y.J., Shen H., Xiao P. et al. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: a 2004 update // *J. Bone Miner. Res.* — 2006. — Vol. 21. — P. 1511–1535.
44. Liu Y.Z., Liu Y.J., Recker R.R., Deng H.W. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update // *J. Endocrinol.* — 2003. — Vol. 177. — P. 147–196.
45. Liu Y.Z., Wilson S.G., Wang L. et al. Identification of PLCL1 gene for hip bone size variation in females in a genome-wide association study // *PLoS One.* — 2008. — 3:e3160.
46. MacArthur D.G., Balasubramanian S., Frankish A. et al. A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes // *Science.* — 2012. — Vol. 335. — P. 823–828.
47. Makovey J., Nguyen T.V., Naganathan V. et al. Genetic effects on bone loss in peri- and postmenopausal women: a longitudinal twin study // *J. Bone Miner. Res.* — 2007. — Vol. 22. — P. 1773–1780.
48. Manolio T.A., Collins F.S., Cox N.J. et al. Finding the missing heritability of complex diseases // *Nature.* — 2009. — Vol. 461. — P. 747–753.
49. Mileyko Y., Joh R.I., Weitz J.S. Small-scale copy number variation and large-scale changes in gene expression // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2008. — Vol. 105. — P. 16659–16664.
50. Mitchell B.D., Yerges-Armstrong L.M. The genetics of bone loss: challenges and prospects // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2011. — Vol. 96. — P. 1258–1268.
51. Nadeau J., Dudley A.M. Genetics. Systems genetics // *Science.* — 2011. — Vol. 331. — P. 1015–1016.
52. Nguyen T.V., Howard G.M., Kelly P.J., Eisman J.A. Bone mass, lean mass, and fat mass: same genes or same environments? // *Am. J. Epidemiol.* — 1998. — Vol. 147. — P. 3–16.
53. Paternoster L., Lorentzon M., Vandenput L. et al. Genome-wide association meta-analysis of cortical bone mineral density unravels allelic heterogeneity at the RANKL locus and potential pleiotropic effects on bone // *PLoS Genet.* — 2010. — 6:e1001217.
54. Pe'er I., de Bakker P.I., Maller J. et al. Evaluating and improving power in whole-genome association studies using fixed marker sets // *Nat. Genet.* — 2006. — Vol. 38. — P. 663–667.
55. Pocock N.A., Eisman J.A., Hopper J.L. et al. Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study // *J. Clin. Invest.* — 1987. — Vol. 80. — P. 706–710.
56. Ragoussis J. Genotyping technologies for genetic research // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* — 2009. — Vol. 10. — P. 117–133.
57. Rannala B., Reeve J.P. High-resolution multipoint linkage-disequilibrium mapping in the context of a human genome sequence // *Am. J. Hum. Genet.* — 2001. — Vol. 69. — P. 159–178.
58. Redon R., Ishikawa S., Fitch K.R. et al. Global variation in copy number in the human genome // *Nature.* — 2006. — Vol. 444. — P. 444–454.
59. Reginster J.-Y., Burlet N. Osteoporosis: a still increasing prevalence // *Bone.* — 2006. — Vol. 38. — S4–9.
60. Reich D.E., Cargill M., Bolk S. et al. Linkage disequilibrium in the human genome // *Nature.* — 2001. — Vol. 411. — P. 199–204.
61. Richards J.B., Kavvoura F.K., Rivadeneira F. et al. Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture // *Ann. Intern. Med.* — 2009. — Vol. 151. — P. 528–537.
62. Richards J.B., Rivadeneira F., Inouye M. et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study // *Lancet.* — 2008. — Vol. 371. — P. 1505–1512.
63. Richards J.B., Zheng H.F., Spector T.D. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges // *Nat. Rev. Genet.* — 2012. — Vol. 13. — P. 576–588.
64. Rivadeneira F., Styrkarsdottir U., Estrada K. et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies // *Nat. Genet.* — 2009. — Vol. 41. — P. 1199–1206.
65. Santos F.P., Kantarjian H., Garcia-Manero G. et al. Decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes // *Expert Rev. Anticancer Ther.* — 2010. — Vol. 10. — P. 9–22.
66. Schadt E.E. Molecular networks as sensors and drivers of common human diseases // *Nature.* — 2009. — Vol. 461. — P. 218–223.
67. Seeman E., Hopper J.L., Bach L.A. et al. Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis // *N. Engl. J. Med.* — 1989. — Vol. 320. — P. 554–558.
68. Shaffer J.R., Kammerer C.M., Bruder J. et al. Five-year change in bone mineral density is heritable in Mexican Americans: The San Antonio Family Osteoporosis Study // *J. Bone Miner. Res.* — 2005. — Vol. 20. — Suppl. 1. — S67.
69. Shaffer J.R., Kammerer C.M., Dressen A.S. et al. Rate of bone loss is greater in young Mexican American men than women: the San Antonio Family Osteoporosis study // *Bone.* — 2010. — Vol. 47. — P. 49–54.
70. Sims A.M., Shephard N., Carter K. et al. Genetic analyses in a sample of individuals with high or low BMD shows association with multiple Wnt pathway genes // *J. Bone Miner. Res.* — 2008. — Vol. 23. — P. 499–506.
71. Sjogren, K., Engdahl C., Henning P. et al. The gut microbiota regulates bone mass in mice // *J. Bone Miner. Res.* — 2012. — Vol. 27. — P. 1357–1367.
72. Stranger B.E., Forrester M.S., Dunning M. et al. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes // *Science.* — 2007. — Vol. 315. — P. 848–853.
73. Styrkarsdottir U., Halldorsson B.V., Gretarsdottir S. et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures // *N. Engl. J. Med.* — 2008. — Vol. 358. — P. 2355–2365.
74. Styrkarsdottir U., Halldorsson B.V., Gretarsdottir S. et al. New sequence variants associated with bone mineral density // *Nat. Genet.* — 2008. — Vol. 41. — P. 15–17.
75. Sudmant P.H., Kitzman J.O., Antonacci F. et al. Diversity of human copy number variation and multicopy genes // *Science.* — 2010. — Vol. 330. — P. 641–646.
76. Tan L., Liu R., Lei S. et al. A genome-wide association analysis implicates SOX6 as a candidate gene for wrist bone mass // *Sci. China Life Sci.* — 2010. — Vol. 53. — P. 1065–1072.
77. Thorleifsson G., Holm H., Edvardsson V. et al. Sequence variants in the CLDN14 gene associate with kidney stones and bone mineral density // *Nat. Genet.* — 2009. — Vol. 41. — P. 926–930.
78. Timpson N.J., Tobias J.H., Richards J.B. et al. Common variants in the region around Osterix are associated with bone mineral density and growth in childhood // *Hum. Mol. Genet.* — 2009. — Vol. 18. — P. 1510–1517.
79. Tokita A., Engdahl C., Henning P. et al. Genetic influences on type I collagen synthesis and degradation: further evidence for genetic regulation of bone turnover // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1994. — Vol. 78. — P. 1461–1466.

80. Tosteson A.N., Gottlieb D.J., Radley D.C. et al. Excess mortality following hip fracture: the role of underlying health status // *Osteoporos Int.* — 2007. — Vol. 18. — P. 1463–1472.

81. Xiong D.H., Liu X.G., Guo Y.F. et al. Genome-wide association and follow-up replication studies identified ADAMTS18 and TGFBR3 as bone mass candidate genes in different ethnic groups // *Am. J. Hum. Genet.* — 2009. — Vol. 84. — P. 388–398.

82. Xu X.H., Dong S.S., Guo Y. et al. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: the 2009 update // *Endocr. Rev.* — 2010. — Vol. 31. — P. 447–505.

83. Yang T.L., Chen X.D., Guo Y. et al. Genome-wide copy-number-variation study identified a susceptibility gene,

UGT2B17, for osteoporosis // *Am. J. Hum. Genet.* — 2008. — Vol. 83. — P. 663–674.

84. Zaidi, M., Iqbal J. Translational medicine: Double protection for weakened bones // *Nature.* — 2012. — 485. — P. 47–48.

85. Zhang L., Choi H.J., Estrada K. et al. Multistage genome-wide association meta-analyses identified two new loci for bone mineral density // *Hum. Mol. Genet.* — 2013. — Vol. 23(7). — P. 1923–1933.

86. Zhao L.J., Liu X.G., Liu Y.Z. et al. Genome-wide association study for femoral neck bone geometry // *J. Bone Miner. Res.* — 2010. — Vol. 25. — P. 320–329.

87. Zheng W., Long J., Gao Y.T. et al. Genome-wide association study identifies a new breast cancer susceptibility locus at 6q25.1 // *Nat. Genet.* — 2009. — Vol. 41. — P. 324–328.

Modern concepts of osteoporosis genetic aspects

Khusainova R.I., Khusnutdinova E.K.

Institute of Biochemistry and Genetics Ufa Science Centre Russian Academy of Science, Russia, Ufa,
e-mail: ritakh@mail.ru

In recent years the study of genetics of complex diseases in general and osteoporosis in particular has seen a rapid rise. From the mid 1990s to 2007, numerous attempts were made to identify the individual genes that explained the heritable component of osteoporosis. These attempts relied on linkage analysis in families and association studies of candidate genes have been discovered about 100 candidate genes for osteoporosis, but often the results of these studies were contradictory and not reproduced in other studies. Since the publication of the first genome-wide association analysis study (GWAS) on skeletal phenotypes in 2007, there have been more than 25 GWAS studies of phenotypes associated with osteoporosis, which accounted for nearly 100 independent associations. This review analyzes the current trends and directions of complex genetics studies of osteoporosis.

Key words: osteoporosis, bone mineral density, fractures, genome-wide association studies

Выявление мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* — перспективность проведения генетического скрининга на базе организаций службы крови

Батенева Е.И.^{1,4}, Максименко В.А.², Кадочникова В.В.^{1,3},
Кофиади И.А.^{1,3}, Трофимов Д.Ю.¹, Рагимов А.А.², Алексеев Л.П.³

¹ — Закрытое акционерное общество «НПФ ДНК-Технология»,

Москва, 115478, Каширское ш., д.24 к.2, тел./факс +74959804555, e-mail: elena.bateneva@gmail.com

² — Российский Научный Центр Хирургии им. акад. Б.В. Петровского Российской Академии Медицинских Наук, Москва, 119991, ГСП-1, Абрикосовский пер., д.2

³ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт Иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, 115478, Каширское ш., д.24 к.2

⁴ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский Онкологический Научный Центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, 115478, Москва, Каширское ш., д.24, 115478

Целью данного исследования были установление частот распространённых в российской популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у доноров первичной кроводачи, а также оценка возможности проведения генетического скрининга на базе организаций службы крови и выявление его потенциальных проблем. При генотипировании 1000 доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русские и постоянно проживающих на территории Российской Федерации, обнаружено 2 носителя мутации 5382insC (частота в выборке 0,2%, или 1:500) и один носитель мутации 3819delGTAAA (частота в выборке 0,1%, или 1:1000) в гене *BRCA1*. При проведении генетического скрининга на базе организаций службы крови технических сложностей не отмечено. Важное значение для эффективного скрининга имеют предварительное информирование о его целях и задачах с учётом этических и социальных аспектов и мотивация участников.

Ключевые слова: *BRCA1*, *BRCA2*, российская популяция, скрининг, служба крови

Введение

Достижения молекулярной генетики широко используются в практической медицине для определения носительства мутаций с известным патогенным эффектом. Наиболее распространено генетическое тестирование для диагностики, в том числе преимплантационной и пренатальной, моногенных заболеваний (аутосомно-рецессивных, аутосомно-доминантных, X-сцепленных). Более спорной является целесообразность — как этическая, так и экономическая — скрининга и пренатальной диагностики заболеваний с аутосомно-доминантным типом наследования, но неполной пенетрантностью и/или поздним началом. В этих случаях, как правило, генетическое исследование осуществляется в рамках медико-генетического консультирования семей с выявленной отягощённостью. Однако при таком подходе некоторые носители оказываются упущенными в силу различных, в том числе объективных, причин: неполная пенетрантность, малый размер семей, недостаточное тщательный сбор и/или незнание семейного анамнеза.

К необходимым условиям проведения скрининга относятся: тяжесть клинического течения заболевания (частота инвалидизации и смертности), возможность проведения эффективной профилактики и лечения, доступность информативного теста [24].

К заболеваниям с аутосомно-доминантным типом наследования относятся наследственные формы рака молочной железы (РМЖ) и рака яичников (РЯ), обусловленные мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Наследственными являются от 5 до 10% случаев РМЖ и от 10 до 20% случаев РЯ [5, 7, 16, 20]. Заболеваемость РМЖ и РЯ в Российской Федерации составляет 54 315 и 12 843 новых больных (данные на 2009 г.) соответственно [4], таким образом, наследственными формами РМЖ и РЯ заболевает суммарно около 4000—8000 чел. в год.

Наследственные формы РМЖ и РЯ в 30—50% и 90—95% случаев соответственно обусловлены мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2* [14, 16]. Частота мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* в Европе в среднем составляет 1:800 — 1:1000 [8]. Исследований, посвящённых изучению частот встречаемости мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, в России осуществлено немного. Масштабную работу выполнили в г.Новосибирске, материалом служила ДНК 7920 здоровых человек, панель включала четыре мутации в гене *BRCA1*: 5382insC, 185delAG, 4153delA, 300T>G (Cys61Gly). В выборке обнаружены две мутации: 5382insC и 300T>G (Cys61Gly) с частотой 0,25% (1:400) и 0,05% (1:2000) соответственно [1]. Скрининг 400 здоровых женщин был проведён в Санкт-Петербурге, в спектр исследования входили несколько мутаций, ассоциированных с различными генетически-де-

терминированными заболеваниями, в том числе мажорная мутация в гене *BRCA1* — 5382insC, однако в этой выборке она не была зарегистрирована [11]. В спектре мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, характерных для российской популяции, преобладают повторяющиеся мутации в гене *BRCA1* (до 80% от всех) как проявление эффекта основателя [14]. Согласно целому ряду исследований, преобладающей в России является мутация 5382insC в гене *BRCA1*, она составляет около 70% всех мутаций в гене *BRCA1* при РМЖ и около 60% при РЯ [7, 9, 10, 13, 18, 22]. В гене *BRCA1* часто встречаются мутации 4153delA, 300T>G (Cys61Gly), 185delAG [2, 7, 9, 10, 12]. В нескольких российских исследованиях также выявлены мутации 2080delA, 3819delGTAAA, 3875delGTCT в гене *BRCA1* и мутация 6174delT в гене *BRCA2* [2, 3, 7, 10, 12]. Существование эффекта основателя значительно упрощает генетическое тестирование и, тем самым, даёт возможность внедрять масштабные скрининговые программы.

Служба крови является хорошей платформой для проведения скрининговых исследований: уже создана база данных, не требуются дополнительные процедуры для взятия биоматериала (цельной периферической крови). В группу исследования войдут здоровые люди, которым при наличии клинически значимых генетических маркёров могут быть проведены мероприятия с целью профилактики и ранней диагностики различных заболеваний, в том числе онкологических, аутоиммунных, болезней сердечно-сосудистой системы и системы крови. Проведение генетического тестирования может служить дополнительным фактором усиления мотивации доноров кроводачи.

В задачи нашего исследования входили оценка возможности проведения генетического скрининга с целью выявления наследственной предрасположенности к РМЖ и/или РЯ на базе организаций службы крови и выявление его потенциальных проблем.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 1000 добровольных безвозмездных доноров первичной кроводачи, что обеспечивает случайность выборки. Сбор материала был проведён в отделении трансфузиологии Российского научного центра хирургии им. акад. Б.В. Петровского РАМН с марта по октябрь 2012 г. Население Российской Федерации характеризуется выраженной этнической гетерогенностью, что необходимо учитывать при проведении популяционных исследований. Критериями включения доноров первичной кроводачи в выборку служили этническая принадлежность (идентифицирующие себя как русские) и постоянное проживание на территории Российской Федерации. Таким образом, исследованная случайная выборка является репрезентативной по этническому составу для этой части российской популяции. Средний возраст доноров составил 35,4 года

(от 18 до 66 лет). В половом составе преобладали мужчины (60,5%), соотношение отличается от популяционного, но этот фактор не оказывает влияния на значения частот аутомомных генетических маркёров.

Все участники дали письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Взятие цельной периферической крови в объёме 10 мл производилось одномоментно с донорской кроводачей. Одновременно заполнялась анкета, содержащая сведения об участнике исследования (ФИО, пол, дата и место рождения, место проживания, национальность, известные заболевания), его родителях (место рождения, национальность, известные заболевания) и других родственниках.

Для выделения ДНК из 10 мл цельной периферической крови использовали метод высаливания [19].

Генотипирование проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием комплекта «ОнкоГенетика BRCA» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции производителя и амплификатора детектирующего ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Комплект «ОнкоГенетика BRCA» включает в себя восемь мутаций в генах *BRCA1* (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G (Cys61Gly), 2080delA) и *BRCA2* (6174delT). Работа тест-систем основана на модифицированном методе «примыкающих проб» (kissing probes) [6]. Анализ кривых плавления проводили при помощи программного обеспечения к детектирующему амплификатору ДТпрайм.

При обнаружении мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у доноров первичной кроводачи при их согласии информировали родственников с их последующим генетическим тестированием.

Результаты

При обследовании 1000 доноров первичной кроводачи с использованием комплекта «ОнкоГенетика BRCA» было обнаружено 3 носителя мутаций в гене *BRCA1*. В двух случаях детектирована мутация 5382insC (частота в выборке 0,20%, или 1:500), в одном — мутация 3819delGTAAA (частота в выборке 0,10%, или 1:1000).

При выявлении мутации в гене *BRCA1* или *BRCA2*, учитывая аутомомно-доминантный тип наследования с 50%-ной вероятностью передачи, показано проведение генетического тестирования совершеннолетних родственников I степени родства (родители, дети, родные братья и сестры) и, в зависимости от его результатов, других членов семьи. В силу невозможности генотипирования всех родственников I степени родства (отказ от тестирования, недоступность биологического материала) в одном случае было проведено генетическое обследование более дальней родственницы, изъявившей желание пройти тестирование.

Генетическое тестирование обоснованно как у женщин, так и у мужчин, в связи с высокой вероятностью развития в течение жизни злокачественных новообразований различных локализаций (РМЖ, РЯ, рака тела матки у женщин, рака предстательной железы и РМЖ у мужчин, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака ободочной кишки, меланомы) при наличии мутации в гене *BRCA1* или *BRCA2* [17, 23].

Стратегия дальнейшего обследования во всех случаях включала повторный вызов донора, повторное взятие биологического материала и подтверждение носительства мутации (подтверждено во всех трех случаях), сообщение донору результата генотипирования, более подробный опрос с целью выявления случаев онкологических заболеваний в семье, при согласии донора — приглашение для генетического тестирования его родственников I степени родства и других членов семьи. Установленным носителям мутаций в гене *BRCA1* была рекомендована консультация медицинского генетика для определения программы динамического наблюдения с целью ранней диагностики злокачественных новообразований различных локализаций.

Описание всех трёх случаев приведено ниже.

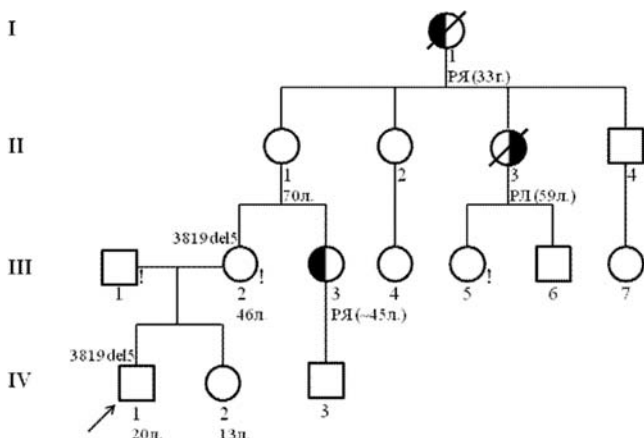


Рис. 1. Родословная семьи донора И.: РЯ — рак яичников; РЛ — рак лёгкого; ! — проведено генотипирование

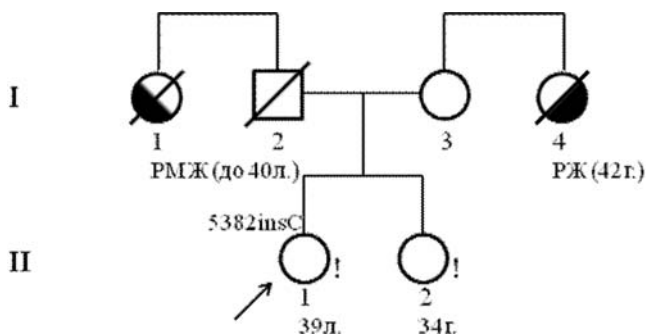


Рис. 2. Родословная семьи донора К.: РМЖ — рак молочной железы; РЖ — рак желудка; ! — проведено генотипирование

Случай №1. Семья донора И.

Родословная семьи донора И. приведена на рис. 1. У донора И. (IV.1, мужчина, 20 лет, здоров) была обнаружена мутация 3819delGTA в гене *BRCA1*. При первичном заполнении анкеты случаев онкологических заболеваний в семье не отмечалось. Для обследования были приглашены родители донора И. (здоровы). При опросе мать донора И. (III.2, 46 лет) сообщила о двух случаях рака яичников (I.1, III.3) и одном случае рака лёгкого (II.3) в семье по материнской линии. У матери донора И. (III.2) также была обнаружена мутация 3819delGTA в гене *BRCA1*.

Случай №2. Семья донора К.

Родословная семьи донора К. приведена на рис. 2. У донора К. (II.1, женщина, 39 лет, здорова) была обнаружена мутация 5382insC в гене *BRCA1*. При первичном заполнении анкеты случаев онкологических заболеваний в семье не отмечалось. Донор К. была вызвана повторно, при тщательном опросе были выявлены два случая онкологических заболеваний в семье (I.1, РМЖ; I.4, рак желудка) в молодом возрасте. Было проведено генетическое тестирование сестры донора К. (II.2, 34 года, здорова), у неё мутация 5382insC в гене *BRCA1* отсутствовала. Другие родственники не были обследованы в силу различных причин (смерть, нежелание или невозможность информировать).

Случай №3. Семья донора Т.

У донора Т. (мужчина, 23 года) была обнаружена мутация 5382insC в гене *BRCA1*. При первичном заполнении анкеты случаев онкологических заболеваний в семье не отмечалось, более того, было отмечено, что живы родители отца и матери донора Т. (возраст старше 80 лет), за исключением деда по отцовской линии (погиб в ВОВ). Возможно, передача мутации происходила без явной манифестации (неполная пенетрантность, ранняя смерть), либо мутация возникла *de novo*. Контакт с семьей донора Т. не был установлен, генотипирование родственников не было проведено и проверить эти гипотезы не удалось.

Обсуждение

Технических сложностей при проведении генетического скрининга на базе организаций службы крови не отмечено.

Размер исследованной выборки (1000 чел.) не позволил нам установить частоты всех мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, включённых в панель для генотипирования. Закономерной можно считать относительно высокую частоту (0,20%, или 1:500) мажорной в российской популяции мутации 5382insC в гене *BRCA1*. Более редкие мутации, за исключением 3819delGTA в гене *BRCA1*, не были обнаружены. Частоты мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* в популяции, вероятно, несколько выше в силу

присутствия в ней больных-носителей мутаций, которые в исследованную выборку не вошли.

В нашем исследовании выявлено 3 носителя мутаций в гене *BRCA1*, ассоциированных с повышенным риском развития РМЖ и/или РЯ. Все 3 носителя при первичном заполнении анкеты не упомянули о случаях онкологических заболеваний в семье, в двух семьях (донора И. и донора К.) при подробном анализе родословных выявлена наследственная отягощённость по РМЖ или РЯ (несколько случаев в семье по одной линии, случаи развития онкологических заболеваний в молодом возрасте). Обнаружение конкретного генетического дефекта позволяет практически со 100%-ной точностью определить, входит ли каждый из членов такой семьи в группу высокого риска в отношении развития РМЖ и/или РЯ (хотя статистически вероятны и описаны случаи, когда в одной семье присутствуют две разные герминальные мутации [21]). Отрицательный результат тестирования позволяет снять обусловленную незнанием тревожность, которая может быть значительно выражена при отягощённом семейном анамнезе. Мы обследовали в общей сложности четырёх членов семей, у одного из них было подтверждено, у трёх — исключено носительство семейной мутации.

Скрининг наиболее эффективен при тотальном охвате контингента. Предварительное анкетирование не обладает достаточной информативностью в силу объективных и субъективных причин и не позволяет уверенно исключить возможность носительства генетических дефектов. При использовании анкетных данных об отягощённости семейного онкологического анамнеза как критерия для направления на генетическое обследование мы бы упустили все три обнаруженных нами случая. Этот результат свидетельствует не только о необходимости более тщательно проводить опрос (повторное анкетирование было более информативно), но и о недостаточной информированности населения, и об ошибочных представлениях. В частности, донор И. не помнил/не знал о смерти прабабушки от РЯ в 33 года, а донор К. была убеждена, что РМЖ наследуется только по материнской линии и не придавала значения тому факту, что родная сестра её отца умерла от РМЖ в возрасте до 40 лет. В любом случае, даже при самом тщательном подходе к анкетированию, оно может быть недостаточно информативно в силу объективных причин (малый размер семей, передача мутации преимущественно мужчинами).

Также отмечено негативное отношение к результатам генетического тестирования (недоверие, подозрительность), особенно в случаях, когда в семьях не было множественных случаев онкологических заболеваний (донор К., донор Т.). Напротив, в семье донора И., в которой наблюдалась очевидная онкологическая отягощённость, отношение к тестированию в целом было положительным.

Таким образом, выявлены проблемы на этапе анкетирования участников, при сообщении им результатов тестирования и дальнейших рекомендаций. Важное значение для эффективного скрининга имеют предварительное информирование о его целях и задачах с учётом этических и социальных аспектов и мотивация участников. Требуется популяризация знаний о наследственных, в том числе онкологических, заболеваниях среди населения; необходима пропаганда внимательного и активного отношения к своему здоровью.

Список литературы

1. Анисименко М.С. Распространенность мутаций, связанных с наследственными формами рака молочной железы, среди жителей г.Новосибирска // Материалы XIV Российского Онкологического Конгресса. — С. 82—84; 23—25 ноября 2010 г., Москва.
2. Батенева Е.И., Мешеряков А.А., Любченко Л.Н. и соавт. Частота одиннадцати мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* в неотобранной выборке больных раком молочной железы россиянок // Уральский медицинский журнал. — 2011. — 03 (81). — С. 69—73.
3. Грудина Н.А., Голубков В.И., Тихомирова О.С. и соавт. Преобладание широко распространенных мутаций в гене *BRCA1* у больных семейными формами рака молочной железы Санкт-Петербурга // Генетика. — 2005. — 41(3). — С. 405—410.
4. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2009 году // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. — 2011. — Т. 22, №3(85). — Прил. 1 Июль—сентябрь.
5. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая Онкология. — 2010. — 11(4). — С. 258—266.
6. Кофиади И.А., Ребриков Д.В. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой // Генетика. — 2006. — 42(1). — С. 22—32.
7. Любченко Л.Н. Наследственный рак молочной железы и/или яичников: ДНК-диагностика, индивидуальный прогноз, лечение и профилактика: Дисс. — М., 2009: РОНЦ им. Н.Н. Блохина (РАМН).
8. Минимальные клинические рекомендации Европейского Общества Медицинской Онкологии (ESMO) / Редакторы русского перевода: проф. С.А. Тюлядин, к.м.н. Д.А. Носов, проф. Н.И. Переводчикова. — М.: Издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2010. — 436 с.
9. Поспехова Н.И. Комплексный анализ наследственной формы рака молочной железы и/или рака яичников: молекулярно-генетические и фенотипические характеристики: Дисс. — М., 2011: РОНЦ им. Н.Н. Блохина (РАМН).
10. Федорова О.Е., Любченко Л.Н., Паяиди Ю.Г. и соавт. Использование биочипов при изучении распространенных мутаций в генах *BRCA1/2* и *CHEK2* у больных органоспецифическим раком яичников и первично-множественными злокачественными новообразованиями с поражением яичников (российская популяция) // Молекулярная биология. — 2007. — 41. — С. 37—42.
11. Цыбакова Н.Ю., Соколенко А.П., Ивлева А.Г., Суспицын Е.Н., Имянитов Е.Н. Анализ встречаемости повторяющихся мутаций в генах *BRCA1*, *CHEK2*, *NBS1*, *CFTR*, *PAN* и *CX26* у здоровых жителей Санкт-Петербурга // Трансфузиология. — 2011. — Т. 12. — С. 1330—1341.

12. Часовникова О.Б., Митрофанов Д.В., Демченко Д.О., Сидоров С.В., Францкевич О.З., Коваленко С.П. *BRCA1* и *BRCA2* мутации у больных раком молочной железы в сибирском регионе // Сибирский онкологический журнал. — 2010. — 5. — С. 32–35.
13. Шубин В.П., Карпухин А.В. Молекулярная генетика наследственной предрасположенности к раку яичников // Медицинская генетика. — 2011. — Т. 10, №4. — С. 39–47.
14. Ferla R., Calo V., Cascio S. et al. Founder mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes // *Ann. Oncol.* — 2007. — 18 (Suppl. 6). — P. 93–98.
15. Iyevleva A.G., Suspitsin E.N., Kroeze K. et al. Non-founder *BRCA1* mutations in Russian breast cancer patients // *Cancer Lett.* — 2010. — 298. — P. 258–263.
16. Lalwani N., Prasad S.R., Vikram R. et al. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment // *Radiographics.* — 2011. — May–Jun. — 31(3). — P. 625–646.
17. Liede A., Karlan B.Y., Narod S.A. Cancer risks for male carriers of germline mutations in *BRCA1* or *BRCA2*: a review of the literature // *J. Clin. Oncol.* — 2004. — Feb. 15. — 22(4). — P. 735–742.
18. Loginova A.N., Pospekhova N.I., Lyubchenko L.N. et al. Spectrum of mutations in *BRCA1* gene in hereditary forms of breast and ovarian cancer in Russian families // *Bull. Exp. Biol. Med.* — 2003. — 136. — P. 276–278.
19. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // *Nucleic Acids Res.* — 1988. — Feb. 11. — 16(3). — P. 1215.
20. Newman B., Austin M.A., Lee M., King M.C. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1988. — May. — 85(9). — P. 3044–3048.
21. Sokolenko A.P., Voskresenskiy D.A., Iyevleva A.G., Bit-Sava E.M., Gutkina N.I., Anisimenko M.S., Yu Sherina N., Mitiushkina N.V., Ulibina Y.M., Yatsuk O.S., Zaitseva O.A., Suspitsin E.N., Togo A.V., Pospelov V.A., Kovalenko S.P., Semiglazov V.F., Imyanitov E.N. Large family with both parents affected by distinct *BRCA1* mutations: implications for genetic testing // *Hered. Cancer Clin. Pract.* — 2009. — Jan. 26. — 7(1). — P. 2.
22. Suspitsin E.N., Sherina N.Y., Ponomariova D.N. et al. High frequency of *BRCA1*, but not *CHEK2* or *NBS1 (NBN)*, founder mutations in Russian ovarian cancer patients // *Hered. Cancer Clin. Pract.* — 2009. — Feb. 25. — 7(1). — P. 5.
23. Thompson D., Easton D.F. Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer Incidence in *BRCA1* mutation carriers // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2002. — Sep. 18. — 94(18). — P. 1358–1365.
24. Wilson J.M.G., Jungner G. Principles and practice of screening for disease. WHO Chronicle Geneva: World Health Organization. — 22(11). — P. 473. Public Health Papers. — #34. — 1968.

Identification of *BRCA1* and *BRCA2* mutations — genetic screening availability on blood service basis

Bateneva E.I.^{1,4}, Maksimenko V.A.², Kadochnikova V.V.^{1,3}, Kofiadi I.A.^{1,3}, Trofimov D.Yu.¹, Ragimov A.A.², Alexeev L.P.³

¹ — DNA-Technology Ltd,

Moscow, 117587, Varshavskoye sh. 125 building 6, phone/fax +74959804555, e-mail: elena.bateneva@gmail.com

² — B.V. Petrovskiy Russian Research Center of Surgery of the Russian Medical Academy of Sciences, Moscow, 119991, Abrikosovskiy per. 2

³ — Federal State Budgetary Institution «National Research Center «Institute of Immunology» FMBA of Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye sh. 24 k.2

⁴ — Federal State Budgetary Institution «N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center» under the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478, Kashirskoye sh. 23

We aimed to define frequencies of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Russian blood donors and to evaluate availability and potential problems of genetic screening on blood service basis. We genotyped 1000 self-identifying as Russians blood donors and detected two *BRCA1* 5382insC (0,2%) and one *BRCA1* 3819delGTAAA (0,1%) mutation carriers. No technical difficulties were detected during carrying out genetic screening. Preliminary informing about screening's objective taking into account ethic and social aspects and participants motivation are required for its success.

Key words: *BRCA1*, *BRCA2*, Russian population, screening, blood service

Полиморфизм генетических маркёров *rs2245803* (Lys18Thr) и *rs1784423* (Val275Ala) гена *MMP20* у детей дошкольного возраста с различным уровнем кариеса

Волков А.Н.^{1,2}, Лошакова Л.Ю.³, Падюкова А.Д.^{1,2}

¹ — ГБОУ ВПО КемГМА Минздрава России, ЦНИЛ,

Кемерово, 650029, ул. Ворошилова, д. 22а, т./ф. (3842)734856

² — ФГБОУ ВПО КемГУ, кафедра генетики,

Кемерово, 650043, ул. Красная, 6, т. (3842)580166, ф. (3842)583885

³ — ГБОУ ВПО КемГМА Минздрава России, кафедра детской стоматологии,

Кемерово, 650029, ул. Ворошилова, д. 22а, т./ф. (3842)734856

Проведено стоматологическое обследование и генотипирование 202 детей в возрасте от 3 до 6 лет европеоидной этнической принадлежности. Изучалась прогностическая ценность полиморфизмов *rs2245803* (Lys18Thr) и *rs1784423* (Val275Ala) в гене *MMP20* как возможных генетических маркёров кариеса у детей дошкольного возраста. Были сформированы две когорты с контрастным значением изучаемого признака: лица, имеющие очень высокий уровень интенсивности кариеса, и индивидуумы со здоровыми зубами. Для идентификации аллелей использовали амплификацию соответствующих участков методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции с последующей детекцией продуктов методом электрофореза в агарозном геле. В исследуемой нами выборке не было установлено статистически значимого отличия частот отдельных генотипических и аллельных вариантов изучаемых сайтов между группами дошкольников г. Кемерово, благополучных и неблагополучных по кариесу зубов.

Ключевые слова: амелогенез, кариес, дети, *MMP20*

Введение

Матриксные металлопротеиназы (ММР) образуют семейство протеолитических ферментов, задействованных в процессах деструкции внеклеточного белкового скелета, что происходит при созревании и ремоделировании тканей. Из 28 известных членов семейства ММР выделяется ММР-20, или энамелизин, который обладает высокой специфичностью в отношении основного белка зубной эмали — амелогенина и обычно не обнаруживается в других тканях [8]. Как установлено, ММР-20 синтезируется амелобластами в процессе амелогенеза. При этом происходит деградация белковой матрицы поверхностных слоев эмали, усиление минерализации последней, что повышает её твердость и устойчивость к истиранию [4]. Очевидно, что от эффективности работы данного фермента во многом зависит резистентность зубов к повреждающим воздействиям, а врождённые дефекты, связанные с мутациями в гене *MMP20*, могут быть причиной развития ряда стоматологических заболеваний.

Наиболее ярким проявлением нарушения функции ММР-20 является несовершенный амелогенез (*amelogenesis imperfecta*, AI) — наследственное заболевание, которое характеризуется резким ухудшением состояния твёрдых тканей зуба. У человека идентифицирован ряд мутаций в гене *MMP20*, вызывающих AI: нуклеотидная

замена *IVS6-2A>T* в последовательности акцептора сплайсинга на 3'-конце интрона 6 [6], нонсенс- и миссенс-мутации, изменяющие первичную структуру белка: Trp34X, Thr130Ile, His204Arg, His226Gln, Ala304Thr [5, 7, 9, 10, 12].

Кариес зубов обычно сопутствует AI, но как самостоятельная нозология характеризуется гораздо большей, чем AI, распространённостью среди населения и не столь фатальными изменениями соответствующих тканей. Предполагается, что мутации в гене *MMP20* могут в той или иной степени повышать риск развития кариеса и являются лишь частью широкого спектра эндогенных и экзогенных причин этого мультифакториального заболевания. К настоящему времени данный вопрос изучен крайне слабо, проведены лишь единичные исследования роли генетического полиморфизма *MMP20* в развитии кариеса [11].

Учитывая изложенное, целью исследования стала оценка прогностической ценности однонуклеотидных полиморфизмов в двух ранее не изучавшихся участках *MMP20* как возможных генетических предикторов кариеса у детей дошкольного возраста. Для исследования были выбраны два полиморфных маркёра (*rs2245803* и *rs1784423*), локализованных в экзонных областях гена *MMP20* и связанных с аминокислотными заменами Lys18Thr и Val275Ala в зрелом белке ММР-20. При этом,

согласно данным <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>, встречаемость аллельных и генотипических вариантов обоих сайтов в различных популяциях человека достаточно высока, чтобы они могли служить кандидатами в маркёры такой распространённой патологии, как кариес зубов.

Материалы и методы

На первом этапе исследования осуществляли изучение стоматологического статуса ребёнка. Оно предполагало определение степени поражения временных зубов кариесом с помощью индекса КПУ (сумма кариозных, пломбированных и удалённых зубов временного прикуса, при этом удалённые в результате физиологической смены зубы не учитывались) с последующей оценкой индивидуального уровня интенсивности кариеса (УИК). УИК рассчитывали как частное от деления КПУ на возраст обследуемого в соответствии с методикой, предложенной П.А. Леусом [2]. Здоровые лица характеризуются величиной УИК, равной нулю. При значении показателя не более 0,4 индекс оценивали как низкий; в пределах 0,5—0,8 — средний; в пределах 0,9—1,2 — высокий и от 1,3 включительно — очень высокий [1].

Для анализа показательности выбранных генетических маркёров при установлении факторов повышенной чувствительности к кариесу были использованы только когорты обследованных с контрастными значениями изучаемого признака: лица со здоровыми зубами (I группа, 100 чел.) и индивидуумы, имеющие очень высокое значение УИК (II группа, 102 чел.). Возраст детей в каждой из двух выборок находился в пределах 3—6 лет. Средний возраст обследованных в группах I и II составил 4,2 и 3,9 года соответственно, соотношение полов в каждой из когорт было близко к 1:1, что делает правомерным их сопоставление в ходе последующего анализа. Обследованные имели европеоидную этническую принадлежность (главным образом, русские).

Молекулярно-генетическое исследование проведено в центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО КемГМА. Источником ДНК послужили буккальные соскобы, взятые у обследованных детей. Выделение ДНК осуществляли сорбентным методом с использованием комплекта реагентов производства

НПФ «Литех». В качестве сайтов, содержащих однонуклеотидные полиморфизмы, были выбраны маркёры *rs2245803* (Lys18Thr) и *rs1784423* (Val275Ala), расположенные в экзонных областях гена *MMP20*. Для идентификации полиморфизмов применяли амплификацию соответствующих участков методом аллельспецифической полимеразной цепной реакции с последующей детекцией ампликонов методом электрофореза в 3%-ном агарозном геле. В работе использованы тест-системы «SNP-экспресс», разработанные в НПФ «Литех» (Москва) (рисунок).

Статистическая обработка данных осуществлялась средствами программы Statistica 6.0. Для всех рассматриваемых групп проводили оценку соответствия эмпирических распределений частот генотипов ожидаемому согласно уравнению Харди—Вайнберга. Соотношения аллелей и генотипов в сравниваемых группах сопоставляли методом χ^2 для таблиц 2×2. Расчёт отношения шансов (*odds ratio*, *OR*) проводили по формуле:

$$OR = (a/b)/(c/d),$$

где:

a — количество детей II группы, имеющих изучаемый аллель или генотип;

b — количество детей II группы без данного аллеля или генотипа;

c — количество детей I группы, имеющих изучаемый аллель или генотип;

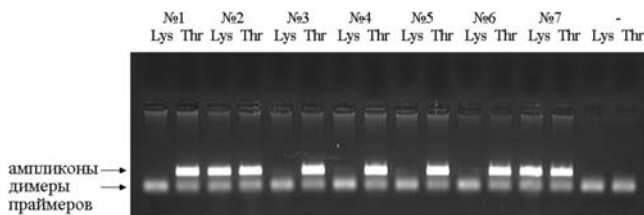
d — количество детей I группы без данного аллеля или генотипа.

Для каждого значения отношения шансов вычисляли 95%-ный доверительный интервал (95% CI) [3]. Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На начальном этапе исследования проведено изучение популяционно-генетических характеристик выбранных маркёров в гене *MMP20* для установления степени их полиморфности в рассматриваемой популяции жителей Юга Западной Сибири. Это позволит сделать заключение о целесообразности их дальнейшего использования при изучении генетических факторов предрасположенности к распространённым мультифакториальным заболеваниям.

При изучении характеристик маркёра *rs2245803* (Lys18Thr) в группе здоровых детей г.Кемерово выявлено, что частота минорного аллеля Lys составляет 0,35, а наиболее редкий генотип Lys/Lys имеет частоту 0,14 (табл. 1). Распределение генотипов соответствовало ожидаемому, согласно уравнению Харди—Вайнберга ($\chi^2 = 0,35$; $p = 0,84$). Сходные показатели были установлены в проведённых ранее исследованиях. Так, в международной базе dbSNP приводятся данные о выборке европеоидов с частотами аллеля Lys и генотипа Lys/Lys 0,388 и 0,143 соответственно (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>).



Электрофореграмма продуктов амплификации маркёра *rs2245803* при выявлении полиморфизма Lys18Thr методом «SNP-экспресс» НПФ «Литех» (№1, 3—6 — генотип Thr/Thr; 2, 7 — генотип Lys/Thr; «—» — отрицательный контрольный образец)

Частота минорного аллеля Ala маркера *rs1784423* (Val275Ala) в изученной выборке здоровых детей г.Кемерово составила 0,43, а связанный с данным вариантом генотип Ala/Ala встречался с частотой 0,18 (табл. 2). Эмпирические частоты генотипов достоверно не отличались от расчётных равновесных значений ($\chi^2 = 0,04$; $p = 0,98$). Анализ данных ранее цитированного web-источника показал, что в различных этнических группах населения Земли частота минорного аллеля *rs1784423* может существенно колебаться. Тем не менее, среди жителей или выходцев из Старого Света эта величина достаточно стабильна и близка к значению, установленному в нашем исследовании. В одной из наиболее объёмных выборок европеоидов частота аллеля Ala составила 0,429, а генотипа Ala/Ala — 0,195.

Таким образом, результаты предварительного популяционно-генетического анализа маркеров *rs2245803* и *rs1784423* позволяют заключить, что выбранные участки гена *MMP20* обладают выраженной полиморфностью, а все генотипические варианты достаточно хорошо представлены в рассматриваемой популяции европеоидов Юга Западной Сибири.

Для выяснения этиологического значения носительства различных аллелей и генотипов изучаемых генетических маркеров проводилось сравнение соответствующих частот в группах детей, благополучных по кариесу (I группа) и с очень высоким уровнем поражения зубов (II группа).

При сопоставлении частот генотипов и аллелей, связанных с полиморфизмом *rs2245803*, было выявлено, что между двумя группами обследованных имеется значительное сходство (табл. 1). Соотношение аллелей в двух выборках совпадало, а преобладающий вариант Thr встречался с частотой 0,65. В соответствии с этим, как среди здоровых обследованных, так и среди детей с очень высоким уровнем кариеса основным генотипом был Thr/Thr, его частота достоверно не различалась в двух группах ($\chi^2 = 0,11$; $p = 0,74$). Максимальное отличие частот генотипов наблюдалось при сравнении распространённости в двух группах обследованных варианта Lys/Thr. Но и в этом случае различие не достигало уровня статистической значимости ($\chi^2 = 0,61$; $p = 0,43$) при величине отношения шансов 0,7 (95% CI: 0,40—1,22).

В результате исследования полиморфизма *rs1784423* было выявлено существенное преобладание аллеля Val в обеих сравниваемых группах, его частота достигала 0,57 в I группе детей и 0,62 во II группе (табл. 2). При этом отличие не носило статистически значимого характера ($\chi^2 = 0,84$; $p = 0,36$) и не сопровождалось значительной величиной отношения шансов ($OR = 1,2$; 95% CI: 0,81—1,80). Преобладающим генотипом среди здоровых обследованных был Val/Ala, а в группе детей с очень высоким УИК гомозиготы Val/Val и гетерозиготы Val/Ala встречались с одинаковой частотой. Доля наиболее редкого генотипа Ala/Ala в двух сравниваемых группах составила 0,18. Некоторое по-

Таблица 1

Частоты генотипов и аллелей полиморфного маркера *rs2245803* (Lys18Thr) у обследованных детей с различным уровнем кариеса

Группа	Показатель	Генотип			Аллель	
		Lys/Lys	Lys/Thr	Thr/Thr	Lys	Thr
Здоровые (I группа, n = 96)	Частота	0,14	0,43	0,44	0,35	0,65
	Численность	13	41	42	67	125
С очень высоким УИК (II группа, n = 102)	Частота	0,17	0,37	0,46	0,35	0,65
	Численность	17	38	47	72	132
χ^2 (p)		0,38 (0,54) ^a	0,61 (0,43) ^b	0,11 (0,74) ^b	0 (0,9)	
Примечание. ^a — при сопоставлении генотипа Lys/Lys со всеми прочими генотипами; ^b — при сопоставлении генотипа Lys/Thr со всеми прочими генотипами; ^a — при сопоставлении генотипа Thr/Thr со всеми прочими генотипами						

Таблица 2

Частоты генотипов и аллелей полиморфного маркера *rs1784423* (Val275Ala) у обследованных детей с различным уровнем кариеса

Группа	Показатель	Генотип			Аллель	
		Val/Val	Val/Ala	Ala/Ala	Val	Ala
Здоровые (I группа, n = 100)	Частота	0,32	0,50	0,18	0,57	0,43
	Численность	32	50	18	114	86
С очень высоким УИК (II группа, n = 100)	Частота	0,41	0,41	0,18	0,62	0,39
	Численность	41	41	18	123	77
χ^2 (p)		1,75 (0,19) ^a	1,63 (0,20) ^b	0 (1) ^b	0,84 (0,36)	
Примечание. ^a — при сопоставлении генотипа Val/Val со всеми прочими генотипами; ^b — при сопоставлении генотипа Val/Ala со всеми прочими генотипами; ^b — при сопоставлении генотипа Ala/Ala со всеми прочими генотипами						

вышение встречаемости сочетания Val/Val в клинической группе могло бы считаться показателем повышенного риска развития кариеса ($OR = 1,5$; 95% CI: 0,83–2,64). Однако проверка гипотезы путём сопоставления распределений генотипов в этих группах выявило отсутствие статистически значимого различия показателя ($\chi^2 = 1,75$; $p = 0,19$).

Завершая обсуждение, следует отметить, что объёмы использованных в исследовании выборок, к сожалению, не позволяют провести анализ влияния сочетаний аллелей и генотипов маркёров *rs2245803* и *rs1784423* гена *MMP20* на предрасположенность к детскому кариесу. Выявленные закономерности имеют отношение к эффектам отдельно взятых мутаций «при прочих равных». Поэтому, на наш взгляд, было бы целесообразным в дальнейшем провести оценку этиологического значения комбинаций аллелей и генотипов указанных полиморфных участков *MMP20*, так как нельзя исключить эффект их взаимного усиления при формировании патологии.

Список литературы

1. Виноградова Т.Ф. Диспансеризация детей у стоматолога. — М.: Медицина, 1988. — 256 с.
2. Стоматологический уровень здоровья: рекомендации по методике определения / Под ред. П.А. Леус. — М., 1990. — 39 с.
3. Bland J.M., Altman D.G. Statistics notes: The odds ratio // *B.M.J.* — 2000. — Vol. 320. — P. 1468.
4. Chaussain-Miller C., Fioretti F., Goldberg M. et al. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries // *J. Dent. Res.* — 2006. — Vol. 85(1). — P. 22–32.
5. Gasse B., Karayigit E., Mathieu E. et al. Homozygous and compound heterozygous *MMP20* mutations in amelogenesis imperfecta // *J. Dent. Res.* — 2013. — Vol. 92(7). — P. 598–603.
6. Kim J.-W., Simmer J.P., Hart T.C. et al. *MMP-20* mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta // *J. Med. Genet.* — 2005. — Vol. 42. — P. 271–275.
7. Lee S.-K., Seymen F., Kang H.-Y. et al. *MMP20* hemopexin domain mutation in amelogenesis imperfecta // *J. Dent. Res.* — 2010. — Vol. 89(1). — P. 46–50.
8. Lynch C.C., Matrisian L.M. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication // *Differentiation.* — 2002. — Vol. 70. — P. 561–573.
9. Ozdemir D., Hart P.S., Ryu O.H. et al. *MMP20* active-site mutation in hypomaturation amelogenesis imperfecta // *J. Dent. Res.* — 2005. — Vol. 84(11). — P. 1031–1035.
10. Papagerakis P., Lin H.-K., Lee K.Y. et al. Premature stop codon in *MMP20* causing amelogenesis imperfecta // *J. Dent. Res.* — 2008. — Vol. 87(1). — P. 56–59.
11. Tannure P.N., Kuchler E.C., Lips A. et al. Genetic variation in *MMP20* contributes to higher caries experience // *J. Dent. Res.* — 2012. — Vol. 40(5). — P. 381–386.
12. Wang S.K., Hu Y., Simmer J.P. et al. Novel *KLK4* and *MMP20* mutations discovered by wholeexome sequencing // *J. Dent. Res.* — 2013. — Vol. 92(3). — P. 266–271.

Polymorphism of *rs2245803* (Lys18Thr) and *rs1784423* (Val275Ala) markers of the *MMP20* gene in preschool children with different severity of dental caries

Volkov A.N.^{1,2}, Loshakova L.J.³, Padukova A.D.^{1,2}

¹ — Kemerovo State Medical Academy, CSRL, Kemerovo, 650029, Voroshilova, 22a, (3842)734856

² — Kemerovo State University, chair of genetics, Kemerovo, 650043, Krasnaya, 6, (3842)580166, (3842)583885

³ — Kemerovo State Medical Academy, chair of pedodontics, Kemerovo, 650029, Voroshilova, 22a, (3842)734856

Dental examination and genotyping were performed in 202 caucasian children aged 3 to 6 years. Predictive value of single nucleotide polymorphisms *rs2245803* (Lys18Thr) and *rs1784423* (Val275Ala) at *MMP20* as possible markers of dental caries in preschool children was studied. Two cohorts with contrast values of the trait under investigation were formed: those with very high intensity of caries, and individuals with healthy teeth. The alleles were identified using amplification of relevant regions by allele-specific polymerase chain reaction with subsequent detection of the products by agarose gel electrophoresis. In the test sample of Kemerovo preschoolers affected by dental caries, no statistically significant difference in the frequencies of genotypic and allelic variants of the sites under investigation has been revealed as compared to healthy controls.

Key words: amelogenesis, caries, children, *MMP20*

Хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови у больных раком лёгкого, проживающих в Кемеровской области

Баканова М.Л.¹, Минина В.И.^{1,2}, Савченко Я.А.¹, Рыжкова А.В.¹,
Головина Т.А.^{1,2}, Титов В.А.³, Вержбицкая Н.Е.⁴, Вафин И.А.⁵, Рагожина С.Е.⁵

1 — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии человека СО РАН, 650065, г. Кемерово, просп. Ленинградский, 10, тел./факс (384-2)575079, e-mail: mari-bakano@ya.ru

2 — ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, ул. Красная, 6

3 — Областной клинический онкологический диспансер, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35

4 — Кемеровское областное патолого-анатомическое бюро, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35

5 — ГКУЗ КО Кемеровский областной центр крови, 650000, г. Кемерово, просп. Октябрьский, 22а, к7

Представлены исследования хромосомных aberrаций у больных раком лёгкого (РЛ), проживающих в Кемеровской области. Материалом для исследования послужила цельная периферическая кровь. Выявлено статистически значимое повышение частоты aberrантных метафаз у больных РЛ по сравнению со здоровыми донорами из группы сравнения. При исследовании спектра хромосомных нарушений найдены различия между больными РЛ и группой сравнения для всех aberrаций хроматидного и хромосомного типов, за исключением дицентриков с парными фрагментами.

Ключевые слова: рак лёгкого, цитогенетика, хромосомные aberrации

Введение

РЛ — это широко распространённая форма злокачественных новообразований и одна из важнейших медицинских и социально-экономических проблем. Большое число больных, выявленных на III и IV стадиях заболевания, и низкая пятилетняя выживаемость после лечения свидетельствуют о важности прогностических методов выявления предрасположенности к РЛ. Известно, что риск РЛ существенно возрастает при воздействии канцерогенных веществ, поступающих в организм человека из окружающей среды. Ввиду высокой концентрации предприятий угледобывающего и перерабатывающего комплекса на территории Кемеровской области представляется актуальным исследование больных РЛ, проживающих в данном регионе.

Частота спонтанных хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах периферической крови человека — одна из наиболее частых форм генетических аномалий, вызванных мутагенным воздействием факторов окружающей среды [2]. Увеличение частоты ХА связывается с действием многих неорганических и органических веществ, составляющих промышленные выбросы [145]. В исследованиях, проведённых в Северной Европе [11], Италии [6], Чехии [17], Тайване [15], США [12], было показано, что повышение частоты ХА у здоровых лиц отражает повышенный риск возникновения новообразований. Однако мало известно об особенностях хромосомного мутагенеза в нетрансформированных клетках онкологических больных. Поэтому *целью исследования* стал анализ уровня ХА у больных РЛ Кемеровской области.

Материалы и методы

Проведённое исследование выполняли в соответствии с этическим стандартом, разработанным в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утверждёнными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. №266.

Было обследовано 338 европеоидов, проживающих в Кемеровской области (табл. 1). В изученные группы вошли 302 мужчины и 36 женщин в возрасте от 25 до 76 лет. Цитогенетический анализ проводился в двух группах. К первой группе было отнесено 159 чел., поступивших на лечение в Кемеровский областной клинический онкологический диспансер. До забора крови для цитогенетического исследования больные не получали химиотерапевтического или радиологического лечения. Последующие диагностические процедуры, проводившиеся в условиях онкологического диспансера, позволили установить, что обследуемые доноры были на разных стадиях заболевания (28,6% — на первой стадии, 15,1% — на второй, 33,3% — на третьей, 23,0% — на четвёртой), с различным патоморфологическим диагнозом (62,2% — плоскоклеточный РЛ, 18,5% — аденокарцинома, 11,2% — крупноклеточный РЛ, 8,1% — мелкоклеточный РЛ). У 24,0% имелись метастазы.

Группа сравнения — 179 доноров Кемеровского областного центра крови (средний возраст 48,7 года), которые к моменту сбора материала были здоровы, не

имели хронических заболеваний, не принимали лекарственных препаратов и в течение 3 мес. до начала исследования не подвергались рентгенологическим обследованиям (табл. 1).

Все обследованные доноры заполняли подробную анкету, в которой указывали пол, возраст, национальность, место проживания, семейный анамнез, вредные привычки в различных градациях (курение, алкоголь), а также подписывали форму информированного согласия на участие в исследовании.

Материалом для исследования послужила цельная периферическая кровь, забиравшаяся из локтевой вены в асептических условиях. Кровь транспортировалась в цитогенетическую лабораторию Института экологии человека СО РАН, где подвергалась всем процедурам культивирования, фиксации, расщепления и цитогенетического анализа.

Культивирование клеток крови осуществляли по стандартному полумикрометоду [13]. В среднем для каждого индивида анализировали по 250 метафаз (200–1000 клеток). Регистрировали аберрации хромосомного и хроматидного типов. Пробелы в анализ не включали. Уровень ХА определяли путём подсчёта частоты метафаз с аберрациями хромосом (в процентах от изученного числа клеток). Учёт ХА на зашифрованных препаратах проводили без кариотипирования. Отбор метафаз, включаемых в анализ, и критерии для регистрации цитогенетических нарушений соответствовали общепринятым рекомендациям [7].

Статистическую обработку осуществляли средствами программы Stat Soft Statistica 6.0. Для основных показателей рассчитывали средние значения, их стандартные ошибки, минимум и максимум. Распределение всех изучаемых цитогенетических параметров отличалось от нормального. На основании этого в дальнейшем для сравнения групп использовали непараметрический ран-

говый U-тест Манна–Уитни. Проверка случайности различий частоты встречаемости отдельных градаций (есть или нет ХА; повышенная частота ХА) проводилась при помощи критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность вариации. Нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате проведённого исследования было зафиксировано, что средняя частота метафаз с ХА у больных РЛ статистически значимо выше, чем в группе сравнения ($2,73 \pm 0,14\%$ против $1,19 \pm 0,07\%$; $p = 0,000001$). Учитывая тот факт, что в одной клетке может встречаться более одной ХА, было проведено также сравнение общего числа нарушений, приходящихся на 100 клеток. У больных РЛ их также было статистически значимо больше, чем у здоровых ($2,82 \pm 0,17\%$ против $1,22 \pm 0,07\%$; $p = 0,000001$).

Эти результаты хорошо согласуются с немногочисленными данными литературы относительно темпов хромосомного мутагенеза в нетрансформированных клетках онкологических больных. Так, например, у онкобольных жителей Чешской республики было отмечено, что частота ХА составляет $2,53 \pm 1,69\%$, что значимо выше, чем в группе сравнения $1,94 \pm 1,47\%$ [17]. Отмечено статистически значимое повышение частоты стабильных ХА, выявляемых методом FISH в лимфоцитах крови у больных РЛ (европеиды США) [12]. В Тайване выявлено статистически значимое отличие онкобольных от здоровых по уровню аберраций хромосомного типа ($2,6 \pm 1,7\%$ против $0,9 \pm 1,0\%$; $p < 0,001$) [15].

В нашем исследовании у 45% обследованных больных РЛ, уровень ХА был выше среднего значения (2,73%) и составил 4,26%. Частота встречаемости повы-

Таблица 1

Характеристика обследованных групп

Характеристики групп	Больные раком лёгкого	Группа сравнения
Всего обследовано (n)	159	179
Мужчины	140	162
Женщины	19	17
Статус курения		
Курят (n)	131	87
Не курят (n)	28	89
Употребление алкоголя		
Не употребляет (n)	45	14
Часто (n)	2	0
Эпизодически (n)	42	23
Очень редко (n)	57	106
Нет данных (n)	13	36
Возраст, среднее значение, лет	59,9	48,7

шенного уровня ХА среди больных РЛ была в 3 раза выше, чем в контрольной группе ($\chi^2 = 66,50$; $p = 0,0001$). Совсем не имели хромосомных нарушений только 6,3% больных РЛ, тогда как среди здоровых их доля достигала 14% ($\chi^2 = 4,55$; $p = 0,0329$).

Ввиду того, что группа больных РЛ и группа сравнения различались по возрасту (РЛ — 59,9 года, а группа сравнения — 48,7 года), был произведён цитогенетический анализ групп, разделённых в соответствии с физиологической периодизацией онтогенеза [3] (табл. 3). В группе больных РЛ, хотя и наблюдалась тенденция к повышению уровня ХА с возрастом, статистически значимых различий в разных возрастных группах не было. При сравнении больных и здоровых различия наблюдались в группах зрелого возраста 2-го периода ($2,62 \pm 0,19\%$ против $1,20 \pm 0,08\%$; $p = 0,000001$) и в преклонного возраста ($2,84 \pm 0,22\%$ против $1,04 \pm 0,20\%$; $p = 0,000032$). Группу зрелого возраста 1-го периода со-

ставил 1 обследуемый из группы сравнения с уровнем ХА — 1,5%. Группу старческого возраста составили 3 больных РЛ со средним уровнем ХА $2,89 \pm 0,56\%$. Поэтому оценить различия в данных возрастных группах не представлялось возможным.

У обследованных больных РЛ после проведения диагностических процедур были определены: гистологический тип опухоли, стадия заболевания, наличие метастазов. При сравнении здоровых с больными РЛ, дифференцированными по патоморфологическому диагнозу, наблюдались статистически значимые отличия для групп больных плоскоклеточным, крупноклеточным РЛ и аденокарциномой (рисунок). Частота ХА в этих группах была статистически значимо выше, чем у здоровых. В то же время повышение уровня повреждений хромосом у больных мелкоклеточным раком (по сравнению со здоровыми) было статистически не значимо. Возможно, это связано с тем, что в нашем исследовании мелкокле-

Таблица 2

Частота встречаемости отдельных типов хромосомных нарушений у больных РЛ и в группе сравнения

Типы хромосомных нарушений	Больные РЛ				Группа сравнения				p
	Среднее значение	Минимум	Максимум	Стандартная ошибка	Среднее значение	Минимум	Максимум	Стандартная ошибка	
Частота метафаз с ХА	2,73	0,00	12,00	0,14	1,19	0,00	5,00	0,07	0,000001
Частота ХА на 100 клеток	2,82	0,00	19,50	0,17	1,22	0,00	5,50	0,07	0,000001
Одиночные фрагменты	1,84	0,00	7,00	0,16	0,86	0,00	5,50	0,06	0,000001
Хроматидные обмены	0,04	0,000	0,80	0,01	0,002	0,000	0,300	0,002	0,000118
Всего аберраций хроматидного типа	1,83	0,00	7,00	0,12	1,84	0,00	5,50	0,06	0,000001
Парные фрагменты	0,62	0,00	10,50	0,08	0,30	0,00	2,00	0,03	0,000145
Дицентрики с парными фрагментами	0,03	0,00	1,00	0,01	0,02	0,00	1,00	0,01	0,099933
Дицентрики без парных фрагментов	0,16	0,00	3,50	0,03	0,03	0,00	1,00	0,01	0,000001
Кольцевые хромосомы	0,06	0,00	2,00	0,02	0,01	0,00	1,00	0,01	0,004551
Транслокации	0,07	0,07	4,00	0,03	0,003	0,000	0,500	0,003	0,000003
Хромосомные обмены	0,27	0,00	5,00	0,05	0,07	0,00	1,50	0,02	0,000001
Всего аберраций хромосомного типа	0,92	0,00	15,5	0,12	0,36	0,00	3,50	0,04	0,000001

Примечание. **Жирным шрифтом** выделены p, рассчитанные для статистически значимо различающихся групп

Таблица 3

Цитогенетический анализ групп, разделённых в соответствии с физиологической периодизацией онтогенеза, по [3]

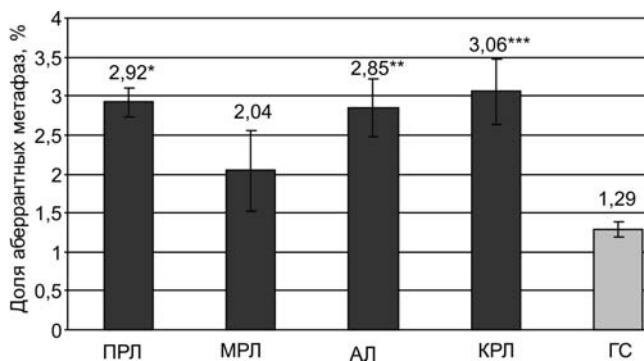
Возрастная группа	N	Уровень ХА у больных РЛ (%)	N	Уровень ХА у ГС (%)
Зрелый возраст (1-й период), мужчины 24–35 лет, женщины 22–35 лет	0	—	1	1,50
Зрелый возраст (2-й период), мужчины 36–60 лет, женщины 36–55 лет	80	$2,62 \pm 0,19^*$	163	$1,20 \pm 0,08$
Преклонный возраст, мужчины 61–74 года, женщины 56–74 года	76	$2,84 \pm 0,22^{**}$	15	$1,04 \pm 0,20$
Старческий возраст, 75–90 лет	3	$2,89 \pm 0,56$	0	—

Примечание. N — число наблюдений; * — $p = 0,000001$; ** — $p = 0,000032$; статистически значимое отличие больных от группы сравнения

точный рак является самой малочисленной формой, встречающейся среди больных РЛ (8,1%). Между отдельными формами РЛ различий уровня ХА выявлено не было. Наблюдалась тенденция к повышению уровня ХА при возрастании стадии, на которой было выявлено заболевание. Так, у больных с I стадией РЛ уровень ХА был 2,55%, со II стадией — 2,71%, с III стадией — 2,76%, а с IV стадией — 3,30%. Однако данные различия не достигали статистической значимости. Частота ХА у больных, имеющих метастазы ($2,30 \pm 0,33\%$), практически не отличалась от больных РЛ без метастазов ($2,59 \pm 0,17\%$).

Частота встречаемости отдельных типов ХА рассчитывалась как отношение числа aberrаций определённого типа к числу проанализированных метафаз. Было установлено (табл. 2), что у больных была больше, чем в группе сравнения, частота aberrаций хроматидного типа ($1,83 \pm 0,12\%$ против $0,84 \pm 0,06\%$; $p = 0,000001$). При этом чаще встречались и одиночные фрагменты и хроматидные обмены. Известно, что эта категория aberrаций возникает под действием химических кластогенов, ультрафиолетового излучения, алкилирующих агентов [4]. Частота aberrаций хромосомного типа в сравниваемых группах также имела статистически значимые отличия для всех типов, кроме дицентриков с парными фрагментами. Известно, что образование aberrаций хромосомного типа происходит обычно под действием ионизирующего излучения и химических веществ, повышающих радиочувствительность [16].

На следующем этапе исследования мы анализировали частоту ХА отдельно у мужчин и женщин. Статистически значимые различия между больными РЛ и группой сравнения были обнаружены как у мужчин ($2,85 \pm 0,16\%$ против $1,20 \pm 0,07\%$; $p = 0,000001$), так и



Уровень метафаз с aberrациями у обследованных:

ПРЛ — плоскоклеточный рак лёгкого; МРЛ — мелкоклеточный рак лёгкого; АЛ — аденокарцинома лёгкого; КРЛ — крупноклеточный рак лёгкого; ГС — группа сравнения; * — $p = 0,000001$; ** — $p = 0,000002$; *** — $p = 0,000033$; статистически значимое отличие больных от группы сравнения. ПРЛ — плоскоклеточный РЛ; МРЛ — мелкоклеточный РЛ; АЛ — аденокарцинома лёгкого; КРЛ — крупноклеточный РЛ; ГС — группа сравнения (здоровые лица).

у женщин ($1,90 \pm 0,26\%$ против $1,17 \pm 0,25\%$; $p = 0,024335$). Сопоставление цитогенетических параметров между полами внутри группы РЛ выявило различия между мужчинами и женщинами в группе больных РЛ ($2,85 \pm 0,16\%$ против $1,90 \pm 0,26\%$; $p = 0,028887$), но не в группе здоровых ($1,20 \pm 0,07\%$ против $1,17 \pm 0,25\%$; $p = 0,787131$).

Большинство авторов не находит различия между мужчинами и женщинами по цитогенетическим показателям [2, 5]. Выявленное нами преобладание ХА у больных РЛ мужчин может свидетельствовать о наличии у мужчин неких дополнительных модифицирующих факторов спонтанного мутагенеза, возможно, таких, как курение или алкоголь. Так, например, доля курящих в группе мужчин — 90,6%, тогда как среди женщин — всего 26%.

При анализе влияния курения на уровень ХА в группе больных были получены различия на грани статистической достоверности по частоте метафаз с ХА ($2,85 \pm 0,16\%$ — у курящих и $2,15 \pm 0,28\%$ — у некурящих, $p = 0,053007$), а также выявлено статистически значимое различие уровня aberrаций хромосомного типа между курящими и некурящими больными РЛ ($1,94 \pm 0,12\%$ против $1,24 \pm 0,21\%$; $p = 0,014$). При сопоставлении группы курящих больных РЛ по стажу курения выявлены статистически значимые различия уровня ХА между курящими до 20 лет и курящими 40 лет и более ($1,47 \pm 0,38\%$ против $3,21 \pm 0,25\%$; $p = 0,025$), между курящими 20—39 лет и курящими 40 лет и более ($2,56 \pm 0,21\%$ против $3,21 \pm 0,25\%$; $p = 0,048$). Курение указывается в ряде работ как фактор, способный модифицировать уровень спонтанных цитогенетических нарушений [8—10].

При анализе влияния потребления алкоголя использовали 4 градации: не употреблял, очень редко, эпизодически, часто. Наибольшая частота ХА была выявлена у больных РЛ, часто употребляющих алкоголь ($3,61 \pm 0,21\%$).

В результате проведённого исследования установлено накопление повреждений хромосом разных типов в лимфоцитах периферической крови больных РЛ, что, по всей видимости, отражает высокую интенсивность мутационного процесса в организме, в целом. ХА являются маркерами биологических эффектов воздействия генотоксических канцерогенов окружающей среды. Нельзя исключать влияния на структурную целостность хромосом и эндогенных процессов, таких, например, как накопление токсических продуктов метаболизма ксенобиотиков, унаследованные особенности системы репарации повреждений ДНК и др.

Представляется перспективным изучение молекулярных основ индивидуальной чувствительности у больных РЛ. Наши пилотные исследования в этом направлении показали значимость вариантов SNP в генах системы репарации в формировании хромосомных нарушений у больных РЛ [1].

Список литературы

1. Баканова М.Л., Минина В.И., Савченко Я.А. и др. Ассоциации полиморфных вариантов генов репарации ДНК и хромосомных aberrаций у больных раком легкого // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2013. — №4. — С. 3—6.
2. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н., Катосова Л.Д. и др. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Генетика. — 2001. — Т. 37, №4. — С. 549—557.
3. Сапин М.Р., Брыксина З.Г. Анатомия и физиология детей и подростков. — М.: Академия, 2000. — 465 с.
4. Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans // Mutat. Res. — 2000. — Vol. 463. — I. 2. — P. 111—172.
5. Anderson D., Francis A.J., Coldbert P. et al. Chromosome aberrations (CA), sister-chromatid exchanges (SCE) and mitogen-induced blastogenesis in cultured peripheral lymphocytes from 48 control individuals sampled 8 times over 2 years // Mutat. Res. — 1991. — Vol. 250, №1—2. — P. 467—476.
6. Bonassi S., Abbondandolo A., Camurri L. et al. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study // Cancer Genet. Cytogenet. — 1995. — Vol. 79. — P. 133—135.
7. Bucton K.E., Evans H.J. Methods for the analysis of human chromosome aberrations. — WHO. Geneva, 1993. — 66 p.
8. Bukvic N., Gentile M., Susca F. et al. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study 16 centenarians // Mut. Res. — 2001. — Vol. 498. — P. 159—167.
9. Carbonell E., Peris F., Xamena N. et al. SCE analysis in human lymphocytes of a spanish control population // Mut. Res. — 1996. — Vol. 335. — P. 35—46.
10. Celi K.A., Akbas E. Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants // Ecotoxicol. Environ. Saf. — 2005. — Vol. 60, №1. — P. 106—112.
11. Hagmar L., Stromberg U., Bonassi S. et al. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts // Cancer Res. — 2004. — Vol. 64. — P. 2258—2263.
12. Harms C., Salama S.A., Sierra-Torres C.H. et al. Polymorphisms in DNA repair genes, chromosome aberrations, and lung cancer // Environ Mol. Mutagen. — 2004. — Vol. 44 (1). — P. 74—82.
13. Hungerford P.A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // Stain Techn. — 1965. — Vol. 40. — P. 333—338.
14. Lazutka J.R., Lekevicius R., Dedonyte V. et al. Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in Lithuanian populations: effects of occupational and environmental exposures // Mutat. Res. — 1999. — Vol. 445. — P. 225—239.
15. Liou S.H., Lung J.C., Chen Y.H. et al. Increased chromosome type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area // Cancer Res. — 1999. — Vol. 59. — P. 1481—1484.
16. Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations // Mutagenesis. — 2000. — Vol. 15. — P. 289—302.
17. Vodicka P., Polivkova Z., Sytarova S. et al. Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of newly diagnosed cancer patients and healthy controls // Carcinogenesis. — 2010. — Vol. 31. — P. 1238—1241.

Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes in lung cancer patients of Kemerovo region

Bakanova M.L.¹, Minina V.I.^{1,2}, Savchenko Y.A.¹, Ryzhkov A.V.¹, Golovina T.A.^{1,2}, Titov V.A.³, Vergbitskya N.E.⁴, Vafin I.A.⁵, Ragozhina S.E.⁵

¹ — Institute of Human Ecology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 650 065, Leningrad av., 10, Kemerovo, tel./fax (384 2) 57-50-79, e-mail: mari-bakano@ya.ru

² — Kemerovo state University, 650043, Kemerovo, Krasnaya street 6

³ — Regional clinical oncology hospital, Kemerovo, Volgogradskaya street, 35

⁴ — Pathologoanatomic bureaus, Kemerovo, Volgogradskaya street, 35

⁵ — Regional centre of blood, 650000, Kemerovo, Oktober av., 22a, building 7

The article presents a study of chromosomal aberration rates in lung cancer patients living in the Kemerovo region. The material under examination was peripheral blood. Statistically significant elevation of the frequencies of metaphases with chromosomal aberrations was revealed in lung cancer patients as compared to healthy donors from the reference group. The examination of spectrum of chromosomal aberrations showed the difference in rates between lung cancer patients and reference group for all chromating-type and chromosome-type aberrations except for dicentrics with paired fragments.

Key words: lung cancer, cytogenetics, chromosomal aberrations

Сравнительный анализ частоты врождённых пороков развития у новорождённых в сибирских популяциях

Минайчева Л.И.¹, Куровский А.В.², Назаренко Л.П.^{1,3}

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук; 634050, Россия, г.Томск, Набережная р. Ушайки, 10. Тел.: 8(3822) 53-56-81 Факс: 8(3822) 53-56-81; e-mail: valery.puzryev@medgenetics.ru

² — Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050, Россия, г.Томск, пр. Ленина, 36

³ — ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России», г.Томск, ул. Московский тракт, 2.

Проведён сравнительный анализ частоты врождённых пороков развития (ВПР) и их структуры у новорождённых в городских популяциях Томской области (г.Томск), Республики Алтай (г.Горно-Алтайск), Республики Хакасии (г.Абакан). Временной период наблюдения составил 16 лет (1986—2001 гг.). Показаны статистически значимые различия в структуре и частотах пороков развития в рассматриваемых популяциях, которые выявляются независимо от спектра учитываемых форм ВПР.

Ключевые слова: врождённые пороки развития, распространённость, мониторинг, сибирские популяции

Введение

ВПР широко распространены в популяции человека, составляя значительную часть генетического груза [5, 10]. В отчётном докладе Международного мониторинга ВПР отмечено, что каждый год в мире рождается 7,9 млн детей с ВПР (6% от всех родившихся детей) [27]. ВПР являются серьёзной медицинской и социальной проблемой, что обусловлено значительным вкладом в структуру младенческой и детской смертности [7], детской инвалидности [3, 16] и заболеваемости детей и взрослых [18, 29]. Изучение частоты ВПР и распространения их в разных территориальных группах важно как с практической, так и с научной точек зрения. Эпидемиологические исследования служат основой планирования медицинской помощи населению, данные о частоте и структуре ВПР в различных регионах необходимы для организации специализированной медицинской помощи. Изучение частоты и структуры пороков развития, полученные исследователями на разных территориях, демонстрирует значительную вариабельность оценок частот ВПР. Показатели частоты полного спектра в регионах Российской Федерации существенно различаются [1, 9, 12, 20]. Показаны различия и в структуре пороков развития по территориям [1, 2, 4, 6, 9, 15, 17].

Цель настоящего исследования — изучение и сравнительный анализ частоты ВПР и их структуры у новорождённых в городских популяциях Томской области (г.Томск), Республики Алтай (г.Горно-Алтайск), Республики Хакасии (г.Абакан).

Материалы и методы

Проведён сравнительный анализ частот ВПР у новорождённых в трёх городских популяциях Западной Сибири — г.Томск (Томская область), г.Абакан (Республи-

ка Хакасия) и г.Горно-Алтайск (Республика Алтай). Период наблюдения составил 16 лет (1986—2001 гг.). Структура материала, использованного в исследовании, представлена в табл. 1.

В работе использован эпидемиологический подход, который включал ретроспективный учёт ВПР по архивным материалам родовспомогательных учреждений («Истории развития новорождённых», форма №097/у, «Журналы отделения новорождённых», форма №102/у) и прозекторских служб («Протоколы патологоанатомических вскрытий», форма №013/у).

Учитывались все выявленные формы пороков развития (полный спектр ВПР) у живорождённых и мертворождённых, обнаруженные при патологоанатомическом исследовании. Все зарегистрированные нозологические формы были распределены по системам органов (табл. 2) [13].

Для выполнения задач исследования из всего массива данных были выделены определённые нозологические формы (21 форма ВПР), которые в настоящее время рекомендованы для эпидемиологического мониторинга и относятся к порокам развития обязательного учёта (в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения России от 10.09.1998 г. №268 «О мониторинге врождённых пороков развития у детей»).

Перечень этих нозологических форм ВПР представлен в табл. 3.

Методы математической статистики, использованные при обработке результатов исследования, включали в себя: вычисление описательных статистик, проверку статистической значимости различий между выборками по критерию Стьюдента [14] и дискриминантный анализ [21, 23].

Результаты

Частоты всех пороков развития и 21 формы ВПР у новорождённых детей в трёх городских популяциях Западной Сибири (города Томск, Абакан, Горно-Алтайск) представлены в табл. 2 и 3.

Суммарные частоты полного спектра ВПР в городах Томске и Абакане у новорождённых составляют

24,239 ± 1,373 и 27,231 ± 2,037 соответственно и отличаются от таковой в г.Горно-Алтайске — 17,650 ± 1,685 (p<0,01). При сравнении частот полного спектра ВПР у новорождённых в исследованных популяциях не выявлено статистически значимых различий по группам пороков развития центральной нервной, сердечно-сосудистой, дыхательной и костно-мышечной систем, последа и эн-

Таблица 1

Структура материала исследования (1986—2001 гг.)

Популяция	Число новорождённых	Число зарегистрированных ВПР	
		Полный спектр ВПР	21 форма ВПР
г.Томск	95 135	2277	891
г.Абакан	39 363	1049	329
г.Горно-Алтайск	20 405	371	117
Всего	154 903	3697	1337

Таблица 2

Частота пороков развития полного спектра (1:1000) у новорождённых в отдельных регионах Сибири (1986—2001 гг.)

№	Система органов	г.Томск	г.Абакан	г.Горно-Алтайск
1.	ЦНС и органы чувств	1,828 ± 0,143	2,289 ± 0,342	1,407 ± 0,267
2.	Пороки лица и шеи	2,564 ± 0,487	2,109 ± 0,542	0,962 ± 0,231 p ₃ <0,01
3.	Сердечно-сосудистая	3,874 ± 0,475	2,814 ± 0,402	3,862 ± 0,387
4.	Дыхательная	0,253 ± 0,045	0,518 ± 0,125	0,242 ± 0,120
5.	Органы пищеварения	1,063 ± 0,153 p ₁ <0,05	0,548 ± 0,112	1,031 ± 0,230
6.	Костно-мышечная	5,589 ± 0,529	7,062 ± 0,506	5,513 ± 1,222
7.	Мочевая	1,545 ± 0,197 p ₁ <0,01	3,070 ± 0,474 p ₂ <0,0001	0,679 ± 0,190 p ₃ <0,01
8.	Половые органы	1,585 ± 0,189 p ₁ <0,000001	4,312 ± 0,319 p ₂ <0,000001	1,260 ± 0,279
9.	Эндокринные железы	0,106 ± 0,056	0	0,236 ± 0,093
10.	Кожа и её придатки	0,949 ± 0,217	0,584 ± 0,236 p ₂ <0,05	0,043 ± 0,043 p ₃ <0,001
11.	Пороки последа	0,486 ± 0,156	0,226 ± 0,096	0,293 ± 0,128
12.	Прочие пороки	0,708 ± 0,154 p ₁ <0,01	0,196 ± 0,071	0,185 ± 0,084 p ₃ <0,01
13.	МВПР	2,080 ± 0,361	2,112 ± 0,490	0,985 ± 0,261 p ₃ <0,05
14.	Синдром Дауна	1,610 ± 0,154	1,390 ± 0,177	0,953 ± 0,204 p ₃ <0,05
Суммарная частота полного спектра ВПР		24,239 ± 1,373	27,231 ± 2,037 p ₂ <0,01	17,650 ± 1,685 p ₃ <0,01
Примечание p ₁ — уровень значимости p-значение различий между частотами ВПР у новорождённых детей в городах Томске и Абакане; p ₂ — уровень значимости p-значение различий между частотами ВПР у новорождённых детей в городах Абакане и Горно-Алтайске; p ₃ — уровень значимости p-значение различий между частотами ВПР у новорождённых детей в городах Горно-Алтайске и Томске				

докринных желёз (табл. 2). Среднее значение частоты пороков половых органов, зарегистрированных у новорождённых г.Абакана, более чем в 2 раза превышает аналогичные показатели у новорождённых городов Томска и

Горно-Алтайска ($p < 0,001$). Пороки развития кожи и её придатков у новорождённых г.Томска выявляются чаще, чем в остальных исследованных группах ($p < 0,001$). Для пороков развития мочевой системы показаны статистиче-

Таблица 3

Частота пороков развития обязательного учёта (1:1000) у новорождённых в отдельных регионах Сибири (1986—2001 гг.)

№	Нозологическая форма	г.Томск	г.Абакан	г.Горно-Алтайск
1.	Анэнцефалия	0,254 ± 0,068	0,133 ± 0,087	0,113 ± 0,079
2.	Спинномозговая грыжа	0,582 ± 0,086	0,678 ± 0,109	0,812 ± 0,209
3.	Энцефалоцеле	0,117 ± 0,048	0,050 ± 0,035	0,000 ± 0,000 $p_3 < 0,05$
4.	Врожденная гидроцефалия	0,724 ± 0,090	1,081 ± 0,252 $p_2 < 0,05$	0,334 ± 0,155 $p_3 < 0,05$
5.	Микротия (анотия)	0,094 ± 0,044	0,072 ± 0,056 $p_2 < 0,05$	0,366 ± 0,118 $p_3 < 0,05$
6.	Расщелина нёба	0,327 ± 0,045	0,549 ± 0,150	0,424 ± 0,160
7.	Расщелина губы и/или нёба	0,312 ± 0,046 $p_1 < 0,05$	0,676 ± 0,105 $p_2 < 0,0002$	0,118 ± 0,081 $p_3 < 0,05$
8.	Транспозиция крупных сосудов	0,169 ± 0,051	0,099 ± 0,045 $p_2 < 0,05$	0,000 ± 0,000 $p_3 < 0,01$
9.	Гипоплазия левого сердца	0,085 ± 0,032 $p_1 < 0,05$	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000 $p_3 < 0,05$
10.	Атрезия пищевода	0,235 ± 0,068	0,190 ± 0,066	0,217 ± 0,098
11.	Атрезия ануса	0,176 ± 0,065 $p_1 < 0,05$	0,027 ± 0,027	0,147 ± 0,081
12.	Агенезия или дисгенезия почек	0,328 ± 0,067 $p_1 < 0,001$	0,051 ± 0,035	0,224 ± 0,100
13.	Гипоспадия	1,248 ± 0,187 $p_1 < 0,01$	2,961 ± 0,473 $p_2 < 0,0001$	0,403 ± 0,184 $p_3 < 0,01$
14.	Эписпадия	0	0	0
15.	Экстрофия мочевого пузыря	0,007 ± 0,007	0,030 ± 0,030	0
16.	Редукционные пороки конечностей	0,158 ± 0,041	0,366 ± 0,117	0,339 ± 0,162
17.	Диафрагмальная грыжа	0,287 ± 0,047 $p_1 < 0,000001$	0,000 ± 0,000	0,043 ± 0,043 $p_3 < 0,001$
18.	Омфалоцеле	0,400 ± 0,094 $p_1 < 0,05$	0,137 ± 0,054	0,146 ± 0,080 $p_3 < 0,05$
19.	Гастрошизис	0,063 ± 0,030	0,089 ± 0,048	0,144 ± 0,079
20.	Синдром Дауна	1,610 ± 0,154	1,390 ± 0,177	0,953 ± 0,204 $p_3 < 0,05$
21.	Множественные ВПР	2,080 ± 0,361	2,112 ± 0,490	0,985 ± 0,261 $p_3 < 0,05$
Суммарная частота 21 формы ВПР		9,255 ± 0,561	8,579 ± 0,920 $p_2 < 0,05$	5,767 ± 0,752 $p_3 < 0,001$
Примечание. p_1 — уровень значимости p -значение различий между частотами ВПР у новорождённых детей в городах Томске и Абакане; p_2 — уровень значимости p -значение различий между частотами ВПР у новорождённых детей в городах Абакане и Горно-Алтайске; p_3 — уровень значимости p -значение различий между частотами ВПР у новорождённых детей в городах Горно-Алтайске и Томске				

ски значимые различия их частоты у новорождённых детей всех трёх исследуемых популяций (табл. 2).

В структуре ВПР между изученными территориальными группами наблюдаются различия, однако первое место у новорождённых детей всех этих регионов занимают пороки развития костно-мышечной системы (табл. 4). Несмотря на то, что в частотах пороков костно-мышечной системы не выявлено статистически значимых различий между исследуемыми популяциями, пороки развития этой группы являются наиболее часто встречающимися в каждой из изученных групп. Так, частоты пороков развития костно-мышечной системы варьируют в пределах 5—7‰ (табл. 2), что соответствует 20—30% от суммарной частоты полного спектра ВПР (табл. 4).

Из группы пороков развития обязательного учёта (табл. 3) для двух форм ВПР — расщелина губы и нёба и гипоспадия — зафиксированы статистически значимые различия в их частоте между всеми исследуемыми популяциями. При этом наибольшие значения частот этих ВПР установлены у новорождённых детей г.Абакана, а наименьшие — г.Горно-Алтайска. Частота регистрации синдрома Дауна и множественных ВПР в этой возрастной группе г.Горно-Алтайска также статистически значимо ниже, чем в городах Томске и Абакане. Для анэнцефалии, спинномозговой грыжи, атрезии пищевода, редукционных пороков конечностей и гастрошизиса не установлено статистически значимых различий их частоты в исследуемых группах. В целом, суммарные частоты 21 формы ВПР для городов Томска и Абакана выражаются почти одинаковыми значениями и примерно в 2 раза превышают суммарную частоту ВПР в популяции г.Горно-Алтайска (табл. 3).

Таким образом, анализ, проведённый методами параметрической статистики, позволил выявить статистически значимые различия в частотах отдельных ВПР между исследуемыми популяциями как при учёте полного спектра ВПР, так и при регистрации группы пороков обязательного учёта. Однако при этом остаётся не до конца изученным вопрос о персональном вкладе того или иного вида ВПР в интегральные показатели межпопуляционных различий. Кроме того, известно, что отдельные признаки, по которым не удаётся выявить статистически значимых отличий методами одномерной статистики (критерий Стьюдента, непараметрические критерий Вилкоксона — Манна — Уитни и др.), могут обнаруживать существенные отличия после процедуры так называемой линейной комбинации исходных признаков — основного приёма в области многомерной статистики [8]. С целью выявления таких латентных закономерностей, позволяющих сделать более глубокие выводы о различиях частот регистрации ВПР у новорождённых детей в исследуемых популяциях, был использован инструментарий дискриминантного анализа в пакете Statistica 7.0.

Одна из начальных операций дискриминантного анализа, как и многих других методов многомерного анализа данных, состоит в нахождении двух новых переменных, называемых каноническими. Эти новые переменные дают возможность наглядно увидеть сходство или различие между объектами, заданными точками в исходном пространстве признаков [8]. В настоящей работе под понятием «объект» подразумевается каждая из исследуемых популяций, а каждая точка на координатной плоскости — единичное значение частоты каждой группы (полный спектр ВПР) или формы ВПР

Таблица 4
Структура врождённых пороков развития (%) у новорождённых в отдельных регионах Сибири (1986—2001 гг.)

№	Система органов	г.Томск	г.Абакан	г.Горно-Алтайск
1.	ЦНС и органы чувств	7,54	8,41	7,97
2.	Пороки лица и шеи	10,58	7,74	5,45
3.	Сердечно-сосудистая	15,98	10,33	21,88
4.	Дыхательная	1,04	1,9	1,37
5.	Органы пищеварения	4,38	2,02	5,84
6.	Костно-мышечная	23,06	25,93	31,23
7.	Мочевая	6,37	11,27	3,85
8.	Половые органы	6,54	15,83	7,14
9.	Эндокринные железы	0,44	0	1,34
10.	Кожа и её придатки	3,92	2,15	0,24
11.	Пороки последа	2,01	0,83	1,66
12.	Прочие пороки	2,92	0,73	1,05
13.	МВПР	8,58	7,76	5,58
14.	Синдром Дауна	6,64	5,1	5,4
Всего		100	100	100

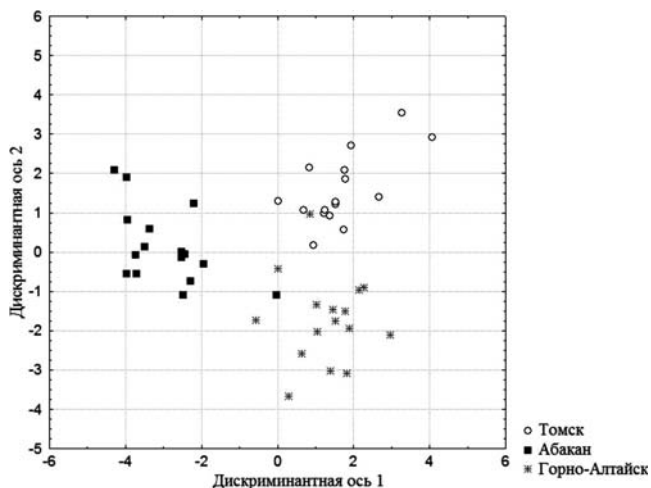


Рис. 1. Категоризованная диаграмма расположения частот ВПР полного спектра в трёх обследованных популяциях относительно дискриминантных осей

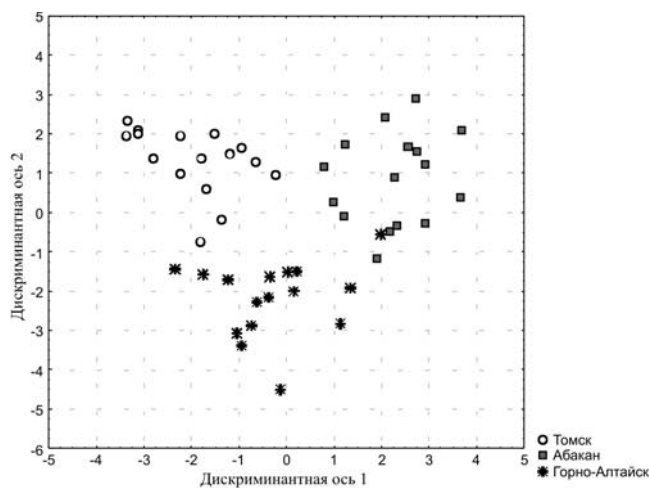


Рис. 2. Категоризованная диаграмма расположения частот 21 формы ВПР в трёх обследованных популяциях относительно дискриминантных осей

(21 форма). Найденные новые переменные обозначены как «Дискриминантная ось 1» и «Дискриминантная ось 2».

На рис. 1 и 2 в виде категоризованных диаграмм представлены все значения частот ВПР для полного спектра и 21 формы соответственно. Из графиков видно, что регистрация всех пороков развития, как и учёт определённых нозологических форм, позволяет выявить хорошо заметные различия между популяциями по частоте ВПР у новорождённых детей, так как пространства точек на диаграммах для разных городов практически не перекрываются друг с другом. Однако можно отметить, что визуально степень выраженности этих различий несколько больше для пороков развития обязательного учёта (21 форма ВПР). Количественно эта закономерность подтверждается значениями расстояния Махаланобиса — показателя, используемого в дискриминантном анализе для оценки удалённости одна от другой исследуемых совокупностей [8].

В табл. 5 представлены результаты вычислений данного показателя в ходе дискриминантного анализа.

Можно отметить, что по частотам полного спектра ВПР у новорождённых детей популяция г.Абакана располагается на одинаковом расстоянии от популяций городов Томска и Горно-Алтайска, степень удалённости которых один от другого в 2 раза меньше. Значения расстояний Махаланобиса, вычисленные для частот 21 формы ВПР, показали более равномерную удалённость всех трёх исследуемых популяций друг от друга (табл. 5).

В табл. 6 содержатся количественные показатели достоверности различий между частотами ВПР полного спектра и 21 формы у новорождённых детей в исследуемых популяциях, выявленных методом дискриминантного анализа.

Все уровни значимости р-значения близки к нулю, что подтверждает высокую статистическую значимость полученных результатов.

Для выяснения вопроса о величине вклада каждого исходного признака (группы или формы ВПР) в каждую из двух новых полученных переменных были вычислены так называемые стандартизированные коэффициенты канонических вариантов. На рис. 3 и 4 значения

Показатели удалённости друг от друга популяций по обнаруженным различиям в частотах ВПР у новорождённых (расстояние Махаланобиса)

Таблица 5

	Томск	Абакан	Горно-Алтайск
Полный спектр ВПР			
Томск	0,00	24,75	11,84
Абакан	24,75	0,00	22,72
Горно-Алтайск	11,84	22,72	0,00
21 форма ВПР			
Томск	0,00	19,27	16,09
Абакан	19,27	0,00	16,88
Горно-Алтайск	16,09	16,88	0,00

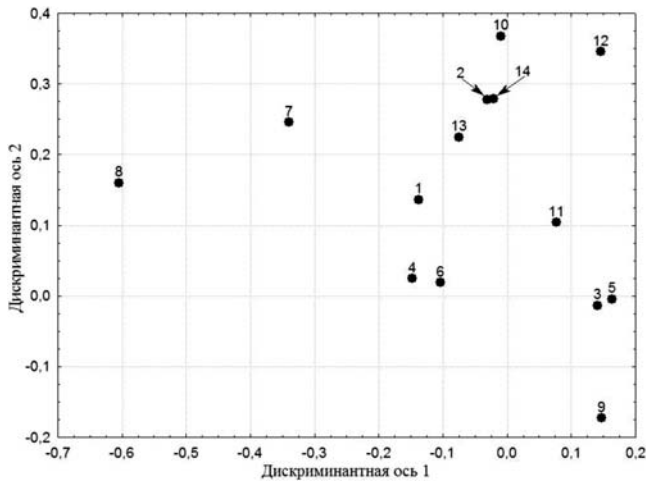


Рис. 3. Диаграмма рассеяния стандартизованных коэффициентов отдельных групп ВПР полного спектра относительно дискриминантных осей

стандартизованных коэффициентов представлены графически в виде точек на диаграмме рассеяния относительно дискриминантных осей. Из рис. 3 видно, что из всех групп полного спектра ВПР по дискриминантной оси 1 наибольший вклад в различия между исследуемыми группами вносят пороки развития половых органов (точка 8) и мочевой системы (точка 7). Пороки развития кожи и придатков (точка 10) и эндокринных желёз (точка 9) определяют значительную часть различий между исследуемыми популяциями по дискриминантной оси 2.

Следует отметить, что критерий Стьюдента не позволил обнаружить статистически значимых различий в частотах ВПР эндокринных желёз между исследуемыми популяциями.

Для пороков развития группы обязательного учёта (рис. 4) картина распределения значений стандартизованных коэффициентов относительно канонических осей более равномерная. Тем не менее, можно заметить, что три формы ВПР — гипоспадия (точка 13), диафрагмальная грыжа (точка 17) и расщелина губы и

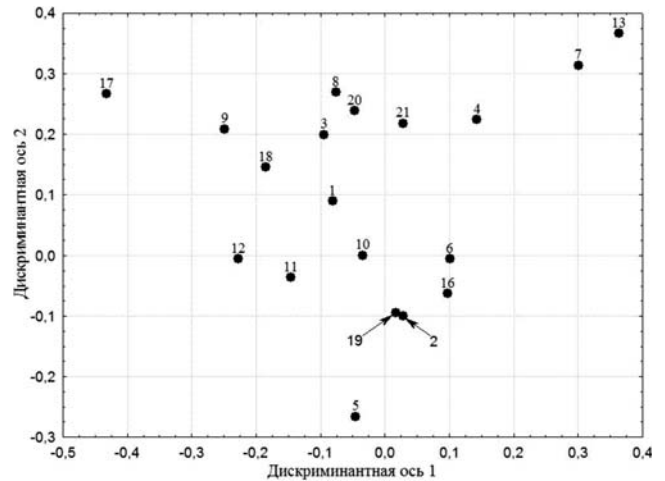


Рис. 4. Диаграмма рассеяния стандартизованных коэффициентов 21 формы ВПР относительно дискриминантных осей

нёба (точка 7) — вносят наиболее существенный вклад в различия между исследуемыми группами. Этот вклад характеризуется примерно одинаковыми значениями относительно обеих дискриминантных осей. Относительно дискриминантной оси 2 существенный вклад в различия между популяциями вносят транспозиция магистральных сосудов (точка 8) и микротия (анотия) (точка 5).

Таким образом, результаты дискриминантного анализа показали статистически значимые различия по частотам как полного спектра, так и 21 формы ВПР у новорождённых детей в исследуемых популяциях. Установлено, что по обобщённым показателям (каноническим переменным) частот полного спектра ВПР популяция г.Абакана является обособленной по отношению к популяциям Томска и Горно-Алтайска. При этом между популяциями Томска и Горно-Алтайска различия также являются достоверными. По частотам 21 формы ВПР все три исследуемые популяции различаются примерно в одинаковой степени; различия статистически значимы.

Таблица 6

Уровни значимости P-значения обнаруженных различий между популяциями по частотам ВПР у новорождённых

	Томск	Абакан	Горно-Алтайск
Полный спектр ВПР			
Томск		0,0000	0,0002
Абакан	0,0000		0,0000
Горно-Алтайск	0,0002	0,0000	
21 форма ВПР			
Томск		0,0002	0,0008
Абакан	0,0002		0,0005
Горно-Алтайск	0,0008	0,0005	

Обсуждение

Вариации оценок частот ВПР отмечаются во многих исследованиях, проводимых как отечественными, так зарубежными исследователями. Как показало настоящее исследование, среди новорождённых в разных регионах различия по частотам полного спектра ВПР являются более значительными между г.Горно-Алтайском (17,65%) и г.Абаканом (27,23%) (табл. 2, табл. 5). По опубликованным данным, оценки частот полного спектра ВПР варьируют от 15,3% в г.Воронеже и Ростовской области [1, 20] до 39,48% в г.Омске [2] и 43,6% в РСО-Алания [12].

В настоящем исследовании при оценке суммарной частоты пороков развития обязательного учёта (21 форма ВПР) у новорождённых показано, что по этому показателю популяции городов Томска и Абакана также отличаются от популяции г.Горно-Алтайска. При этом для отдельных нозологических форм отмечаются статистически значимые различия между исследуемыми группами (табл. 3). Подобные вариации (как для суммарной частоты, так и для отдельных нозологических форм) отмечаются при регистрации пороков развития обязательного учёта на других территориях и в другие временные периоды (10, 11, 13, 14).

Изучение структуры ВПР у новорождённых в трёх сибирских регионах показало различия в спектре этой патологии, однако самый большой вклад во всех исследованных группах принадлежит группе пороков развития костно-мышечной системы (табл. 4). Подобные результаты получены другими исследователями [9, 19]. Пороки развития костно-мышечной системы занимают первое место в структуре ВПР в Черновицкой области (Украина) [19]. Показано, что вследствие манифестации скрытых форм частота ВПР костно-мышечной системы к концу 1 года жизни увеличивается до 5–7%, являясь в дальнейшем одной из причин инвалидности [3]. С целью раннего выявления этой патологии и своевременной коррекции обсуждается необходимость проведения ортопедического скрининга новорождённых [24].

В настоящем исследовании установлено, что наибольший вклад в различия между исследуемыми группами (г.Томск, г.Абакан, г.Горно-Алтайск) вносят пороки развития мочевой системы, половых органов и пороки развития кожи и её придатков (рис. 3). Подобные результаты получены при изучении ВПР на других территориях. Так, в структуре ВПР у новорождённых Московской области одно из ведущих мест занимают пороки развития мочеполовой системы [9].

Пороки развития кожи и её придатков регистрируются относительно часто. При анализе динамики врождённых аномалий развития у новорождённых детей в г.Белгороде исследователями отмечено значительное увеличение пороков развития именно этой группы — с 1985 по 2000 гг. рост показателя частоты составил 736% [4]. Значительная часть пороков развития кожи

в настоящем исследовании представлена невусом, в остальных случаях зарегистрированы нарушения развития сосудов — гемангиомы.

Возможно, что различия в частотах ВПР могут быть связаны с уровнем диагностики на территориях. Однако могут быть и другие причины этих различий, связанные, в том числе, с особенностями популяционной и этнической структуры населения различных регионов. Особенности распространения пороков развития в разных этнических группах показаны для ВПС [25], расщелин губы и нёба [26], пороков развития брюшной стенки [30].

Среди ВПР обязательного учёта обращает на себя внимание частота порока развития ушных раковин и наружного слухового прохода — микроотии (анотии). В настоящем исследовании показатель частоты этого ВПР у новорождённых детей г.Горно-Алтайска (0,366%) превышает таковые в городах Томске и Абакане (0,094 и 0,072% соответственно, $p < 0,05$). Кроме того, микроотия (анотия) вносит существенный вклад в обобщённые показатели межпопуляционных различий, выявленных по результатам дискриминантного анализа (рис. 4). Высокая частота микроотии (анотии) в г.Горно-Алтайске (Республика Хакасия) была установлена ранее в исследовании Н.И. Крикуновой с соавторами — 0,32% [11]. Обзор публикаций по изучению распространённости этого порока развития показал, что его частота составляет 0,21%, и более высокий уровень частоты микроотии (анотии) наблюдается в Америке, Северной Европе и Азии [28]. При проведении медико-генетического исследования в Республике Алтай В.Н. Тадиновой было показано, что среди наследственных болезней с ауто-сомно-рецессивным типом наследования на первом месте по частоте встречаемости среди алтайского населения стоит группа патологии органов слуха: микроотия с атрезией слухового прохода, наследственная нейросенсорная тугоухость и глухонмота [22]. Автор отмечает факт накопления в Республике больных алтайской национальности с синдромом микроотии и атрезии наружного слухового прохода. Таким образом, результаты нашего исследования хорошо согласуются с приведёнными данными. Принимая во внимание результаты медико-генетического исследования населения Республики Алтай [22], можно предположить, что причиной различий в частоте микроотии (анотии), вероятно, является этническая принадлежность.

В настоящем исследовании показана вариабельность оценок частот ВПР в трёх городских популяциях сибирского региона. Подобные результаты получены другими исследователями в различных территориальных и возрастных группах при регистрации определённого спектра пороков развития [1, 4, 6, 9, 19, 20, 24]. Таким образом, этно-территориальные группы населения отдельных регионов различаются по уровню здоровья, в том числе и по показателям частот ВПР. Результаты настоящего исследования подтверждают существование различий

в структуре и частотах пороков развития в рассматриваемых популяциях, которые имеют место и выявляются независимо от спектра учитываемых форм пороков развития. Кроме того, следует учитывать, что частоты пороков развития обнаруживают тенденцию к росту по мере совершенствования методов диагностики указанной патологии. Причины различий могут быть установлены при достаточно продолжительном мониторинге ВПР на разных территориях с использованием унифицированной системы их регистрации.

Список литературы

1. Амелина С.С. Эпидемиология моногенной наследственной патологии и врожденных пороков развития у населения Ростовской области: Автореф. на соискание ученой степени д.м.н. — М., 2006. — 43 с.
2. Антонов О.В. Научные, методические и организационные подходы к профилактике врожденных пороков развития у детей: Автореф. на соискание ученой степени д.м.н. — Омск, 2007. — 38 с.
3. Баранов А.А., Альбицкий В.Ю., Зелинская Д.И., Терлецкая Р.Н. Инвалидность детского населения России. — М., 2008. — 208 с.
4. Верзилина И.Н., Агарков Н.М., Чурносков М.И. Анализ динамики и структуры врожденных аномалий развития у новорожденных детей в Белгороде // Российский вестник перинатологии и педиатрии. — 2007. — №6. — С. 40—44.
5. Гинтер Е.К., Зинченко Р.А. Наследственные болезни в российских популяциях // Вестник ВОГиС. — 2006. — Т. 1, №1. — С. 106—125.
6. Демикова Н.С., Кобринский Б.А. Эпидемиологический мониторинг врожденных пороков развития в Российской Федерации. — М.: ООО «Пресс-Арт», 2011. — 236 с.
7. Демоскоп Weekly (Электронная версия бюллетеня Население и общество). — 2010. — №433-434. [Электронный документ]. — Режим доступа: <http://demoscope.ru/weekly/2010/0433/baom04.php>.
8. Ефимов В.М., Ковалева В.Ю. Многомерный анализ биологических данных: Учебное пособие. 2-е испр. и доп. изд.-е. — СПб.: ВИЗР РАСХН, 2008. — 88 с.
9. Жученко Л.А., Летуновская А.Б., Демикова Н.С. Частота и динамика врожденных пороков развития у детей в Московской области, по данным регистра врожденных пороков развития за период 2000—2005 гг. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. — 2008. — Т. 53, №2. — С. 30—38.
10. Клиническая генетика: Учебник / Н.П. Бочков, В.П. Пузырев, С.А. Смирнихина / Под ред. Н.П. Бочкова. — 4-е изд.-е, доп. и перераб. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. — 592 с.
11. Крикунова Н.И., Минайчева Л.И., Назаренко Л.П., Тадинова В.Н., Нестерова В.В., Фадюшина С.В., Шапран Н.В. Эпидемиология врожденных пороков развития в г.Горно-Алтайске (Республика Алтай) // Генетика. — 2004. — Т. 40, №8. — С. 932—937.
12. Лагуева Ф.К., Габисова Ю.В., Овсяников Г.И. Мониторинг врожденных пороков развития в РСО-Алания // Современные технологии в педиатрии и детской хирургии. — М., 2004. — С. 378.
13. Лазюк Г.И., Кириллова И.А., Кравцова Г.И., Кручинский Г.В. Руководство для врачей / Под ред. Лазюка Г.И. 2-е изд.-е, перераб. и доп. — М.: Медицина, 1991. — 480 с.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1992. — 350 с.
15. Минина В.И., Ликстанов В.И., Ларин С.А., Ветрова И.В., Шабалин А.В., Гордеева Л.А. Эпидемиологические аспекты врожденных пороков развития плодов и новорожденных в Новокузнецке // Российский вестник перинатологии и педиатрии. — 2008. — Т. 53, №1. — С. 19—22.
16. Новиков П.В. Основные направления ранней диагностики и терапевтической коррекции наследственных заболеваний у детей // Рос. вестн. перинатол. и педиатрии. — 2006. — №6. — С. 66—72.
17. Овсова О.В. Клинико-эпидемиологический анализ и оценка факторов риска формирования врожденных пороков развития центральной нервной системы у детей: Автореф. на соискание ученой степени к.м.н. — Екатеринбург, 2007. — 27 с.
18. Пантелеева Е.Ю., Лоскутова С.А., Миронова Г.Ф., Анохина Т.Ю. Заболеваемость, особенности течения инфекций мочевой системы у детей Новосибирской области // Бюллетень сибирской медицины. — 2008. — Прил. 2. — С. 99—104.
19. Пишак В.П., Ризничук М.А. Эпидемиологическая оценка врожденных пороков развития костно-мышечной системы у новорожденных Черновицкой области // «Инновации в науке»: материалы XIV международной заочной научно-практической конференции. (19 ноября 2012 г.) / Под ред. Я.А. Полонского. — Новосибирск: Изд-во «СибАК», 2012. — С. 137—145.
20. Плотко И.С., Машнева Е.Ю., Федотов В.П. Региональные частоты пороков развития по данным мониторинга новорожденных // Медицинская генетика: Материалы V съезда Российского общества медицинских генетиков. — 2005. — Т. 4, №6. — С. 252.
21. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. — М.: МедиаСфера, 2002. — 312 с.
22. Тадинова В.Н. Медико-генетическое исследование народонаселения Республики Алтай: Автореф. на соискание ученой степени к.м.н. — Томск, 2005. — 21 с.
23. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. — М.: Медицина, 1975. — 296 с.
24. Чухраева И.Ю. Актуальные вопросы ортопедического скрининга новорожденных: Автореф. на соискание ученой степени к.м.н. — СПб., 2011. — 28 с.
25. Agadoorappa P., Oddie S., Pawson N., Sheridan E. Do pakistani babies have more congenital heart defects? Preliminary findings from our birth cohort study // Arch. Dis. Child. — 2011. — Vol. 96. — A35.
26. Agbenorku P., Agbenorku M., Iddi A., Abude F., Sefenu R., Matondo P., Schneider W. A study of cleft lip/palate in a community in the South East of Ghana // Eur. J. Plast. Surg. — 2011. — Vol. 34(4). — P. 267—272.
27. Christianson A., Howson C.P., Modell B. March of Dimes Global Report of Birth Defects: The Hidden Toll of Dying and Disabled Children. March of Dimes Birth Defects Foundation. — White Plains, New York, 2006. — 20 p.
28. Luquetti D.V., Leoncini E., Mastroiaco P. Microtia-anotia: a global review of prevalence rates // Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol. — 2011. — Vol. 91(9). — P. 813—822.
29. Marelli A.J., Mackie A.S., Ionescu-Ittu R., Rahme E., Pilote L. Congenital Heart Disease in the General Population. Changing Prevalence and Age Distribution // Circulation. — 2007. — Vol. 115. — P. 163—172.
30. Mohamed M.A., Aly H. Birth region, race and sex may affect the prevalence of congenital diaphragmatic hernia, abdominal wall and neural tube defects among US newborns // J. Perinatol. — 2012. — Vol. 32(11). — P. 861—868.

Comparative analysis of the frequencies of congenital malformations in newborns among Siberian populations

Minaycheva L.I.¹, Kurovskiy A.V.², Nazarenko L.P.^{1,3}

¹ — Research Institute of Medical Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk

² — Tomsk State University, Tomsk

³ — Siberian State Medical University, Tomsk

634050, Tomsk, Ushaika street, 10; tel. 8(3822) 55-56-83, fax: 8(3822) 53-56-83;

e-mail: ludmila.nazarenko@medgenetics.ru

In the study we present a comparative analysis of the frequencies of congenital malformations and their structures in the newborn among the urban population of the Tomsk region (Tomsk), of the Republic of Altai (Gorno-Altai), of the Republic of Khakassia (Abakan). The period of observation was 16 years (1986–2001). We have shown that there are some statistically significant differences in the structure and in the frequencies of malformations in these populations. These differences there are disclosed regardless of the method of registration and of the studied spectrum of registered forms of the malformations.

Key words: congenital malformations, monitoring, prevalence, Siberian populations