

СОДЕРЖАНИЕ

СТАТЬИ

СИНДРОМ НИЙМЕГЕН В УКРАИНЕ

Акопян Г. Р., Макух Г. В., Костюченко Л. В., Маркевич Н.В.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АУТОСОМНО-ДОМИНАНТНОГО ПОЛИКИСТОЗА ПОЧЕК. ОБЗОР

ЛИТЕРАТУРЫ Арутюнян С.С., Ларионова В.И., Савенкова Н.Д.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СИНДРОМА В КЛИНИКЕ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Афанасьев Ю.И., Кузубова А.В., Григорова С.Ю.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К

ЗАНЯТИЯМ СПОРТОМ

Ахметов И.И.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КАРДИОВАСКУЛЯРНЫХ И ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ *Васильева О.В., Полоников А.В., Иванов В.П.,*

Солодилова М.А., Вялых Е.К., Полякова Н.В., Анцупов В.В.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СИНДРОМА НИЙМЕГЕН (КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ)

Волянская Л.А., Дмитраш Л.Н.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРИРОДА СЕНСОНЕВРАЛЬНОЙ ТУГОУХОСТИ У ЖИТЕЛЕЙ БЕЛАРУСИ

Даниленко Н.Г., Синявская М.Г., Левая-Смоляк А.М., Олейник О.А., Меркулова Е.П.,

Давыденко О.Г.

МУТАЦИЯ ГЕНА NF-1 И ДЕФОРМАЦИЯ ПОЗВОНОЧНИКА

Зайдман А.М., Завьялова Е.Л., Михайловский М.В., Новиков В.В., Васюра

А.С., Суздалов В.А., Садовой М.А.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА И АПОЛИПОПРОТЕИНА E

Корнева В.А.

О РОЛИ КОРРЕКТОРСКИХ ЭКЗОНУКЛЕАЗ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Кравецкая Т. П., Ронжина Н. Л., Крутяков В.М.

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ CD38/АДФ-РИБОЗИЛЦИКЛАЗЫ И ЦИТОКИНОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ

АСТМЕ *Крапошина А.Ю., Собко Е.А., Каптюк Л.И., Демко И.В., Салмина А.Б.*

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ СЕМЕЙНОЙ

ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ В РОССИИ: ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Мандельштам М.Ю., Захарова Ф.М., Голубков В.И., Головина А.С., Комарова Т.Ю.,

Масленников А.Б., Татищева Ю.А., Липовецкий Б.М., Константинов В.О., Корнева

В.А., Денисенко А.Д., Васильев В.Б.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL6 И TGFB1 С ПЛОТНОСТЬЮ КОСТНОЙ ТКАНИ И УРОВНЕМ ЕЕ МЕТАБОЛИЗМА У БОЛЬНЫХ ОСТЕОПОРОЗОМ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

Мищенко Е.Б., Котова С.М., Санькова Т.П., Цымбаленко Н.В., Дорохова И.И.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА ПО ПОЛИМОРФНЫМ МАРКЕРАМ ГЕНОВ АПОПТОЗА И СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Насибуллин Т.Р., Туктарова И.А., Васильева А.М., Граховская Е.М., Карамова И.М., Мустафина О.Е.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ НАСЛЕДСТВЕННЫХ КАРДИОМИОПАТИЙ

Пинелис В.Г., Березнева Н.А., Асанов А.Ю.

ВЛИЯЕТ ЛИ АСТН3 R577X ПОЛИМОРФИЗМ НА ВЫСОКИЕ СПОРТИВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ?

Пушкарев В.П., Леконцев Е.В., Куликов Л.М., Пушкарев Е.Д., Рахманина Л.В., Вишнев В.Ю., Дятлов Д.А.

НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОМА ПРИ СИНДРОМЕ МИКРОДЕЛЕЦИИ

Савина Н.В., Смаль М.П., Кужир Т.Д., Хурс О.М., Егорова Т.М., Политыко А.Д., Гончарова Р.И.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ ЛЮДЕЙ К РАДИАЦИОННЫМ И ХИМИЧЕСКИМ ЭФФЕКТАМ: АНАЛИЗ СОБСТВЕННЫХ ДАННЫХ И ДАННЫХ ЛИТЕРАТУРЫ

Тельнов В.И.

ИННОВАЦИОННЫЕ МЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ОРГАНИЗАЦИИ ЛАБОРАТОРИИ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Тоцкая Е.Г., Поспелова Т.И.

НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ФАКТОРЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ НАРУШЕНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ СУПРУЖЕСКОЙ ПАРЫ

Фетисова И.Н.

СИНДРОМ СТАТИСТИЧЕСКОЙ СНИСХОДИТЕЛЬНОСТИ ИЛИ ЗНАЧЕНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ P-ЗНАЧЕНИЯ

Хромов-Борисов Н.Н.

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА, У БОЛЬНЫХ

АТЕРОСКЛЕРОЗОМ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПРИ НАЛИЧИИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Шмелева В.М., Капустин С. И., Кленкова Н.А., Блинов М.Н., Папаян Л.П.

СИНДРОМ НИЙМЕГЕН В УКРАИНЕ

Акопян Г. Р., Макух Г. В., Костюченко Л. В., Маркевич Н.В.

ГУ «Институт наследственной патологии АМН Украины»

79000 Украина, Львов, МСП-169, ул. М. Лысенко 31а

Тел.: +380-50-54-23-150, e-mail: akopjan@mail.lviv.ua

РЕЗЮМЕ: Исследованы клинико-генетические особенности синдрома Ниймеген (NBS) у украинских пациентов. Разработаны диагностика и врачебная тактика. Определена частота мутации 657del5 гена *NBN* в популяции Львовской области Украины. *Ключевые слова:* синдром Ниймеген, NBS, мутация 657del5 гена *NBN*

SUMMARY: Clinical genetic features of Ukrainian patients with Nijmegen Breakage Syndrome (NBS) were determined. The diagnostics and medical care were worked up. The frequency of 657del5 *NBN* gene mutation was estimated in Lvivska region of Ukraine. *Key words:* Nijmegen Breakage Syndrome, NBS, *NBN* gene, 657del5

Синдром хромосомной ломкости Ниймеген или NBS (Nijmegen Breakage Syndrome, OMIM 251260) – это аутосомно-рецессивное заболевание из когорты наследственных синдромов хромосомной нестабильности. Развитие NBS связано с мутантными изменениями в гене *NBN* (*NBS1*), причем 95% всех пациентов имеют славянское происхождение и являются носителями мутации 657del5 [8, 16, 17].

Этому синдрому свойственны врожденная прогрессирующая микроцефалия, умеренный дисморфизм лица, задержка роста и физического развития, хромосомная нестабильность, высокая чувствительность к ионизирующей радиации, комбинированный T/B иммунодефицит, повышенная склонность к рецидивирующим воспалительным процессам и развитию В-клеточных неходжкинских злокачественных лимфом [4–8, 13, 16]. Прогноз неблагоприятный: большинство пациентов погибают до пубертатного периода от опухолевых или инфекционных осложнений врожденного иммунодефицита. Гетерозиготные носители мутации отличаются повышенной чувствительностью к ионизирующей радиации и склонностью к развитию солидных злокачественных новообразований [2, 14, 15].

NBS наиболее распространен в чешской и польской популяциях и практически не обнаруживается у представителей «неславянских» народов (в Германии – 1 на 3 млн [3]). В Российской Федерации его исследования связаны с именем профессора И. Б. Резника [10, 11] и резюмированы в работе [7]. Целью нашей работы было охарактеризовать типичные клинико-генетические особенности NBS у украинских пациентов и определить его распространенность в Украине.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мутацию 657del5 гена *NBN* определяли путем амплификации с использованием специфических праймеров. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в автоматическом режиме (термоциклеры «AMPLY-4» и «Терцик», Российская Федерация) с ис-

пользованием эндонуклеаз рестрикции, олигонуклеотидных праймеров и термостабильной Taq-полимеразы («МВІ Fermentas», Литва). Электрофорез продуктов ПЦР проводили в 10% полиакриламидном геле в аппарате для вертикального электрофореза («ХЕЛИ-КОН», Российская Федерация). Аномальная миграция ПЦР-фрагментов свидетельствовала о гомозиготном носительстве мутации 657del5 гена *NBN*, наличие гетеродуплексных фрагментов – о гетерозиготном носительстве.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования NBS в Украине начались в 1999 г. в рамках Международного проекта, направленного на определение частоты типичной мутации 657del5 гена *NBN* у новорожденных в трех славянских популяциях: чешской, польской и украинской (львовской) [18]. Начиная с 2004 г., силами Института наследственной патологии был развернут селективный скрининг NBS в Украине, чему способствовало внедрение в практику генетического тестирования типичной мутации и цитогенетической идентификации специфических перестроек 7 и 14 хромосом.

Объектом селективного скрининга были случаи микроцефалии (МЦ), ассоциированной с NBS-подобным фенотипом. Пробанды высокого риска активно направлялись из 13 областей Украины и АР Крым, чему способствовала активная просветительская работа среди врачей. В львовской популяции скринингом были охвачены контингенты пациентов Львовского межобластного медико-генетического центра (ЛММГЦ), а также специализированных детских отделений (гематологического, неврологического, общепедиатрического профиля) Львовской областной детской специализированной клинической больницы и других лечебных учреждений. Кроме того, проанализированы сообщения о регистрации МЦ у новорожденных из львовской популяции за 19-летний период. Определены районы с наивысшими показателями регистрации МЦ (3 на 10000 новорожденных), причем, как оказалось, именно из них происходили 14 из 15 «львовских» случаев NBS. Это указывает на эффективность регистрации МЦ в родовспомогательных учреждениях для ранней диагностики синдрома Ниймеген.

При анализе документации кабинетов пренатального ультразвукового скрининга беременных установлено за 5 лет, что ежегодно в Львовской области пренатально диагностируются 4 – 8 случаев МЦ, преимущественно после 28 недель беременности. При этом эффективность дородовой диагностики NBS признана достаточной: МЦ, ассоциированная с NBS, пренатально выявлена лишь у 3 из 30 украинских пробандов. Это указывает на потребность повышения генетической настороженности врачей пренатальной УЗД и необходимость своевременного информирования врачей-генетиков о каждом случае МЦ у плода.

Как показали результаты селективного скрининга МЦ на постнатальном этапе, у 70% пациентов она сочеталась с умственной отсталостью и неврологической симптоматикой (диффузная мышечная гипотония, спастический тетрапарез, судорожный синдром). В группу риска синдрома Ниймеген для генетического тестирования отобраны 104 (30% исследованных случаев МЦ) пробандов с NBS-подобным фенотипом, отсутствием неврологических нарушений и задержкой физического развития. 30 из 104 или 28,8% пробандов группы риска оказались гомозиготными носителями типичной мутации гена NBN. Частота верифицированных случаев синдрома Ниймеген в контингенте детей с МЦ оказалась вдвое выше, чем в чешской популяции [12].

Проведенные клиничко-генетические исследования позволили установить типичные проявления NBS у украинских пациентов [1, 8]. Все дети родились доношенными, но в 83,3% случаев со сниженными показателями массы и длины тела. Все дети имели МЦ с окружностью головы 27–33 см, которая с возрастом прогрессировала ($-6,3$ SD от нормальных возрастных показателей) и сопровождалась дефицитом массы тела и роста ($-3,7$ SD и $-4,2$ SD соответственно). Формирование моторных навыков соответствовало возрастной норме. Уровень интеллектуального развития расценен как нормальный у 14 из 30 (46,7%), приближенный к норме – у 16 (53,3%) детей, что соответствует данным Международного реестра NBS [9].

Во всех 30 случаях наблюдались типичные черты фенотипа синдрома Ниймеген: микроцефалия, скошенный лоб, выдвинутая вперед средняя часть лица с длинным носом и увеличенным фильтром, гипоплазия нижней челюсти, большие уши с диспластическими завитками. При этом у украинских пациентов часто наблюдались монголоидный разрез глаз, гипертелоризм и короткая шея, что не отмечено в европейских публикациях. По сравнению с данными литературы, у украинских пациентов значительно реже обнаруживали пигментные пятна «кофе с молоком» (85% и 29,2% соответственно), витилиго (66% и 25%) и бульбарные телеангиэктазии (32–40% и 12,5%) при относительно повышенной частоте кожных телеангиэктазий на спине (29,2% и 9% соответственно) [9, 16]. В трети исследованных случаев находили клинодактилию мизинцев и/или парциальную синдактилию пальцев кистей и стоп, что соответствует европейским данным. У украинских пациентов вдвое чаще обнаруживали аномалии почек (гипоплазия, агенезия одной почки, тазовая дистопия подковообразной почки), тогда как в Международном реестре NBS преобладают случаи гидронефроза.

У 26 из 30 (86,7%) пациентов в 2–х-3-хлетнем возрасте отмечалась манифестация рецидивирующих респираторных инфекций (5–6 и больше эпизодов в году). Бронхиты и пневмонии отличались затяжным хроническим течением и требовали нескольких курсов антибиотикотерапии. По сравнению с данными Международного реестра NBS, значи-

тельно меньшей оказалась частота развития отита (50% и 20% соответственно) и воспалительных процессов мочевой системы (6,7% и до 65% соответственно) [9]. Во всех случаях находили изменения иммунограммы: выразительную либо умеренную лейкопению и лимфопению, дефицит CD4⁺, CD3⁺ и CD19⁺ лимфоцитов (91,6%, 66,6%, 41,6% случаев соответственно), существенное снижение хелперно-супрессорного индекса; увеличение абсолютного и относительного содержания CD16/56⁺ лимфоцитов (явление «экспансии на-туральных киллеров») у 66,6% пациентов. У 83,3% пробандов наблюдался низкий уровень Ig A, у 58,3% – снижение Ig G, которое в трети случаев достигало критических значений (< 3 г/л) и требовало заместительной терапии внутривенными иммуноглобулинами (IVIg). Показатели иммунограммы украинских пациентов с NBS в целом согласуются с европейскими данными, но требуют расширения панели с исследованием экспрессии CD45RA⁺, CD45RO⁺ и уровня продукции альфа/бета и гамма/дельта рецепторов Т-клеток.

Одной из потенциальных угроз иммунодефицита является повышение риска онкогенной клеточной трансформации, что в случае синдрома Ниймеген усугубляется функциональным дефектом остановки клеточного цикла и повышенной радиочувствительностью *NBS1*-дефицитных лимфоцитов. Неслучайно рентгеновское и радиоизотопное исследования, а также использование радиомиметиков в терапевтических схемах категорически запрещено. По частоте онкологических осложнений NBS опережает все другие онкогенные наследственные заболевания, и его спецификой является ранняя манифестация неходжкинских злокачественных В-линейных лимфом [4–8, 13, 16]. У 8 из 30 украинских пробандов в возрасте 5–12 лет развились опухолевые процессы: у 7 – неходжкинские злокачественные В-лимфомы, у 1 – гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз. Шестеро из восьми детей умерли в возрасте 5–9 лет, двое в возрасте 18 и 19 лет находятся в длительной ремиссии (10 и 6 лет соответственно). Структура онкологических осложнений NBS у украинских пациентов соответствует данным мировой литературы, хотя и демонстрирует единственный известный в мире случай ассоциации NBS с гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом. Несколько меньшим оказался возраст манифестации онкологических процессов (медиана – 7,2 года при 9 годах по среднеевропейским данным) и значительно ниже – их частота: 26,7% всех случаев NBS при 40–53% по данным Международного и Польского реестров [6, 9]. Возможно, это связано с относительно меньшим возрастом обследованных нами пациентов, а возможно является эффектом своевременной диспансеризации и адекватной тактики лечения.

В целом, на конец 2009 г. в Украине диагностированы 34 случая NBS в 30 семьях (32 ребенка, 2 плода). Пациенты происходили из 12 областей: Львовской (15 детей, 2 плода), Волынской (3), Тернопольской (3), Ровенской (2), Закарпатской (2), Ивано-

Франковской (1), Хмельницкой (1), Запорожской (1), Донецкой (1), Одесской (1), Херсонской (1) и Киевской (1). 5 случаев пренатальной диагностики в семьях высокого риска позволили своевременно диагностировать NBS у 2 плодов и получить 3 здоровых детей в семьях, где до того не было здорового потомства.

Основная часть украинских случаев синдрома Ниймеген оказалась западноукраинского происхождения (27 из 32 пациентов, и практически половина из них (15) принадлежала к львовской популяции. Репрезентативное число пробандов с NBS в Львовской области Украины позволило рассчитать частоту гомо- и гетерозиготного носительства типичной мутации в этой популяции. Упомянутые 15 случаев NBS появились в течение 1989–2008 гг., и за этот период в области родились 511598 детей. Частота синдрома Ниймеген составила 1 на 34106, гетерозиготных носителей мутации 657del5 гена *NBN* – 1 на 95 новорожденных. В течение 10 лет появлялись 1–2 случая ежегодно и, если ограничиться этим периодом, то частота гомозиготных и гетерозиготных носителей мутации возрастает до 1 на 13640–27648 и 1 на 58–83 новорожденных соответственно. Полученные нами данные существенно превышают результаты генетического тестирования новорожденных из львовской популяции в исследовании [18] (1 на 133000 та 1 на 182 соответственно) и согласуются с результатами исследования отдельных польских субпопуляций (1 на 76–77 [19]) и, в частности, местности Новый Сонч, территориально приближенной ко Львовщине (1 на 90 [18]). Полученные нами результаты выдвигают синдром Ниймеген на позиции распространенной наследственной патологии в львовской популяции и позволяют предположить вероятный эффект гетерозиготного носительства мутации гена *NBN* в структуре причин онкологической заболеваемости в регионе.

ВЫВОДЫ

1. Высокая частота синдрома Ниймеген в львовской популяции и верификация случаев в 12 областях западного, южного и восточного регионов подтверждают целесообразность селективного скрининга NBS в Украине.

2. Определены типичные клинико-генетические характеристики синдрома Ниймеген у украинских пациентов, которые позволяют эффективно проводить его селективный скрининг в контингентах пациентов с микроцефалией, задержкой физического развития и отсутствием неврологических нарушений.

3. Отработан экономичный и эффективный метод молекулярно-генетической верификации диагноза в постнатальный и пренатальный период.

4. Принадлежность носителей мутаций гена *NBN* к группе риска «онкогенных» и «радиационно чувствительных» заболеваний требует повышенной настороженности врачей и специальной тактики диспансеризации семей высокого риска, что в Украине приоб-

ретає особе значення внаслідок радіаційного забруднення частини території після аварії на ЧАЕС.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Костюченко Л. В., Акоюн Г. Р., Макух Г. В., [и др.]. Современное состояние диагностики и лечения синдрома Ниймеген в Украине // Педиатрия, акушерство и гинекология (Укр.) — 2009. — Т. 79, №5. — С. 5—12.
2. Bogdanova N., Feshchenko S., Schürmann P., [et al.]. Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer // *Int. J. Cancer.* — 2008. — Vol. 122, N 4. — P. 802—6.
3. Carlomagno F., Chang-Claude J., Dunning A. M., [et al.]. Determination of the frequency of the common 675del5 Nijmegen breakage syndrome mutation in the German population: no association with risk of breast cancer // *Genes. Chromosomes. Cancer.* — 1999. — Vol. 25, N 4. — P. 393—395.
4. Crzanowska K., Krajewska-Walasek M., Bernatowska E. Zespól Nijmegen — diagnostyka kliniczna, cytogenetyczna i molekularna // *Pediatr. Polska.* — 1999. — N 6. — P. 254—256.
5. Dembowska-Baginska B., Perek D., Brozyna A., [et al.]. Non-Hodgkin lymphoma (NHL) in children with Nijmegen Breakage syndrome (NBS) // *Pediatr. Blood Cancer.* — 2009. — Vol. 52, N 2. — P. 186—90.
6. Gładkowska-Dura M., Dzierzanowska-Fangrat K., Dura W. T., [et al.]. Unique morphological spectrum of lymphomas in Nijmegen breakage syndrome (NBS) patients with high frequency of consecutive lymphoma formation // *J. Pathol.* — 2008. — Vol. 216, N 3. — P. 337—44.
7. Kondratenko I., Paschenko O., Polyakov A., [et al.] Nijmegen breakage syndrome // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2007. — Vol. 601. — P. 61—67.
8. Kostyuchenko L., Kitsera N., Makukh H., [et al.]. Nijmegen breakage syndrome in Ukraine: diagnostics and follow-up // *Central European Journal of Immunology.* — 2009. — Vol. 34, N1. — P. 47—52.
9. Nijmegen breakage syndrome / The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group // *Arch. Dis. Child.* — 2000. — Vol. 82, N 5. — P. 400—406, 600—606.
10. Resnick I. B., Kondratenko I., O. Togojev, [et al.]. Nijmegen breakage syndrome: clinical characteristics and mutation analysis in eight unrelated Russian // *J. Pediatr.* — 2002. — Vol. 140, N 3. — P. 355—361.
11. Resnick I. B., Kondratenko I., Pashanov E., [et al.]. 657del5 mutation in the gene for Nijmegen breakage syndrome (NBS1) in a cohort of Russian children with lymphoid tissue malignancies and controls // *Am. J. Med. Genet.* — 2003. — Vol. 120A, N 2. — P.174—9.
12. Seeman P., Gebertová K., Paderová K., [et al.]. Nijmegen breakage syndrome in 13% of age-matched Czech children with primary microcephaly // *Pediatr. Neurol.* — 2004. — Vol. 30, N3. — P. 195—200.
13. Seemanova E., Seeman P., Jarolim P. Chromosome instability syndromes // *Cas. Lek. Cesk.* — 2002. — Vol. 141, N 1. — P.16—22.
14. Seemanová E., Jarolim P., Seeman P., [et al.] Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2007. — Vol. 99, N 24. — P. 1875—80.
15. Steffen J., Maneva G., Popławska L., [et al.] Increased risk of gastrointestinal lymphoma in carriers of the 657del5 NBS1 gene mutation // *Int. J. Cancer.* — 2006. — Vol. 119, N 12. — P. 2970—3.
16. Van der Burgt I., Chrzanowska K. H., Smeets D., [et al.] Nijmegen breakage syndrome // *J. Med. Genet.* — 1996. — Vol. 33, N 2. — P.153—156.
17. Varon R., Vissinga C., Platzer M., [et al.] Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome // *Cell.* — 1998. — Vol. 93, N 3. — P. 467—476.

18. Varon R., Seemanova E., Chrzanowska K., [et al.] Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations // Eur. J. Hum. Genet. — 2000. — Vol. 8, N 11. — P. 900—902.

19. Ziółkowska I., Mosor M., Nowak J. Regional distribution of heterozygous 657del5 mutation carriers of the NBS1 gene in Wielkopolska province (Poland) // J. Appl. Genet. — 2006. — Vol. 47, N 3. — P. 269—72.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АУТОСОМНО-ДОМИНАНТНОГО ПОЛИКИСТОЗА ПОЧЕК. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Арутюнян С.С., Ларионова В.И., Савенкова Н.Д.

Санкт-Петербургская Государственная Педиатрическая Медицинская Академия,
194100 Санкт-Петербург, ул. Литовская д.2,
E-mail:h.s.s@mail.ru

Ключевые слова: Аутосомно-доминантный поликистоз почек, ген PKD1, ген PKD2.

Key words: Autosomal dominant polycystic kidney disease, PKD1, PKD2.

Целью данного обзора литературы является обобщение имеющихся в литературе сведений о генетических особенностях аутосомно-доминантного поликистоза почек.

Поликистозная болезнь почек (Polycystic kidney disease) включает в себя все случаи образования множественных кист в паренхиме обеих почек. По типу наследования различают аутосомно-доминантный поликистоз почек (АДПП) и аутосомно-рецессивный поликистоз почек (АРПП) [Bergmann, Zerres, 2008, MacRae Dell ,Sweeney, 2009, Somlo, Guay-Woodford, 2009].

АДПП - один из самых распространённых наследственных заболеваний почек, характеризующийся возраст-зависимым развитием множественных кист в обеих почках, приводящим к нефромегалии и почечной недостаточности. Частота встречаемости колеблется в пределах 1:400-1:1000 живорожденных [Wilson, 2004, Igarashi, Somlo, 2002], что составляет примерно 12,5 миллионов больных во всем мире. После сахарного диабета и гипертонии АДПП является самой распространённой одиночной причиной развития терминальной почечной недостаточности.

Генетика АДПП. АДПП генетически гетерогенен, в 85% случаев он обусловлен мутацией гена PKD1(MIM 601313), в остальных случаях - гена PKD2(MIM 173910). Предполагалось также существование третьего гена АДПП, так как по данным некоторых авторов есть семьи, у которых болезнь не связана с вышеупомянутыми двумя генами, но согласно последним исследованиям, это маловероятно [Daoust et al.,1995, De Almeida et al., 1995, Turco, 1996, Ariza et al., 1997, Paterson, Pei, 1998]. Описаны случаи компаунд-гетерозиготного наследования с PKD1 и PKD2 мутациями, которые протекают тяжелее, и все же больные дос-

тигают зрелого возраста [Pei et al., 2001], но гомозиготные мутации не описаны. Этот факт и данные, полученные при исследованиях, проведённых на гомозиготно пораженных мышах [Wu et al., 2000, Lu et al., 1997], говорят в пользу того, что гомозиготные мутации как PKD1, так и PKD2, не совместимы с жизнью [Paterson et al., 2002].

PKD1 - довольно большой по размеру (52kb) ген, состоящий из 46 экзонов, длина кодируемой транскрипты ≈ 14 kb, расположение-16p13,3 [Hughes, 1995]. Известно, что три четверти 5' конца гена (экзоны 1-33) повторяются приблизительно 6 раз на той же хромосоме 16 в виде высокомолекулярных (с идентичностью в $\approx 95\%$) псевдогенов, что усложняет генетическое тестирование PKD 1 [Harris. et al., 1994, Bogdanova et al., 2001, Peral et al., 1997, Watnick. et al., 1997, Martin .et al., 2004]. PKD2 ген расположен на хромосоме 4 (4q21-q23). Несмотря на большую длину (≈ 68 kb), его геномное строение намного проще – он состоит из 15 экзонов, и у него нет высокомолекулярных псевдогенов, длина кодируемой транскрипты - 5,4kb [Hayashi, 1997].

Продуктами генов PKD1 и PKD2 являются белки полицистин 1 (ПЦ1) и полицистин 2 (ПЦ2), соответственно. ПЦ1 и ПЦ2 являются представителями семейства TRP (transient receptor potential) ионных каналов, поэтому также называются TRPP1 (Transient Receptor Potential Polycystic1) и TRPP2 (Transient Receptor Potential Polycystic2). Несмотря на некоторую схожесть строения и одинаковую номенклатуру, ПЦ2 - более типичный представитель этого семейства ионных каналов, а ПЦ1 - далекий гомолог TRP [Kiselyov et al., 2007, Nilius et al., 2007]. ПЦ 1 – большой мембранный гликопротеин, который состоит из 4303 аминокислот (АК), имеет структуру рецептора или молекулы адгезии и содержит нижеперечисленные части: внеклеточный NH₂ – концевой домен (~ 3074 АК) , цитоплазматический COOH - концевой домен (~ 197 АК) и 11 трансмембранных доменов (1032 АК). В С-концевом домене находится биспиральный участок, с помощью которого он взаимодействует с С- концевым участком ПЦ2, обеспечивая стабилизацию последнего. Предполагают, что ПЦ1 и ПЦ2 представляют из себя сигнальный комплекс рецептора и ионного канала [Huang et al., 2006].

ПЦ1 взаимодействует также со множеством других белков посредством различных участков, расположенных как в цитоплазматическом, так и во внеклеточном домене. ПЦ1 представлен в почках, мозге, сердце, костях, мышцах и бронхах [Geng et al., 1997, Peters et al., 1999, Driscoll et al., 2008]. Его экспрессия в почках, по-видимому, имеет возраст-зависимый характер, с максимальной концентрацией в позднем фетальном и раннем неонатальном периодах; после рождения экспрессия ПЦ1 резко снижается [Geng et al 1997]. Основной синтез в почках ПЦ 1 происходит в эпителии дистальных канальцев и собирательной системы [Geng et al., 1996, Palsson et al., 1996, Ibraghimov-Beskrovnaia, 1997]. Следует заметить, что кисты при АДПП в большинстве случаев развиваются именно из собирательной

системы. В основном ПЦ1 обнаруживается на латеральных мембранах клеток - в местах межклеточных соединений [Foggensteiner et al., 2000] и в десмосомах [Scheffers et al., 2000].

ПЦ2 (968AK) – неселективный катионный канал, проницаемый для Ca^{2+} . Он состоит из коротких цитоплазматических N- и C-концевых участков и 6 трансмембранных сегментов, последние 5 из которых имеют структуру, строго соответствующую таковой TRP канала, а между пятой и шестой сегментами находится предполагаемая щель для прохода ионов [Li et al., 2003]. ПЦ2 взаимодействует с большим числом разных протеинов, в том числе, как уже отмечалось, с ПЦ1. ПЦ2 представлен в почках, сердце, яичниках, тестикулах, гладкой мускулатуре сосудов и в тонкой кишке [Markowitz et al., 1999, Obermuller et al., 1999]. В почках выявляется во всех отделах нефрона, за исключением тонкой части петли Генле и клубочка. В дистальных отделах экспрессия ПЦ2 более выражена, чем в проксимальных отделах [Wu et al., 1998]. В основном ПЦ2 локализован в первичных ворсинках почечной ткани, в мембране эндоплазматического ретикулума [Luo et al., 2003, Hidaka et al., 2004, Razour et al., 2002]. В отличие от ПЦ1, экспрессия ПЦ2 относительно устойчива на протяжении жизни [Qian Q. et al., 2003].

Генное воздействие на фенотип АДПП. АДПП1 (мутация в гене PKD1), протекает тяжелее, чем АДПП2 (мутация в гене PKD2). Все публикации о случаях АДПП с ранним началом, для которых известен причинный ген, связаны с PKD1 [Michaud et al., 1994, Rossetti et al., 2001]. Распространённость гипертензии в 4 раза больше в популяции с АДПП1, инфекции мочевыводящих путей и гематурия также чаще обнаруживаются при этом типе [Torra et al., 1996, Hateboer et al., 1999]. Частота внутречерепных аневризм (ВЧА) и тяжелого поликистозного поражения печени приблизительно равна при АДПП1 и АДПП2 [Chapman et al., 2003, Harris et al., 2006]. Больные с АДПП1 достигают терминальной стадии ХПН на ≈ 20 лет раньше - в 53 года при АДПП 1 и 69,1 года при АДПП2 (оба значительно отличаются от популяции-78лет) [Torra et al., 1996, Hateboer et al., 1999]. В связи с этой разницей, процентное соотношение АДПП 2 с годами растёт. В одном из исследований описано, что 39,1% больных, достигших терминальной стадии ХПН после 63 лет, имеют PKD2 мутацию [Torra R et al 2000]. Доказано, что в одном и том же возрасте при АДПП 1 размер почек намного больше, чем при АДПП 2, а большой объем почек сопряжен с быстрым прогрессированием заболевания. Однако некоторые авторы считают, что генами PKD1 и PKD2 регулируется образование кист, а не увеличение их размера, и тяжесть АДПП 1 объясняется тем, что больше кист возникает на более раннем этапе развития болезни, а не потому, что уже существующие кисты быстрее увеличиваются в размере. Следовательно, процесс цистогенеза состоит из ген-зависимого этапа развития кист и ген-независимого этапа увеличения кист [Torra et al., 1996, Hateboer et al., 1999, Grantham et al., 2006]. Раннее развитие кист при АДПП1 согласуется с «two-hit» моделью цистогенеза, так как PKD1 является большой мишенью для мутаций [Qian F et al 1996].

Выявлено также, что при АДПП2 есть половые различия в сроках достижения терминальной стадии ХПН: у мужчин в среднем 68,1 лет, у женщин-76, а при АДПП1 различия не отмечены [Hateboer et al., 1999, Magistrone et al., 2003 Rossetti et al., 2002]. На сегодняшний день известны 836 мутаций гена PKD1 и 139 мутаций гена PKD2 (табл.1, 2). Таблица 1.

Количество известных на сегодняшний день мутаций в генах PKD1 и PKD2 [по данным ADPKD Mutation Database [<http://pkdb.mayo.edu>]]

Ген	Общее число мутаций	Патогенные мутации
PKD 1	836	436(50,5%)
PKD 2	139	115(82,7%)

Таблица 2.

Количественное соотношение разных видов патогенных мутаций в генах PKD1 и PKD2 [по данным ADPKD Mutation Database [<http://pkdb.mayo.edu>]]

Тип мутаций	PKD1		PKD2	
	Патогенные мутации 436	Патогенные мутации 115	Патогенные мутации 436	Патогенные мутации 115
	Определенно патогенные 308	Вероятно патогенные 128	Определенно патогенные 97	Вероятно патогенные 18
frameshift	134	-	50	-
nonsense	110	-	30	-
splice	32	13	14	3
deletions and large deletions	27	20	2	4
insertions	3	2	1	1
substitutions	2	93	-	11
large duplication	1	-	-	-

Количественное распределение мутаций по длине генов неравномерно - больше всего мутаций зарегистрировано в экзонах 5, 15, 44, 45 и 46 в PKD1 и в экзонах 1 и 6 в PKD2 (Табл. 3 и 4).

Таблица 3.

Количественная и качественная характеристика явно патогенных мутаций гена PKD1 по локализации [по данным ADPKD Mutation Database [<http://pkdb.mayo.edu>]]

участок	Общее количество мутаций	Количество мутаций по типам	
		ст	ство
EX1	6	Frameshift	-5
		Deletion	-1
EX2	1	Nonsense	-1
EX3	1	Frameshift	-1
EX4	2	Frameshift	-1
		Nonsense	-1
EX 5	11	Frameshift	-4
		Deletion	-1
		Nonsense	-6

EX6	1	Frameshift -1
EX 7	3	Frameshift -2
		Nonsense -1
EX 8	5	Frameshift -3
		Nonsense -2
EX 10	5	Frameshift -5
EX 11	8	Frameshift -4
		Nonsense -3
		Large deletion (EX11-15) 1
EX 13	3	Frameshift 2
		Nonsense 1
EX 14	2	Nonsense 2
EX 15	72	Frameshift 35
		Deletion 3
		Insertion 1
		Nonsense 30
Large deletion (EX15; 5'(E4F1)-EX15; EX 15_IVS21) - 3		
EX 16	7	Frameshift - 4
		Nonsense - 3
EX 17	5	Frameshift 2
		Nonsense 3
EX 18	5	Frameshift 2
		Nonsense 1
		Deletion 1
		Large deletion(EX18-EX21) 1
EX 19	4	Frameshift-1
		Nonsense -3
EX 20	2	Frameshift-2
EX 21	5	Frameshift-3
		Nonsense-1
		Large deletion(5'(RAB26)-EX21) -1
EX 22	3	Frameshift-1
		Nonsense-2
EX 23	8	Frameshift -4
		Nonsense-2
		Insertion-1
		Substitution-1
EX 24	2	Frameshift-1
		Nonsense-1
EX 25	6	Frameshift-1
		Nonsense-3
		Deletion -2
EX 26	2	Frameshift-2
EX 27	2	Frameshift -1
		Nonsense-1
EX 28	5	Frameshift-2
		Nonsense-2
		Substitution (EX28-EX32)-1
EX 30	2	Frameshift-2
EX 31	1	Nonsense-1
EX 32	1	Nonsense-1

EX 33	2	Nonsense-2
EX 34	3	Frameshift-1
		Nonsense-2
EX 35	2	Nonsense-2
EX 36	4	Frameshift-3
		Nonsense-1
EX 37	2	Frameshift-2
EX 38	5	Frameshift-3
		Nonsense-2
EX 39	4	Frameshift-1
		Nonsense-1
		Deletion-2
EX 40	7	Frameshift-5
		Nonsense-2
EX 41	6	Frameshift-2
		Nonsense-4
EX 42	5	Frameshift-3
		Nonsense-2
EX 43	4	Frameshift-1
		Nonsense-3
EX 44	11	Frameshift-3
		Nonsense-8
EX 45	18	Frameshift-10
		Nonsense-7
		Deletion-1
EX 46	13	Frameshift-9
		Nonsense- 3
		Insertion -1
IVS 1	3	Large deletion (5'-IVS 1; IVS1-EX18 ; IVS1-EX5)-3
IVS 2	1	Splice-1
IVS 4	1	Splice-1
IVS 7	1	Splice-1
IVS 9	1	Splice-1
IVS 10	1	Splice-1
IVS 11	1	Large deletion (IVS11- IVS34)-1
IVS 13	2	Splice-2
IVS 14	3	Splice-3
IVS 15	2	Splice-2
IVS 16	3	Splice-2
		Large deletion (IVS16-IVS21)-1
IVS 17	1	Large duplication (IVS 17-EX18)-1
IVS 18	1	Splice-1
IVS 19	1	Splice-1
IVS 21	2	Splice-2
IVS 23	1	Splice-1
IVS 24	1	Large deletion(IVS24- IVS30) -1
IVS 26	1	Large deletion(IVS26- IVS38)-1
IVS 29	1	Splice-1
IVS 30	1	Large deletion(IVS30- IVS34)-1
IVS 32	1	Splice-1
IVS 34	1	Large deletion(IVS34- IVS46)-1

IVS 35	1	Splice-1
IVS 36	1	Splice-1
IVS 37	1	Splice-1
IVS 39	2	Splice (IVS39; IVS39-EX40)-2
IVS 40	1	Splice-1
IVS 43	1	Splice-1
IVS 44	3	Splice-3
IVS 45	1	Splice-1

Таблица 4.

Количественная и качественная характеристика явно патогенных мутаций гена PKD2 по локализации [по данным ADPKD Mutation Database [<http://pkdb.mayo.edu>]]

Участок	Общее количество мутаций	Количество мутаций по типам
EX 1	15	Frameshift-9
		Frameshift (EX1-EX13)-1
EX 2	5	Nonsense-5
		Frameshift-3
EX 3	4	Nonsense-2
		Frameshift-3
EX 4	9	Nonsense-1
		Frameshift-5
EX 5	6	Nonsense-4
		Frameshift-2
EX 6	11	Frameshift-7
		Nonsense-3
		Insertion -1
EX 7	3	Frameshift-1
		Nonsense-2
EX 8	2	Frameshift-1
		Nonsense-1
EX 9	3	Frameshift-3
EX 10	4	Frameshift-4
EX 11	7	Frameshift-5
		Nonsense-1
		Deletion-1
EX 12	3	Frameshift-2
		Nonsense-1
EX 13	8	Frameshift-4
		Nonsense-4
EX 14	3	Frameshift-1
		Nonsense-2
IVS 1	2	Splice-2
IVS 2	2	Splice-2
IVS 4	3	Splice-2
		Large deletion (IVS4- IVS5)-1
IVS 5	1	Splice-1
IVS 7	1	Splice-1
IVS 8	1	Splice-1
IVS 11	3	Splice-3
IVS 12	1	Splice-1

IVS 14	1	Splice-1
--------	---	----------

На вопрос, зависят ли особенности течения и прогноз заболевания от типа и локализации мутации в генах PKD1 и PKD2, до сих пор нет однозначного ответа. Розетти с соавторами [2002] выявили, что от позиции мутации в гене PKD1 зависит тяжесть заболевания. В этом исследовании на 324 пациентах с АДПП 1 из 80 семей показано, что 5' локализация мутаций приводит к развитию терминальной стадии почечной недостаточности на 3 года ранее, чем 3' локализация (53 и 56 лет, соответственно), однако прямая зависимость от типа мутации не установлена [Rossetti et al., 2002]. Известно также, что пациенты с 5' концевыми мутациями более склонны к внутричерепным аневризмам (ВЧА), в особенности те, у кого были геморрагические инсульты до 40-летнего возраста или есть семейная отягощенность по данной патологии [Rossetti et al., 2003]. У 461 пациента с АДПП 2 из 71 семьи также не выявлена зависимость фенотипа от типа и локализации мутаций [Magistrini et al., 2003].

Модифицирующие факторы. При АДПП наблюдается значительная внутрисемейная вариабельность симптомов заболевания. Например Геберт с соавторами [1995] показали на парах родители – дети, что у детей возраст достижения терминальной стадии ХПН может варьировать. Она может развиться как на 26,3 лет ранее, так и на 27,2 лет позже по сравнению с своими родителями [Geberth et al., 1995]. При анализе выяснилось, что возраст достижения терминальной стадии ХПН у родных братьев и сестер значительно вариабелен по сравнению с аналогичными данными у монозиготных близнецов, что говорит в пользу генетической обусловленности [Peral et al., 1996]. Описан случай с дизиготными близнецами, когда у одного из них отмечено ранее начало заболевания, а у другого - более типичное для АДПП течение [Peral et al., 1995]. Есть много исследований, касающихся воздействия генов-кандидатов. Хотя в более ранних публикациях есть данные о том, что вариант DD полиморфизма I/D гена ангиотензин-превращающего фермента (ACE) связан с более тяжелым течением АДПП [Peral et al., 1997], однако проведенный впоследствии мета-анализ данных большого числа исследований, посвященных этой проблеме, показал, что этот полиморфизм не влияет на исход [Pereira et al., 2006]. Тазон-Вега с соавторами [2007] опубликовали результаты исследования, целью которого являлось выявление ассоциации полиморфизма семи генов-кандидатов (NOS3- синтаза эндотелиального оксида азота, ACE – ангиотензин-превращающий фермент, TGFB-фактор роста опухоли β 1, BDKRB1 и BDKRB2- рецепторы брадикинина 1 и 2, EGFR-рецептор фактора эпидермального роста и PKD2) с возрастом развития терминальной стадии ХПН у 355 пациентов из 131 семьи с АДПП 1. Не установлена значительная связь прогрессирования заболевания с каким-либо из них [Tazon-Vega et al., 2007].

Роль негенетических факторов. Очевидно, что на почечные и внепочечные проявления АДПП воздействуют и негенетические факторы. Об этом свидетельствует, например,

тот факт, что кистозное поражение печени тяжелее протекает у женщин, особенно у тех, кто принимал гормональные контрацептивы, замещающую эстрогенную терапию и у кого в анамнезе многократные беременности [Sherstha et al., 1997]. Считают, что у мужчин при АДПП скорость увеличения размера кист выше, чем у женщин, и терминальная стадия ХПН при АДПП 2 возникает раньше у мужчин, что говорит о роли половых гормонов, как факторов, способных изменить течение болезни. Доказано, что кофеин способен повышать продукцию сАМР в кистобразующих клетках, тем самым стимулируя пролиферацию и секрецию жидкости [Belibi et al., 2002]. Курение также является фактором риска более быстрого прогрессирования почечного поражения и развития ХПН, особенно у мужчин [Orth et al., 1998]. Ожирение способствует развитию протеинурии и терминальной стадии ХПН. Влияние изменений в диете у пациентов с АДПП, такие как снижение количества потребляемого белка или использование льняного масла, показавшие положительные результаты на моделях животных, либо не подтвердились, либо вовсе не изучались у человека [Klahr et al., 1995].

Молекулярная диагностика АДПП. Диагностика заболевания в большинстве случаев основывается на данных анализа родословной и УЗИ почек. Однако развитие кист возраст-зависимый процесс, поэтому у лиц моложе 30 лет, а так же у тех, кто имеет АДПП2 (отличающийся более поздним началом и более легким течением), могут иметь место неоднозначные данные УЗИ, или ложноотрицательные ответы [Ravine et al., 1994, Hateboer et al., 1999]. В таких случаях для более точного диагноза оправдано проведение молекулярно-генетического тестирования, значимость которого особенно высока для оценки потенциальных доноров почек. С развитием новых подходов лечения АДПП, эффективность которых будет тем выше, чем раньше они будут назначены, возникнет необходимость в максимально ранней постановки диагноза, еще до развития кист в почках, соответственно актуальность молекулярной диагностики при АДПП еще более повысится [Torres, 2004, Grantham et al., 2006, Walz, 2006].

Анализ сцепления требует участие не менее двух (а лучше нескольких) пораженных членов семьи, что не всегда возможно. Соответственно, при наличии только одного больного в семье и в случаях мутаций *de novo*, использование этого метода невозможно.

Прямое секвенирование ДНК - наиболее подходящий метод исследования и обеспечивает выявление мутаций в $\approx 78-90\%$ случаев [Rosetti et al., 2007, Garcia-Gonzalez et al., 2007]. Однако в связи с тем, что большинство мутаций уникальны для конкретной семьи, и одна – треть выявляемых PKD мутаций представляют из себя missense варианты, патогенность некоторых изменений трудно доказать.

Делеционно-дупликационный анализ. Для выявления делеций/дупликаций могут быть использованы такие методы, как качественный ПЦР, ПЦР длинных фрагментов (long-

range PCR), метод мультиплексной амплификации (multiplex ligation dependent probe amplification-MLPA), матричная геномная гибридизация (array genomic hybridization). Частота выявления делеций/дупликаций составляет $\approx 4\%$ при PKD1 и $\approx 1\%$ при PKD2 [Consugar et al 2008].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.
2. Ariza M, Alvarez V, Marin R, Aguado S, Lopez-Larrea C, Alvarez J, Menendez MJ, Coto E: A family with a milder form of adult dominant polycystic kidney disease not linked to the PKD1 (16p) or PKD2 (4q) genes. *J Med Genet* 34: 587–589, 1997
3. Baboolal K, Ravine D, Daniels J, Williams N, Holmans P, Coles GA, Williams JD: Association of the angiotensin I converting enzyme gene deletion polymorphism with early onset of ESRF in PKD1 adult polycystic kidney disease. *Kidney Int* 52: 607–613, 1997
4. Belibi FA, Wallace DP, Yamaguchi T, Christensen M, Reif G, Grantham JJ: The effect of caffeine on renal epithelial cells from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 2723–2729, 2002
5. Bergmann C., Zerres K.: Polycystic Kidney Disease: ADPKD and ARPKD//*Comprehensive Pediatric Nephrology- edited by Denis F. Geary, Franz Schaefer-Mosby Elsevier, /P:155-178;2008*
6. Bogdanova N, Markoff A, Gerke V, McCluskey M, Horst J, Dworniczak B: Homologues to the first gene for autosomal dominant polycystic kidney disease are pseudogenes. *Genomics*; 74: 333–341. 2001
7. Chapman AB, Guay-Woodford LM, Grantham JJ, Torres VE, Bae KT, Baumgarten DA, Kenney PJ, King BF Jr, Glockner JF, Wetzel LH, Brummer ME, O'Neill WC, Robbin ML, Bennett WM, Klahr S, Hirschman GH, Kimmel PL, Thompson PA, Miller JP; Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease cohort. Renal structure in early autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): The Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease (CRISP) cohort. *Kidney Int. Sep;64(3):1035-45. 2003*
8. Consugar MB, Wong WC, Lundquist PA, Rossetti S, Kubly VJ et al. CRISP Consortium; Characterization of large rearrangements associated in autosomal dominant polycystic kidney disease and the PKD1/TSC2 contiguous gene syndrome. *Kidney Int. 2008; 74: 1468–79*
9. Daoust M, Reynolds D, Bichet D, Somlo S: Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* 25: 733–736, 1995
10. De Almeida S, de Almeida E, Peters D, Pinto JR, Tavora I, Lavinha J, Breuning M, Prata MM: Autosomal dominant polycystic kidney disease: Evidence for the existence of a third locus in a Portuguese family. *Hum Genet* 96: 83–88, 1995
11. Driscoll JA, Bhalla S, Liapis H, Ibricevic A, Brody SL. Autosomal dominant polycystic kidney disease is associated with an increased prevalence of radiographic bronchiectasis. *Chest. May;133(5):1181-8. 2008*
12. Foggensteiner L, Bevan AP, Thomas R, et al. Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the PKD2 gene. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 814–27; 2000
13. Garcia-Gonzalez MA, Jones JG, Allen SK, Palatucci CM, Batish SD, Seltzer WK, Lan Z, Allen E, Qian F, Lens XM, Pei Y, Germino GG, Watnick TJ. Evaluating the clinical utility of a molecular genetic test for polycystic kidney disease. *Mol Genet Metab. Sep-Oct;92(1-2):160-7. 2007*
14. Geberth S, Ritz E, Zeier M, Stier E: Anticipation of age at renal death in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD)? *Nephrol Dial Transplant* 10: 1603–1606, 1995
15. Geng L, Segal Y, Pavlova A, et al. Distribution and developmentally regulated expression of murine polycystin. *Am. J. Physiol.*; 272: F451–9.
16. Geng L, Segal Y, Peissel B, et al. Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. *J. Clin. Invest.* 98: 2674–82; 1996

17. Grantham JJ, Torres VE, Chapman AB, Guay-Woodford LM, Bae KT, King BF Jr, Wetzel LH, Baumgarten DA, Kenney PJ, Harris PC, Klahr S, Bennett WM, Hirschman GN, Meyers CM, Zhang X, Zhu F, Miller JP. Volume progression in polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 354(20):2122–30. 2006
18. Harris PC, Bae K, Rossetti S, Torres VE, Grantham JJ, Chapman A, Guay-Woodford L, King BF, Wetzel LH, Baumgarten D, Kenney PJ, Consugar M, Klahr S, Bennett WM, Meyers CM, Zhang Q, Thompson PA, Zhu F, Miller JP: Cyst number but not the rate of cystic growth is associated with the mutated gene in ADPKD. *J Am Soc Nephrol* 17: 3013–3019, 2006
19. Harris PC, Thomas S, MacCarthy AB, et al. A large duplicated area in the polycystic kidney disease 1 (PKD1) region of chromosome 16 is prone to rearrangement. *Genomics*; 23: 321-30. 1994
20. Hateboer N, v Dijk MA, Bogdanova N, Coto E, Saggat-Malik AK, San Millan JL, Torra R, Breuning M, Ravine D. Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet.*; 353: 103–7. 1999
21. Hayashi T, Mochizuki T, Reynolds DM, et al: Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2). *Genomics* 44:131, 1997.
22. Hidaka S, Konecke V, Osten L, Witzgall R. PIGEA-14, a novel coiled-coil protein affecting the intracellular distribution of polycystin-2. *J. Biol. Chem.*; 279: 35009-16. 2004
23. Huang AL, Chen X, Hoon MA et al. The cells and logic for mammalian sour detection. *Nature*. 442: 934-8:2006
24. Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millan JL, Gamble V, Harris P: The polycystic kidney disease 1 gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* 10 :151 –160,1995
25. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Dackowski WR, Foggensteiner L, et al. Polycystin: *In vitro* synthesis, *in vivo* tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; 94: 6397-402. 1997
26. Igarashi P, Somlo S; Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease, *J Am Soc Nephrol* 13;2384-98,2002.
27. Kiselyov K., Soyombo A., Muallem S. TRPpathies. *J. Physiol.*578:641-53;2007
28. Klahr S, Breyer JA, Beck GJ, Dennis VW, Hartman JA, Roth D, Steinman TI, Wang S-R, Yamamoto ME: Dietary protein restriction, blood pressure control, and the progression of polycystic kidney disease. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *J Am Soc Nephrol* 5: 2037–2047, 1995
29. Li A, Tian X, Sung SW, Somlo S. Identification of two novel polycystic kidney disease 1-like genes in human and mouse genomes. *Genomics*; 82: 498-500. 2003
30. Lu W, Peissel B, Babakhanlou H, Pavlova A, Geng L, Fan X, Larson C, Brent G, Zhou J. Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted Pkd1 mutation. *Nat Genet.* Oct;17(2):179-81. 1997
31. Luo Y, Vassilev PM, Li X, Kawanabe Y, Zhou J. Native polycystin 2 functions as a plasma membrane Ca²⁺-permeable cation channel in renal epithelia. *Mol. Cell. Biol.*; 23: 2600-7. 2003
32. MacRae Dell K., Sweeney W.E.: Polycystic Kidney Disease//*Pediatric Nephrology-Sixth edition*-edited by Ellis D. Avner, William E. Harmon, Patrick Niaudet, Norishige Yoshikawa-Springer, /P:849-887; 2009
33. Magistroni R, He N, Wang K, Andrew R, Johnson A, Gabow P, Dicks E, Parfrey P, Torra R, San-Millan JL, Coto E, Van Dijk M, Breuning M, Peters D, Bogdanova N, Ligabue G, Albertazzi A, Hateboer N, Demetriou K, Pierides A, Deltas C, St George-Hyslop P, Ravine D, Pei Y: Genotype-renal function correlation in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 14: 1164–1174, 2003
34. Markowitz GS, Cai Y, Li L, et al. Polycystin-2 expression is developmentally regulated. *Am. J. Physiol.*; 277: F17-25. 1999
35. Martin J, Han C, Gordon LA, et al. The sequence and analysis of duplication-rich human chromosome 16. *Nature*; 432: 988-94. 2004

36. Michaud J, Russo P, Grignon A, Dallaire L, Bichet D, Rosenblatt D, Lamothe E, Lambert M: Autosomal dominant polycystic kidney disease in the fetus. *Am J Med Genet* 51: 240–246, 1994
37. Nilius B., Owsianik G., Voets T., Peters J.A., Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol. Rev.* :87: 165-217: 2007
38. Obermuller N, Gallagher AR, Cai Y, et al. The rat Pkd2 protein assumes distinct subcellular distributions in different organs. *Am. J. Physiol.*; 277: F914-25. 1999
39. Orth SR, Stockmann A, Conradt C, Ritz E, Ferro M, Kreusser W, Piccoli G, Rambausek M, Roccatello D, Schafer K, Sieberth HG, Wanner C, Watschinger B, Zucchelli P: Smoking as a risk factor for end-stage renal failure in men with primary renal disease. *Kidney Int* 54: 926–931, 1998
40. Palsson R, Sharma CP, Kim K, McLaughlin M, Brown D, Arnaout MA. Characterization and cell distribution of polycystin, the product of autosomal dominant polycystic kidney disease gene 1. *Mol. Med*; 2: 702-11. . 1996
41. Paterson A, Pei Y: A third gene for autosomal dominant polycystic kidney disease? *Kidney Int* 54: 1759–1761, 1998
42. Paterson AD, Wang KR, Lupea D, St George-Hyslop P, Pei Y. Recurrent fetal loss associated with bilineal inheritance of type 1 autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* Jul;40(1):16-20. 2002
43. Pazour GJ, San Agustin JT, Follit JA, Rosenbaum JL, Witman GB. Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. *Curr. Biol.*; 12: P378-80. 2002
44. Pei Y, Paterson AD, Wang KR, He N, Hefferton D, Watnick T, Germino G, Parfrey P, Somlo S, St. George-Hyslop P: Bilineal disease and trans-heterozygotes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Hum Genet* 68:355–363, 2001
45. Peral B, Gamble V, San Millan JL, Strong C, Sloane-Stanley J, Moreno F, Harris PC: Splicing mutations of the polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene induced by intronic deletion. *Hum Mol Genet* 4: 569–574, 1995
46. Peral B, Gamble V, Strong C, et al. Identification of mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease 1 gene (*PKD1*) by a novel approach. *Am. J. Hum. Genet.*; 60: 1399-410. 1997
47. Peral B, Ong ACM, San Millan JL, Gamble V, Rees L, Harris PC: A stable, nonsense mutation associated with a case of infantile onset polycystic kidney disease 1 (*PKD1*), *Hum Mol Genet* 5: 539–542, 1996
48. Pereira TV, Nunes AC, Rudnicki M, et al. Influence of ACE I/D gene polymorphism in the progression of renal failure in autosomal dominant polycystic kidney disease: a meta-analysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006; 21: 3155-63
49. Peters DJM, van de Wai A, Spruit L, et al. Cellular localization and tissue distribution of polycystin-1. *J. Pathol.*; 188:439-46. 1999
50. Qian F, Watnick TJ, Onuchic LF, Germino GG. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell.* Dec 13;87(6):979-87. 1996
51. Qian Q, Li M., Cai Y. et al Analysis of the polycystins in aortic vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol.*-vol.14.;2280-2287;2003
52. Ravine D, Gibson RN, Walker RG, Sheffield LJ, Kincaid-Smith P, Danks DM. Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease 1. *Lancet.*; 343: 824–7. 1994
53. Rossetti S, Burton S, Strmecki L, Pond GR, San Millan JL, Zerres K, Barratt TM, Ozen S, Torres VE, Bergstralh EJ, Winearls CG, Harris PC: The position of the polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene mutation correlates with the severity of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 1230–1237, 2002
54. Rossetti S, Chauveau D, Kubly V, Slezak J, Saggari-Malik A, Pei Y, Ong AC, Stewart F, Watson ML, Bergstralh EJ, Winearls CG, Torres VE, Harris PC: Association of mutation-

- position in polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene and development of a vascular phenotype. *Lancet* 361:2196–2201, 2003.
55. Rossetti S, Consugar MB, Chapman AB, Torres VE, Guay-Woodford LM et al. CRISP Consortium; Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.*; 18: 2143–60. 2007
 56. Rossetti S, Strmecki L, Gamble V, Burton S, Sneddon V, Peral B, Roy S, Bakkaloglu A, Komel R, Winearls CG, Harris PC: Mutation analysis of the entire PKD1 gene: Genetic and diagnostic implications. *Am J Hum Genet* 68:46–63, 2001
 57. Scheffers MS, van der BP, Prins F, et al. Polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease 1 gene, co-localizes with desmosomes in MDCK cells. *Hum. Mol. Genet.*; 9: 2743–50. 2000
 58. Sherstha R, McKinley C, Russ P, Scherzinger A, Bronner T, Showalter R, Everson GT: Postmenopausal estrogen therapy selectively stimulates hepatic enlargement in women with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hepatology* 26: 1282–1286, 1997
 59. Stefan Somlo, Lisa M. Guay-Woodford: Polycystic Kidney Disease // Genetic Diseases of the Kidney—edited by Richard P. Lifton, Stefan Somlo, Gerhard H. Giebisch, Donald W. Seldin, P: 393–424; 2009
 60. Tazon-Vega B, Vilardell M, Perez-Oiler L, et al. Study of candidate genes affecting the progression of renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease type 1. *Nephrol. Dial. Transplant.*; 22: 1567–77. 2007
 61. Torra R, Badenas C, Darnell A, Nicolau C, Volpini V, Revert L, Estivill X. Linkage, clinical features, and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease types 1 and 2. *J Am Soc Nephrol.* Oct;7(10):2142–51. 1996
 62. Torra R, Badenas C, Perez-Oiler L, et al. Increased prevalence of polycystic kidney disease type 2 among elderly polycystic patients. *Am. J. Kidney Dis.*; 36: 728–34. 2000
 63. Torres VE. Therapies to slow polycystic kidney disease. *Nephron Exp Nephrol*;98(1):P1–7. 2004
 64. Turco AE, Clementi M, Rossetti S, Tenconi R, Pignatti P: An Italian family with autosomal dominant polycystic kidney disease unlinked to either the *PKD1* or *PKD2* gene. *Am J Kidney Dis* 28: 759–761, 1996
 65. Walz G. Therapeutic approaches in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): is there light at the end of the tunnel? *Nephrol Dial Transplant*;21(7):1752–7. 2006
 66. Watnick T, Piontek K, Cordal T, et al. An unusual pattern of mutation in the duplicated portion of PKD1 is revealed by use of a novel strategy for mutation detection. *Hum. Mol. Genet.*; 6: 1473–81 1997.
 67. Wilson PD; Polycystic kidney disease, *N Engl J Med* 350:151–64, 2004.
 68. Wu G., Markowitz GS, Li L, D'Agati VD, Factor SM, Geng L, Tibara S, Tuchman J, Cai Y, Park JH, van Adelsberg J, Hou H Jr, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S. Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in *Pkd2*. *Nat Genet.* Jan;24(1):75–8. 2000
 69. Wu GQ, Hayashi T, Park JH, et al. Identification of the human PKD2-related cDNA, *PKD2L*: tissue-specific expression and linkage mapping on chromosome 10q25. *Genomics*; 54: 564–8. 1998.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СИНДРОМА В КЛИНИКЕ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Афанасьев Ю.И., Кузубова А.В., Григорова С.Ю.

Белгородская областная клиническая больница святителя Иоасафа

РЕЗЮМЕ: Иммуновоспалительный синдром - важнейшее звено в патогенезе атеросклеротического поражения коронарных сосудов. По концентрации интерлейкина-6, фактора некроза опухоли- α , С-реактивного белка проведена клиническая оценка уровня иммуновоспалительного процесса при ишемической болезни сердца в ассоциации с фенотипическими особенностями больных. Определена провоцирующая роль фенотипа SS C'3-компонента комплемента в формировании предрасположенности к развитию ИБС и протекторная значимость в этом процессе фенотипа C'3 FS. Установлена предикторная роль высоких показателей С-реактивного белка в развитии атеросклеротического процесса в коронарных сосудах и инициации рестеноза после внутрикоронарного стентирования. Выявлены особенности иммуновоспалительного ответа в динамике эндоваскулярных вмешательств у больных ишемической болезнью сердца. Показана роль генетической детерминации иммуновоспалительного процесса как в инициации атеросклеротического процесса в коронарных сосудах, так и в его прогрессировании после проведения корригирующих внутрикоронарных процедур.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, иммуновоспалительный процесс, рестеноз, интерлейкин-6, фактор некроза опухоли- α , С-реактивный белок, C'3-компонент комплемента, группоспецифический компонент витамина D-связывающего протеина, трансферрин, гаптоглобин, ангиопластика коронарных сосудов.

SUMMARY: According to interleukin -6 concentration, α -tumor necrosis factor, C- reactive protein, an in-patient evaluation of immunoinflammation process of ischemic heart disease in association with phenotypic features of people suffering from ischemic heart disease (IHD) was held. A C'3 – SS – phenotype provocative significance in aptitude to IHD development and a C'3-FS - phenotype tyre-tread role in this process were determined. A C- reactive protein concentration growth in examined patients' group was established. An increase of C- reactive protein initial level in patients with ischemic heart disease in endovascular intervention from above 9 milligram per moth predetermines restenosis development risk after intracoronary correction realization. Immunoinflammatory response peculiarities in endovascular interference dynamics in patients ill with IHD were developed. An immunoinflammatory process genetic determination role either in the atherosclerotic process initiation in coronary vessel than in its germination after corrective intracoronary procedures was shown.

Key words: ischemic heart disease, angioplasty, interleukin-6 restenosis, α -tumor necrosis factor, C- reactive protein third sawder component, haptoglobin, group-specific component vitamin – D adhesive protein, transferrin.

В последние годы произошла переоценка ключевых положений патогенеза коронарной болезни сердца с позиций развития иммунного воспаления в сосудистой стенке [1, 4, 8]. Установлено, что атеросклероз по многим признакам подобен хроническому воспалительному процессу [8, 9, 12, 13] с участием медиаторов воспаления, активно продуцируемых в зонах формирования атеросклеротической бляшки и обеспечивающих различные клеточные реакции в очаге ишемии [11, 14]. С целью поиска причин инициации и распространения атеросклеротического процесса и выявления лиц с высокой степенью риска его развития представляется оправданной оценка иммуновоспалительного компонента в клинике ИБС на уровне интерлейкина-6 (ИЛ-6), фактор некроза опухоли- α (α -ФНО) и С-реактивного белка (СРБ) в сопоставлении с фенотипическими особенностями организма [6, 15, 16] в рамках таких общебиологических маркеров, участвующих в иммунорегуляторных функциях, как

гаптоглобин (Hr), C³ -компонент комплимента (C³), трансферрин (Tf), группоспецифический компонент витамин Д-связывающего протеина (Gc).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследованы 97 лиц, страдающих ишемической болезнью сердца. Средний возраст исследуемых $53,65 \pm 7,79$ года. Давность заболевания обследуемых лиц составила в среднем $5,25 \pm 1,59$ года. Критериями включения в исследование являлись наличие стенокардии напряжения, коронарного атеросклероза, подтвержденного с помощью селективной коронароангиографии, низкая приверженность пациентов к назначенной терапии статинами в догоспитальном периоде. Диагноз ИБС установлен в соответствии с рекомендациями ВНОК (2008г.) [3].

Селективная коронарография выполнялась по методике М.Р. Judkins на аппарате Coroscor- Nicor Siemens (Германия). Определялась степень стенозирования просвета сосуда в процентах и отмечалась локализация стеноза относительно сегментов трех магистральных артерий системы кровоснабжения миокарда. Гемодинамически значимым считали сужение просвета сосуда не менее 50% диаметра.

С-реактивный белок (СРБ) определяли иммунотурбидиметрическим методом на аппарате Кобас-Интегро – 400 (Roche). Интерлейкин – 6 (ИЛ-6) и фактор некроза опухоли- α (α – ФНО) определялись иммуноферментным методом, согласно инструкции завода – производителя. Нормальная концентрация ИЛ-6 в плазме доноров крови не превышала 25,9 нг/мл, α – ФНО – 2,5 нг/мл. Идентификация генетических полиморфных систем Hr, C³, Tf, Gc проводилась методом вертикального электрофореза в нативных условиях в 7,5% полиакриламидном геле на электрофоретической ячейке PROTEAN II xi 2-D фирмы BIO-RAD [2].

Всем пациентам по показаниям проведено внутрикоронарное стентирование с использованием стентов с изолированными металлическими (63 пациента) и пропитанными лекарственными препаратами (34 пациента) конструкциями. Коронароангиография выполнялась также через 6 месяцев у пациентов после проведенного стентирования в качестве контрольного исследования для определения функциональной состоятельности стента и выявления группы больных с рестенозом. При повторном коронарографическом исследовании у 15 пациентов выявлены признаки коронарного рестеноза в зоне вмешательства.

Анализ уровня изучаемых цитокинов проводился в сравнении с контрольной группой, включавшей в себя 25 практически здоровых лиц, сопоставимых по возрасту и полу, средний возраст которых составил $47 \pm 8,6$ лет. При проведении анализа частотных характеристик фенотипов заявленных генетических локусов у больных ИБС в качестве контроля выступали 100 практически здоровых доноров.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2003, Statistica (v. 6.0), SPSS for Windows (v. 13.0) и компьютерной программы S&R (Columns&Rows). Статистический анализ проведен методами параметрической статистики. Вычисляли средние арифметические значения (M), ошибки средних величин (m). Для оценки значимости различий использовали критерий t Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. В генетических исследованиях для определения статистически значимых ассоциаций между двумя признаками использовали критерий χ^2 . Мера связи определялась показателем относительного риска (RR). Значимой положительной ассоциацией принят относительный риск, превышающий 2. При значении $RR < 1,0$, ассоциированные с патологией аллели рассматривали как протекторы болезни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке иммуновоспалительного компонента в клинике ИБС на уровне ИЛ-6, α -ФНО и СРБ у исследуемых больных ИБС регистрировался исходно повышенный уровень СРБ и ИЛ-6 (рис.1), что согласуется с данными литературы [4, 6].

При сопоставлении исходного уровня воспалительных маркеров и провоспалительных цитокинов с количеством пораженных коронарных сосудов обнаружено увеличение уровня СРБ у пациентов со стенозированием двух и более венечных артерий (рис. 2).

Концентрация ИЛ-6 и α -ФНО не в полной мере отражала количественную распространенность атеросклеротического процесса в коронарных сосудах. Исследование значений провоспалительных маркеров в динамике чрескожных внутрикоронарных вмешательств (ЧКВ) выявило достоверный рост уровня СРБ в ранние сроки после эндоваскулярного вмешательства (рис.3). У пациентов с двух- и многососудистым поражением коронарного русла после ЧКВ обнаруживался также рост значений ИЛ-6 (рис.4).

Представлялось целесообразным оценить уровень иммуновоспалительного процесса в контингенте лиц с развившимся после ЧКВ рестенозом, и без него. Из исследуемого спектра провоспалительных маркеров статистически значимым прогностическим признаком в направлении инициации рестеноза оказался исходно повышенный уровень СРБ (рис.5). Как показал однофакторный анализ, исходно повышенный уровень СРБ ($>9,0$ мг/л) был значимым предиктором возвратной стенокардии ($\chi^2 = 8,4$, $p < 0,05$). Концентрации ИЛ-6 в подгруппах больных с рестенозом и без него были близкими через 6 месяцев после ЧКВ.

Полученные данные убедительно показывают, что, с одной стороны, высокие показатели СРБ являются отражением воспалительного процесса с локализацией в коронарных сосудах, а с другой стороны, плановое проведение ЧКВ в фазу активного воспалительного процесса в атеросклеротической бляшке поддерживает исходный высокий потенциал воспалительного компонента, что в комплексе с другими неблагоприятными факторами, такими как артериальная гипертензия, сахарный диабет и др., может являться ощутимым предикто-

ром как развития рестеноза, так и распространения атеросклероза по всей системе коронарных сосудов.

У исследованных больных ИБС с подтвержденным коронароангиографией стенозирующим атеросклерозом венечных артерий было выявлено следующее распределение фенотипов в системах Hр, Tf, CG, C'3 (рис. 6):

Как видно из представленных на рисунке данных у больных ИБС наблюдалось накопление фенотипа SS локуса C'3 ($\chi^2 = 19,3$; $p < 0,0001$; $RR = 4,1$; $p < 0,0001$). В то же время встречаемость фенотипа FS, рассматриваемого локуса в группе больных ИБС была более чем в 2 раза ниже в сравнении с показателями альтернативной группы здоровых лиц ($p < 0,0001$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что фенотип SS локуса C'3 является генетическим маркером предрасположенности индивидуума к развитию ИБС. В противоположность этому фенотип FS локуса C'3 обладает протекторным свойством в механизме развития атеросклеротического поражения коронарных сосудов. В пользу этого говорят и результаты сопоставления частотных характеристик исследуемых локусов с иными патологическими состояниями и иным патогенезом, в частности, хроническим обструктивным бронхитом и сахарным диабетом [7]. Следует отметить, что, как видно из рис. 7, по мере вовлечения в патологический процесс нескольких коронарных сосудов возрастала число структур, обладающих протективным действием.

В группе больных с развившимся через 6 месяцев коронарным рестенозом в зоне вмешательства выявлялось частотное распределение фенотипов, аналогичное общей группе больных ИБС: накопление фенотипа C'3 SS и снижение встречаемости фенотипа C'3 FS. У больных с развившимся рестенозом в зоне эндоваскулярного вмешательства зарегистрировано уменьшение частоты фенотипа Tf CC только при сопоставлении с контрольной группой здоровых лиц (табл.1). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии генетических маркеров предрасположенности к развитию рестеноза после ЧКВ по исследуемым локусам и в большей степени позволяют говорить о найденных предикторах инициации атеросклеротического процесса в коронарных сосудах в целом.

В целях поиска конкретных механизмов реализации генетической предрасположенности или устойчивости индивидуума к развитию атеросклеротического процесса в коронарных сосудах и возникновению рестеноза после ЧКВ, у больных ИБС проведен анализ уровня воспалительных маркеров и провоспалительных цитокинов в ассоциации с фенотипическими маркерами предрасположенности к инициации ИБС.

Сопоставлением показателей провоспалительных маркеров в зависимости от фенотипа C'3 обнаружено увеличение исходных значений СРБ в группе больных с фенотипом C'3 SS по сравнению с группой C'3 FS-позитивных индивидуумов (рис.8).

Результаты исследования, приведенные в таблице 2, указывают на более выраженный уровень воспалительной реакции в ранние сроки после ЧКВ у С'3 SS - позитивных больных. В этой группе лиц содержание СРБ после ЧКВ оказалось в 3 раза выше в сравнении с С'3 SS-негативными индивидами ($p < 0,05$). В обеих группах отмечается значительный ($p < 0,05$) подъем концентрации ИЛ-6 после ЧКВ.

Дальнейший анализ показал, что в группе С'3 SS-позитивных больных, с развившимся через 6 месяцев рестенозом, исходно регистрировалось увеличение концентрации СРБ в сравнении с пациентами без рестеноза (табл. 3).

При анализе уровня провоспалительных маркеров у FS + больных ИБС при благоприятном после эндоваскулярной процедуры течении заболевания оказалось, что при наличии фенотипа С'3 FS уровень СРБ как исходный, так и инициированный эндоваскулярным вмешательством был достоверно ниже в сравнении с показателями оппозитной выборки С'3 FS-негативных индивидов (табл.4).

Полученные данные свидетельствуют в пользу существования у больных ИБС генетически детерминированного пути развития иммуновоспалительного процесса на уровне цитокинов и инициированного ими СРБ, что подтверждает научную и практическую значимость оценки вклада фенотипических особенностей больных ИБС, как в формирование отдельных звеньев патогенеза атеросклероза, так и в инициации прогрессирования атеросклеротического процесса в динамике ЧКВ, требующего усиления превентивного фармакотерапевтического сопровождения высокотехнологических методов лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ардаматский, Н.А. Показатели инфекционного процесса при атеросклерозе / Н.А. Ардаматский, Ю.В. Абакумова // Российский кардиологический журнал. - 1998.- №6.- С.3.
2. Гааль, Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул: пер. с англ. / Э. Гааль, Г. Медьеш, Л. Верецкий.- М.: «Мир», 1982.- С. 40-48.
3. Диагностика и лечение стабильной стенокардии. Российские рекомендации (второй пересмотр). – М., 2008.- С.9-20.
4. Карпов, Р.С. Атеросклероз: некоторые современные вопросы патогенеза, диагностики, лечения и профилактики / Р.С. Карпов, В.А. Дудко //Клиническая медицина.- 1999.- № 12.- С.9-13.
5. Кашкин, К.П. Белки системы комплимента: Свойства и биологическая активность (Лекция) / К.П. Кашкин, Л.Н. Дмитриева // Клиническая лабораторная диагностика.- 2000.-№7.-С.25-32.
6. Коряков, А.И. Прогностическая оценка неблагоприятного коронарного атеросклероза / А.И. Коряков // Клиническая медицина. -2005.-№12.- С. 25-28.
7. Кузьмина О.А. Клинико-генетические аспекты хронического обструктивного бронхита у больных сахарным диабетом/ О.А. Кузьмина, Ю.И. Афанасьев, М.И. Чурносков, И.Н. Костоглодова// Вестник РУДН.-2006.-VI (25).-С. 50-53.
8. Нагорнев, В.А. Цитокины, иммунное воспаление и атеросклероз / В.А. Нагорнев, Е.Г. Зота // Успехи современной биологии. -1996. – Т.2, №3. -С. 320-331.
9. Титов, В.Н. Общность атеросклероза и воспаления: специфичность атеросклероза как воспалительного процесса (гипотеза) / В.Н. Титов // Биохимия.- 2000.- № 4.- С.3-10.

10. Харрис, Г. Основы биохимической генетики человека: пер. с англ. / Г. Харрис. - М., 1973. - 250 с.
11. C-reactiv protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women / P. Ridker, C. Hennekens, J.E. Buring, N. Rifai // Engl.J. Med. - 2000. - Vol.342.-P.836-843.
12. C-reactiv protein and the severity of atherosclerosis in myocardial infarction patients with stable angina pectoris / M.C. Tatura, J. Heinrich, R. Junker et al. // Eur Heart J.- 2000.- Vol.21.-P.1000-1008.
13. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina / L.M. Biasucci, A.Vitelli, G. Liuzzo et al. // Circulation.- 1997.- Vol.96(6).-P.2099-101.
14. Fuster, V. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndrome / V. Fuster, J.J. Badimon, J.H. Cjesebro // N. Engl. J. Med. -1992.-Vol. 326.-P. 242-250.
15. Genetics of inflammation and rise of coronary artery disease: the central role of interleukin-6 / A. Woods, D.J. Brull, S.E. Humphries, H.E. Montgomery //Eur Heart J.- 2000.-№ 21.-P. 1574-1583.
16. Giblett, E.R. Haptoglobin / E.R. Giblett // Genetic markers in human blood.- Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1969.-P.55-71.
17. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease (An edited summary of a Clinical Staff Conference held on 13 March 1996 at the National Institutes of Health, Bethesda, MD) // Ann Intern Mtd. – 1998. – Vol. 128. – P. 127-137.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ

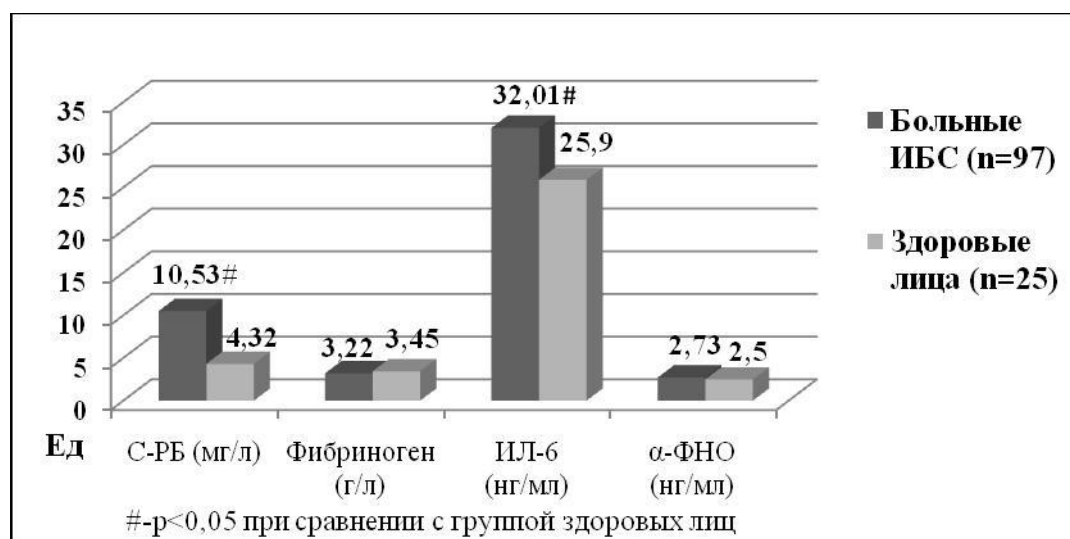


Рис. 1. Исходный уровень провоспалительных маркеров у пациентов с ИБС и здоровых лиц

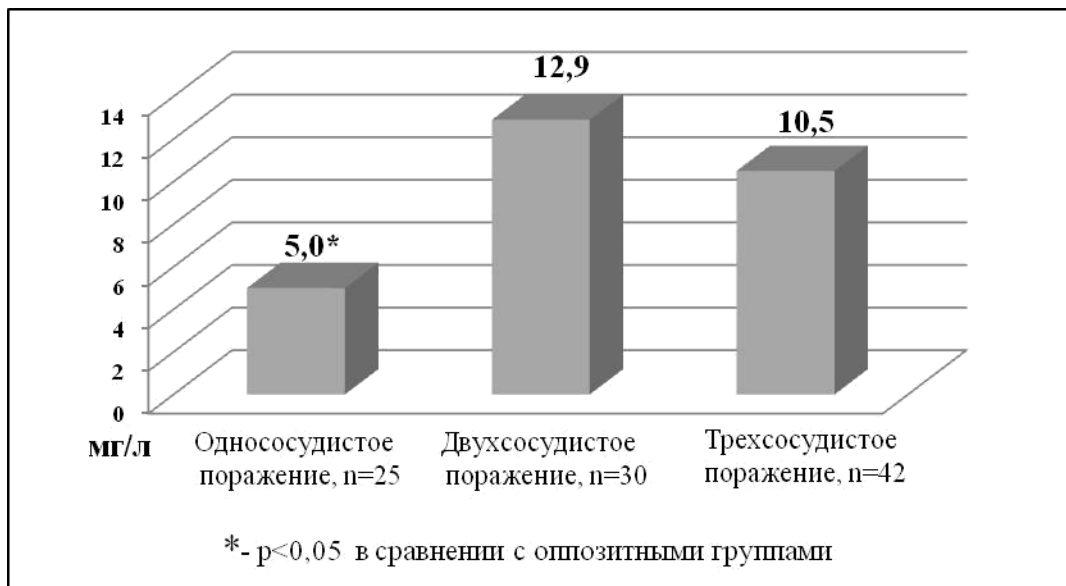


Рис. 2. Исходный уровень СРБ в зависимости от распространенности атеросклеротического процесса



Рис. 3. Уровень СРБ у больных ИБС с различной степенью выраженности коронарного атеросклероза через 7-10 дней после ЧКВ

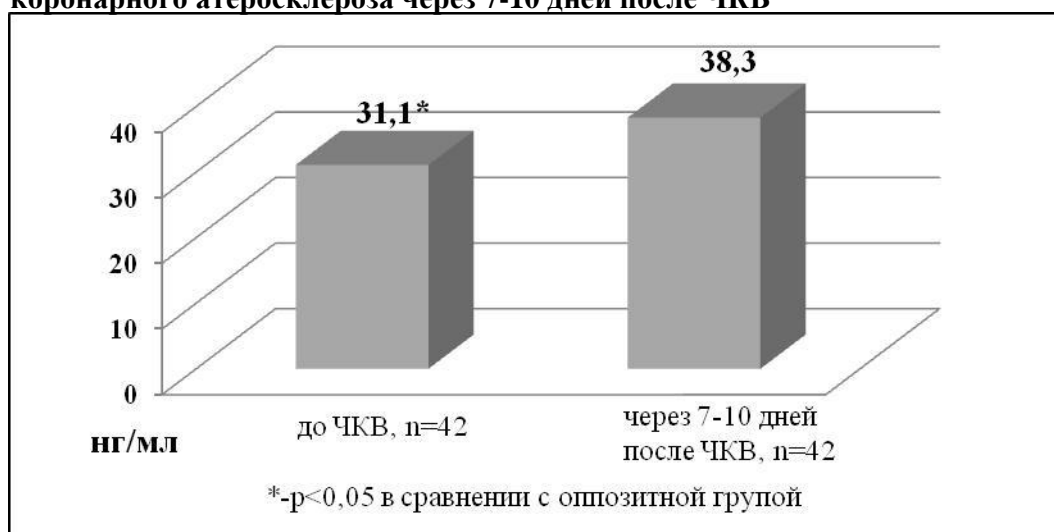


Рис. 4. Динамика уровня ИЛ-6 у пациентов с многососудистым поражением коронарного русла

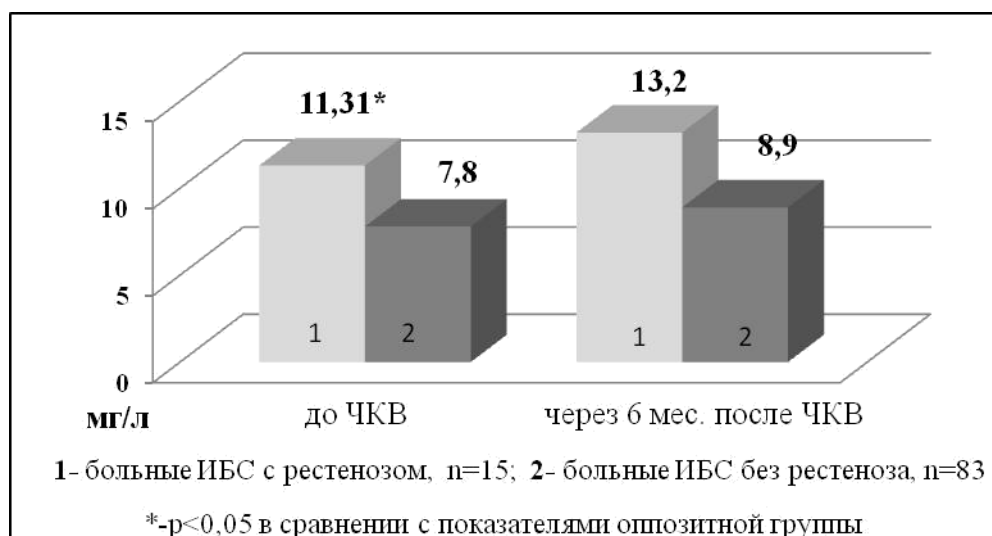


Рис. 5. Уровень СРБ у больных ИБС, подвергшихся ЧКВ, с осложненным (рестеноз) и неосложненным течением



Рис. 6. Распределение частот фенотипов (%) Hр, Gс, Тf, С'3 у больных ИБС и здоровых лиц



Рис. 7. Распределение частот фенотипов (%) Нр, Gc, Tf, C'3 у больных с многососудистым поражением коронарного русла и здоровых лиц



Рис. 8. Уровень CRP в зависимости от фенотипа C'3-компонента комплемента

Таблица 1

Распределение частот фенотипов (%) Нр, Tf, CG, C'3 у пациентов с развившимся коронарным рестенозом и без него

Локус	Фенотип	Рестеноз + (n=14)	Рестеноз – (n=83)	Здоровые (n=100)
Нр	1-1	0*	7,2	11,0
	1-2	42,9	44,6	48,0
	2-2	57,1	48,2	41,0
Gc	1-1	35,7	45,8	40,0
	1-2	57,1	43,4	49,0
	2-2	7,2	10,8	11,0
Tf	CC	85,7	100,0	94,0
	CB	14,3	0	6,0
C'3	SS	85,7*	80,7*	47,0
	FS	14,3*	18,1*	46,0
	FF	0	1,2	7,0

Примечания: * p < 0,05 в сравнении с контрольной группой.

Таблица 2

Динамика показателей фибриногена, СРБ и провоспалительных цитокинов у больных ИБС в зависимости от наличия SS локуса С'3

Исследованные показатели		С'3 SS +, n=78		С'3 SS -, n=19	
		до ЧКВ	через 7-10 дней после ЧКВ	до ЧКВ	через 7-10 дней после ЧКВ
		1	2	3	4
I	СРБ, (мг/л)	10,20±1,48	14,4±2,9	4,1±0,9	5,5±1,5
II	ИЛ-6, (нг/мл)	31,71±2,5	39,6±2,1	31,5±2,3	41,1±2,5
III	α -ФНО, (нг/мл)	1,1±0,2	1,0±0,2	1,1±0,2	1,7±0,5

Примечание: I - $p_{1-3} < 0,05$; $p_{2-4} < 0,05$; II - $p_{1-2} < 0,05$; $p_{3-4} < 0,05$.

Таблица 3

Исходные показатели провоспалительных маркеров в зависимости от наличия С 3SS-фенотипа у лиц с развившимся рестенозом

Показатели	Рестеноз +, С'3 SS + (M±m), n=11	Рестеноз -, С'3 SS - (M±m), n=15
	до ЧКВ	до ЧКВ
СРБ (мг/л)	14,9±2,1*	5,5±1,6
ИЛ-6 (нг/мл)	40,4±4,4	34,4±4,4
α -ФНО (нг/мл)	1,1±0,3	1,2±0,3

Примечание: * $p < 0,05$ в сравнении с показателями оппозитной группы

Таблица 4

Динамика провоспалительных маркеров у больных ИБС без рестеноза, имеющих фенотип FS локуса С'3

	Показатели	С'3 FS +, n=15, M±m		С'3 FS -, n=67, M±m	
		до ЧКВ	после ЧКВ	до ЧКВ	после ЧКВ
		1	2	3	4
I	СРБ (мг/мл)	4,1±1,0	5,6±1,7	9,9±1,7	14,8±3,5
II	ИЛ-6 (нг/мл)	28,0±6,9	32,1±7,6	35,0±2,4	41,9±2,5
III	α -ФНО (нг/мл)	1,0±0,2	1,7±0,5	1,2±0,3	1,1±0,2

Примечания: I $p_{1-3} < 0,05$; $p_{2-4} < 0,05$; II $p_{3-4} < 0,05$

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ЗАНЯТИЯМ СПОРТОМ

Ахметов И.И.

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия
420012, Казань, ул. Бутлерова 49
Санкт-Петербургский НИИ физической культуры, Санкт-Петербург, Россия
191040, Санкт-Петербург, Лиговский пр. 56, литера «Е»
Тел.: 8-965-586-76-25, e-mail: genoterra@mail.ru

РЕЗЮМЕ: В статье рассмотрены возможности молекулярно-генетической диагностики предрасположенности к занятиям спортом. Она позволяет оценить генетический потенциал в развитии и проявлении физических качеств, оптимизировать тренировочный процесс, индивидуализировать питание, а также способствует сохранению здоровья спортсмена.

SUMMARY: This review is to discuss facilities of molecular genetic diagnostics for assessing individual predisposition to sports. These include opportunities of evaluating the genetic potentials of the development and manifestation of physical qualities, optimization the training process, personalization of nutrition, and maintenance an athlete's health.

Практические приложения знаний о молекулярных механизмах, лежащих в основе индивидуальных различий в развитии и проявлении физических и психических качеств, связаны с тремя аспектами: спортивной ориентацией и отбором; оптимизацией и коррекцией тренировочного процесса и профилактикой заболеваний у спортсменов [1]. Как известно, неадекватный выбор вида спортивной деятельности сопровождается формированием нерациональной функциональной системы адаптации с большим числом лишних, неэффективных и даже нецелесообразных функциональных взаимосвязей, напряжением компенсаторных механизмов, затруднением восстановительных процессов, медленным развитием тренированности, менее успешным выступлением в соревнованиях и достижением высокого уровня спортивного мастерства, неутешительным прогнозом перспективности и, наконец, остановкой роста спортивного мастерства в связи с исчерпанием генетического резерва организма [3, 6]. Практика спортивной деятельности также показывает, что очень многие способные атлеты ушли из спорта, не раскрыв своих возможностей из-за того, что к ним была применена стандартная система подготовки, ориентированная на средние значения показателей и не учитывающая в должной мере их индивидуальные способности, функциональные резервы и адаптационные возможности. В тех случаях, когда специалистам оказывалось под силу реализовывать строго индивидуальную программу, спортсмены достигали выдающихся, как правило, стабильных в течение длительного времени результатов [5].

Трудовая деятельность, сопряженная с повышенными физическими нагрузками (профессиональные занятия спортом, работа шахтером, грузчиком, металлургом и т.д.) нередко приводит к развитию различных патологий. Чрезмерные пролонгированные спортивные физические нагрузки могут привести к длительной гиперфункции сердца с дальнейшим разви-

тием выраженной гипертрофии миокарда левого желудочка, которая не только препятствует росту спортивного мастерства, но и становится причиной формирования «бычьего» сердца и возникновения аритмий. В основе этой и других патологий могут лежать полиморфизмы генов, ассоциированных с деятельностью сердечно-сосудистой системы [4, 12].

В соответствии с поставленными задачами, можно выделить три направления практического приложения спортивной генетики (при условии разработки полноценных диагностических комплексов): а) определение предрасположенности детей и подростков к определенному виду двигательной деятельности, б) повышение роста спортивных показателей за счет оптимизации и коррекции тренировочного процесса, и в) профилактика различных заболеваний, связанных с профессиональной деятельностью спортсменов.

Проведение генетической диагностики в спорте делится на четыре последовательных этапа [1]:

1. Анкетирование.
2. Фенотипирование.
3. Забор и транспортировка биологического материала (венозная кровь, соскоб слизистой ротовой полости). Выделение ДНК из биоматериала и организация ее длительного хранения. Генотипирование нужных участков ДНК.
4. Интерпретация данных генотипирования и фенотипирования. Составление заключения специалиста и выдача рекомендаций.

Анкетирование со сбором полной информации об испытуемом и, при необходимости, о его родственниках (наличие спортивного разряда и стажа у его родителей, братьев и сестер, сведения о заболеваниях и т.п.) является неотъемлемой частью генетической диагностики. Анкетирование, как правило, включает в себя устный или письменный сбор следующих данных: ФИО, дата рождения, рост и вес обследуемого при рождении и на текущий момент; росто-весовые показатели отца и матери обследуемого, каким видом спорта занимается обследуемый (с указанием узкой специализации, например, плавание - 200-400 м; футбол – полузащитник и т.п.), какой у обследуемого разряд в этом виде спорта (например, I-й юношеский, II-й взрослый, кандидат в мастера спорта, заслуженный мастер спорта и т.п.), какой у обследуемого стаж занятий этим спортом (лет) и какое у него наивысшее достижение в этом виде спорта (например, чемпион города, России и т.д.); если обследуемый не занимается спортом, то какой у него тип и степень физической активности.

Помимо этого, обследуемый либо его родители, тренер, врач команды должны подробно описать цель обращения к спортивному генетику. Например, «подбор вида (видов) спорта», «определение склонности к занятиям конкретным видом спорта», «оптимизация тренировочного процесса» (для тех, кто определился с выбором спорта, но хочет знать, какие у него слабые и сильные стороны, какую узкую специализацию выбрать), «оптимизация

питания и фармакологического обеспечения тренировочной и соревновательной деятельности», другое (например, «сохранение здоровья и снижение риска заболеваний при занятиях спортом» или «как решить проблему с медленным набором мышечной массы», «как эффективнее развить выносливость», «как убрать лишний вес» и т.д.).

Фенотипирование. Важно подчеркнуть, что при решении вопросов спортивной специализации и отбора, оптимизации и коррекции тренировочного процесса, профилактики профессиональных заболеваний спортсменов, молекулярно-генетическое тестирование не может заменить фенотипическую диагностику, а может лишь дополнить и конкретизировать отдельные ее моменты. Связано это не только с тем, что на данный момент мы не располагаем всей информацией о генетических маркерах, ассоциированных с двигательной и психической деятельностью человека, но и с тем, что генетическая диагностика не распространяется дальше генотипа (она не позволяет установить промежуточный или конечный результат взаимодействия генотипа, эпигенетических модификаций и средовых факторов).

К наиболее распространенным в спорте видам фенотипической диагностики, которая проводится по показаниям, относятся:

- 1) антропометрия (оценка морфологического состояния, оценка функций и нарушений осанки и стопы, измерение минеральной плотности костной ткани и др.);
- 2) биохимическое обследование в покое, до, во время и после физической нагрузки (рН, лактат крови, гемоглобин, гематокрит, АЛТ (аланинаминотрансфераза), АСТ (аспартатаминотрансфераза), КФК (креатинфосфокиназа), мочевины и др.);
- 3) тестирование физической подготовленности (спироэргометрия, тест PWC₁₇₀, динамометрия, стабилметрия, педагогические тесты и др.);
- 4) функциональная диагностика (пульсометрия, измерение АД, ЭКГ, эхо-КГ, суточное мониторирование ЭКГ по Холтеру, проведение ортопробы, расчет вегетативного индекса и др.);
- 5) биомеханическое обследование;
- 6) психологические и психофизиологические тесты;
- 7) гистологические методы (биопсия мышечной ткани с выявлением состава мышечных волокон, определением биохимических показателей, выявлением степени экспрессии генов).

Кроме того, эпигенетическая диагностика (например, выявление метилированных участков генов, ассоциированных с изменением генной экспрессии) в будущем может в значительной мере дополнить генетическую и фенотипическую диагностику.

Интерпретация результатов генетического тестирования в спорте – ответственное и трудоемкое дело, которым должен заниматься подготовленный специалист (либо коллектив специалистов), обладающий знаниями в области молекулярной генетики человека, фи-

зиологии и биохимии мышечной деятельности, спортивной медицины и антропологии, а также разбирающийся в различных аспектах спортивной педагогики (вопросы отбора в спорте, спортивной тренировки, многолетней подготовки спортсменов и др.) и питания спортсменов.

Интерпретация должна проводиться на основе суммарного вклада генотипов и аллелей генов в определение наследственной предрасположенности к двигательной деятельности и к развитию профессиональных патологий спортсменов [8]. Вклад отдельных генотипов и аллелей генов в развитие физических качеств человека необходимо оценивать как на основе данных литературы, так и собственных данных, полученных на больших выборках российских спортсменов и контрольных групп. Специалисту важно иметь собственную базу данных, содержащую сведения об уникальных генотипах элитных спортсменов.

Несмотря на определенные успехи в открытии генов, влияющих на физическую активность человека [7, 10], результаты генетического тестирования пока не могут дать однозначного ответа на вопрос, будет ли данный индивид элитным спортсменом, и в каком виде спорта, поскольку неизученные полиморфизмы генов у конкретного индивида или существенные мутации его генома могут полностью нивелировать тот генетический потенциал, который был обнаружен на основе определения ограниченного спектра полиморфизмов генов-кандидатов. Так, например, вполне вероятно, что на основании детекции полиморфизмов генов *ACE*, *ACTN3*, *AMPD1*, *HIF1A*, *PPARA*, *PPARG*, *PPARGC1A*, *PPARGC1B* и *UCP2* можно заключить, что у человека не выявлена предрасположенность к скоростно-силовым видам спорта [1], однако врожденная мутация в гене миостатина, приводящая к чрезмерному росту мышечной массы [13], способна сделать из него штангиста экстра-класса.

Определение степени предрасположенности к занятиям спортом. В зависимости от носительства в количественном и качественном соотношении аллелей (генотипов), благоприятствующих какой-либо двигательной деятельности, у испытуемых можно определить несколько типов предрасположенности к развитию и проявлению физических качеств:

1) низкая предрасположенность к развитию и проявлению какого-либо физического качества (определяется на основании того, что среди большой выборки высококвалифицированных спортсменов отсутствуют носители такого минимального числа благоприятствующих конкретной деятельности аллелей, либо если у них отсутствуют найденные у испытуемого негативные мутации, влияющие на спортивный результат); означает, что имеется высокая вероятность того, что индивид не сможет преодолеть уровень мастера спорта в определенной группе видов, требующих преимущественного проявления какого-либо физического качества (выносливости, быстроты, силы, ловкости, гибкости). По всей видимости, к этой категории испытуемых по большей части будут относиться индивиды с негативными мутациями, вызывающими интолерантность к физическим нагрузкам;

2) умеренная предрасположенность – имеется относительная вероятность того, что индивид сможет достичь выдающихся результатов в той группе видов спорта, где требуется проявление определенного физического качества;

3) выраженная предрасположенность – большая вероятность того, что индивид сможет достичь выдающихся результатов в той группе видов спорта, где требуется проявление определенного физического качества;

4) ярко выраженная предрасположенность – очень большая вероятность того, что индивид сможет достичь выдающихся результатов в той группе видов спорта, где требуется проявление определенного физического качества.

Градация и наименование степеней предрасположенности к различным видам спортивной деятельности может варьировать (например, очень низкая, низкая, ниже среднего, средняя, выше среднего, высокая, очень высокая предрасположенность к развитию выносливости и т.п.), но при этом ее обозначение должно быть понятным для тех, кто воспользуется данной информацией.

Поскольку все генетические маркеры представляют разную диагностическую ценность, то в соответствии с функциональной значимостью определенных аллелей генов, ассоциированных со спортивной деятельностью, каждому аллелю можно присвоить условную единицу значимости – балл. Баллы вычисляются на основе экспериментальных данных (собственных и литературы).

Подбор видов спорта. На основании выявления предрасположенности к развитию и проявлению отдельных физических качеств (например, выраженная предрасположенность к развитию и проявлению выносливости + низкая предрасположенность к развитию и проявлению быстроты и силы), для испытуемого подбирается набор групп видов спорта, к которым он предрасположен (с учетом знаний о том, какие маркеры являются наиболее значимыми для конкретного вида спорта). В зависимости от приоритета и генетического потенциала индивида, этот набор должен включать в себя группы видов спорта 1-го (предпочитаемые виды спорта) и 2-го (альтернативные виды спорта) выбора.

Используя данные литературы и собственные данные о частоте аллелей различных генов у спортсменов, занимающихся разными видами спорта, можно определить оптимальные для конкретной двигательной деятельности сочетания аллелей и генотипов по многим генам-кандидатам. Например, для занятий лыжными гонками (15-50 км) оптимально следующее сочетание генотипов: *NFATC4* Ala/Gly (Gly/Gly), *PPARA* GG, *PPARD* TC (CC), *PPARGC1B* Ala/Pro (Pro/Pro), *PPP3R1* 5I/5I, *TFAM* Ser/Thr (Thr/Thr), *UCP2* Ala/Val (Val/Val), *UCP3* CT (TT), *VEGFA* GC (CC) [1]. При этом следует учитывать генотипы, ограничивающие развитие определенного признака. Например, среди элитных российских спринтеров

или штангистов отсутствуют носители неблагоприятного для развития быстроты и силы *ACTN3 XX* генотипа [11].

Необходимо признать существование индивидов, на которых стандартные физические нагрузки действуют как минимум нейтрально, не вызывая улучшения таких физических показателей, как максимальное потребление кислорода в результате длительных тренировок [9]. Этот факт свидетельствует об индивидуальных различиях в ответ на классические физические нагрузки, но еще не доказывает наличие очень низких спортивных способностей. По крайней мере, исследования с целью оптимизации тренировочного процесса с учетом индивидуальной генетической предрасположенности показали положительные результаты [3]. Также необходимо учитывать возможность того, что такие индивиды могут быть интолерантными к физическим нагрузкам из-за мутаций в ядерных и митохондриальных генах, и поэтому не могут быть отнесены в полной мере к здоровым лицам [10].

Индивидуальные заключения. В текст индивидуального заключения должны входить:

1) перечисление всех выявленных генотипов по изучаемым локусам ДНК. Эта информация носит конфиденциальный характер, так как содержит генетические данные индивида о его предрасположенности к спорту и о риске развития мультифакторных и других патологий. С этой информацией могут быть ознакомлены исключительно испытуемый и родители испытуемого, и - при наличии их разрешения, – личный (спортивный или семейный) врач и тренер;

2) интерпретационная часть: в соответствии с полученными генетическими данными предоставляется информация о предрасположенности индивида к развитию и проявлению физических качеств (можно также дать информацию по развитию промежуточных фенотипов, например, оценить состав мышечных волокон, определить, до каких пределов может осуществляться прирост МПК и т.п.), а также о риске развития различных патологических состояний и заболеваний (но только при запросе этих данных): гипертрофия миокарда левого желудочка (актуально для стайеров), внезапная сердечная смерть (футбол, хоккей), атеросклероз, посттравматические поражения нервной системы (бокс, борьба, восточные единоборства), заболевания опорно-двигательного аппарата (травмоопасные спортивные специализации), сахарный диабет 2-го типа, ожирение, артериальная гипертензия, нарушения свертываемости крови, и др.;

3) рекомендательная часть:

а) для испытуемого подбираются группы видов спорта, в которых он может достичь выдающихся результатов, а также определяются сильные и слабые стороны систем организма с точки зрения потенциала развития физических качеств;

б) диетические рекомендации (составляются на основе определенной индивидуальной чувствительности испытуемых к пищевым веществам) [2];

в) профилактический раздел: определяются меры по профилактике мультифакторных заболеваний и патологических состояний, связанных как со спортивной деятельностью, так и образом жизни.

Таким образом, молекулярная генетическая диагностика может существенно повысить эффективность спортивной ориентации и отбора, а также помочь в оптимизации тренировочного процесса и фармакологической поддержки спортсменов. Вместе с тем, генетическая диагностика не должна осуществляться без использования данных фенотипирования (она определяет всего лишь потенциал, но не результат взаимодействия генотипа и среды), однако ее преимуществом является возможность тестирования сразу после рождения ребенка, а значит, прогноз развития показателей, значимых в условиях спортивной деятельности, можно составить очень рано.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахметов И.И. Молекулярная генетика спорта. Монография. – М. : Советский спорт, 2009. – 268 с.
2. Ахметов И.И., Тоневицкий А.Г. Применение ДНК-технологий для повышения эффективности фармакологического обеспечения процесса подготовки спортсменов. Методические рекомендации. – М.: Изд-во ВНИИФК, 2008. – 40 с.
3. Кочергина А.А., Ахметов И.И. Оптимизация тренировочного процесса юных лыжников с учетом их генетической предрасположенности // Физическая культура: воспитание, образование, тренировка. – 2006. – №1. – С.35-36.
4. Линде Е.В., Ахметов И.И., Орджоникидзе З.Г., Астратенкова И.В., Федотова А.Г. Клинико-генетические аспекты формирования «патологического спортивного сердца» у высококвалифицированных спортсменов // Вестник спортивной науки. – 2009. – №2. – С.32-37.
5. Платонов В.Н., Вайцеховский С.М. Тренировка пловцов высокого класса. – М.: ФиС, 1985. – 256 с.
6. Сологуб Е.Б., Таймазов В.А. Спортивная генетика: Учеб. пособие. – М.: Терра-Спорт, 2000. – 127 с.
7. Ahmetov I.I., Rogozkin V.A. Genes, athlete status and training – An overview. In: Genetics and Sports, edited by Collins M. – Med. Sport Sci. Basel, Karger, 2009. – V.54. – P.43-71.
8. Ahmetov I.I., Williams A.G., Popov D.V., Lyubaeva E.V., Hakimullina A.M., Fedotovskaya O.N., Mozhayskaya I.A., Vinogradova O.L., Astratenkova I.V., Montgomery H.E., Rogozkin V.A. The combined impact of metabolic gene polymorphisms on elite endurance athlete status and related phenotypes // Hum Genet. – 2009. – V.126(6). – P.751-761.
9. Bouchard C., An P., Rice T., Skinner J.S., Wilmore J.H., Gagnon J., Pérusse L., Leon A.S., Rao D.C. Familial aggregation of VO₂(max) response to exercise training: results from the HERITAGE Family Study // J. Appl. Physiol. – 1999. – V.87. – P. 1003–1008.
10. Bray M.S., Hagberg J.M., Perusse L., Rankinen T., Roth S.M., Wolfarth B., Bouchard C. The Human Gene Map for Performance and Health-Related Fitness Phenotypes: The 2006-2007 Update // Med. Sci. Sports. Exerc. – 2009. – V.41. – P. 35–73.
11. Druzhevskaya A.M., Ahmetov I.I., Astratenkova I.V., Rogozkin V.A. Association of the ACTN3 R577X polymorphism with power athlete status in Russians // Eur. J. Appl. Physiol. – 2008. – V.103. – P.631-634.
12. Newton-Cheh C., Eijgelsheim M., Rice K.M., de Bakker P.I., Yin X., et al. Common variants at ten loci influence QT interval duration in the QTGEN Study // Nat. Genet. – 2009. – V.41. – P.399-406.

13. Schuelke M., Wagner K.R., Stolz L.E., Hübner C., Riebel T., Kömen W., Braun T., Tobin J.F., Lee S.J. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child // N. Engl. J. Med. – 2004. – V.350. – P.2682–2688.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КАРДИОВАСКУЛЯРНЫХ И ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Васильева О.В., Полоников А.В., Иванов В.П., Солодилова М.А., Вялых Е.К., Полякова Н.В., Анцупов В.В.

Курский государственный медицинский университет
305041 Курск, ул. К. Маркса 3 Тел./факс: (4712) 588147,
e-mail: vovpost4@yandex.ru

РЕЗЮМЕ: В последнее время значительное количество исследований посвящено поиску наследственных факторов, предрасполагающих к неблагоприятному течению основных сердечно-сосудистых заболеваний. Одно из главных направлений в этих исследованиях - изучение генов-кандидатов. В настоящем обзоре нами систематизированы результаты генетико-эпидемиологических исследований последних лет по изучению ассоциаций «кандидатных генов» с распространенными кардиоваскулярными и цереброваскулярными заболеваниями.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, ишемический инсульт, наследственная предрасположенность, ДНК-полиморфизм

SUMMARY: Significant number of recent studies aimed to searching hereditary factors determining development of the most common cardiovascular diseases. One of the main directions of these studies is identification of candidate genes. In the present review we systematize results of recent studies of candidate genes' associations with common cardiovascular and cerebrovascular diseases.

Key words: cardiovascular diseases, cerebrovascular diseases, ischemic stroke, ischemic heart disease, genetic predisposition, DNA polymorphism

По данным ВОЗ, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются главной причиной по крайней мере одной трети всех смертей на земном шаре [1]. Ежегодно в мире инсульт переносят около 6 млн. человек. По данным Е.И. Гусева [2], в крупных городах Российской Федерации ежегодная заболеваемость инсультами достигает 2,5-3 на 1000 человек населения. Этот показатель является одним из самых высоких в мире. Ежегодно в России регистрируются более 400000 инсультов. Каждые полторы минуты у кого-то из россиян впервые развивается это заболевание [2, 3]. В структуре церебральных инсультов преобладают ишемические поражения головного мозга, доля которых составляет 80-85%. Смертность от этой патологии в течение первых 30 дней от начала заболевания составляет 23%, достигая к концу года почти 50% [2, 3, 4]. Инвалидизация после перенесенного ин-

сульты достигает 3,2 на 1 тыс. населения, занимая первое место среди всех причин первичной инвалидизации.

Согласно современным достижениям медицинской генетики по выяснению молекулярных механизмов распространенных заболеваний сердца и сосудов, таких как артериальная гипертензия (АГ), ишемическая болезнь сердца (ИБС), инфаркт миокарда (ИМ), ишемические инсульты (ИИ), вклад генетических факторов в детерминацию их патогенеза является достаточно высоким.

Однако для проявления патологических эффектов генов “предрасположенности“ на фенотипическом уровне необходимо участие разнообразных факторов внешней среды. Прослеживается семейное накопление этих заболеваний, и среди родственников больного частота этих состояний превышает их среднюю частоту в популяции [5].

В когортных исследованиях было показано, что у пациентов, родственники которых перенесли инсульт, риск развития этого заболевания выше на 30%. Исследования семей и близнецов позволили предположить, что влияние генетических факторов имеет значение даже после 70 лет. Хотя большинство генетических исследований было сфокусировано на идентификации генов, при наличии которых повышается риск развития инсульта, на клинические исходы после возникновения этого заболевания и восприимчивость к лекарственной терапии (например, α -адренином и диуретиками), вероятно, оказывает влияние независимый набор генов (например, ген аполипопротеина E) [6].

Возникающие при этом сложные взаимодействия генетических и средовых факторов в формировании предрасположенности к болезням создают значительные трудности при изучении генетической природы ССЗ. С точки зрения клиницистов, генетические факторы относятся к основным немодифицируемым факторам риска. Однако их широкое использование для генетического тестирования ДНК-полиморфизмов, ассоциированных с предрасположенностью к ССЗ, сопряжено с рядом проблем. В то время как определенные нуклеотидные полиморфизмы могут иметь достаточно высокие частоты в различных популяциях мира (от 5 до 50 %), их независимые влияния на риск развития заболеваний не всегда могут быть обнаружены. Кроме того, результаты исследований ассоциаций генетических маркеров с риском развития ССЗ достаточно часто могут быть противоречивыми и часто являются трудно воспроизводимы, особенно для болезней со сложными патофизиологическими механизмами развития. При этом доказательства выявляемых ассоциаций опираются не столько на четкую физиологическую аргументацию и патофизиологическую значимость тестируемого гена, сколько на статистические вероятности, интерпретация которых с биологических позиций представляет значительные трудности [7]. Причины, которые могут приводить к низкой воспроизводимости генетико-эпидемиологических исследований? были подробно проанализированы в отдельных обзорах [8, 9]. Чрезвычайная

сложность физиологических механизмов, опосредующих влияние полиморфных генов на патологический фенотип болезни, позволяет предположить, что среди различных дизайнов генетико-эпидемиологических исследований изучение взаимосвязей генотипа и фенотипа будут иметь высокую вероятность обнаружения ложноположительных результатов [8]. Соответственно ассоциации заболевания с определёнными полиморфизмами всегда будут зависеть от множества различных факторов, в том числе от влияния средовых факторов [9]. Например, полиморфизмы, изменяющие функциональные свойства генов ферментов детоксикации (глутатион трансферазы, цитохромы P450, алкоголь дегидрогеназы и др.), могут иметь существенное влияние на риск развития заболеваний только при условии влияния определённых средовых факторов риска, таких как курение, употребление алкоголя, профессиональной вредности или приёма определённых лекарственных препаратов [4, 10]. В последнее время значительно возросло количество исследований, посвященных поиску наследственных факторов, предрасполагающих к развитию и клиническому течению распространенных сердечно-сосудистых заболеваний. При этом основным направлением генетических исследований является изучение ассоциаций генов-кандидатов с риском развития болезней. В настоящем обзоре нами систематизированы результаты генетико-эпидемиологических исследований последних лет по изучению ассоциаций «кандидатных генов» с распространенными ССЗ.

В качестве основных источников информации при подготовке обзора использовались электронные базы данных и поисковые системы Интернет, такие как PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov), Scopus (www.scopus.com), Scirus (www.scirus.com), Science Direct (Elsevier, <http://scopees.elsevier.com>), научная электронная библиотека (<http://elibrary.ru>), портал «Русский медицинский сервер» (www.rusmedserv.com). Всего были найдено ~3700 публикаций, в которых представлены результаты исследований в дизайнах case-control и case-only. Из всех найденных источников мы рассматривали в первую очередь исследования по генетической предрасположенности к ишемическому инсульту и ишемической болезни сердца.

Определение роли конкретного гена в развитии отдельного ССЗ, например, ишемического инсульта, является сложной задачей. Это связано с его взаимодействием с другими генами и факторами, такими как артериальная гипертензия, сахарный диабет, повышение уровня фибриногена, нарушение липидного обмена [2, 11]. Так, имеет место увеличение степени риска болезни, связанное с носительством одного гена в сочетании с другими генами (gene dosage effect), действия которых являются синергичными в отношении риска развития ишемического инсульта [12, 13]. Важно отметить, что существует генетическая гетерогенность ишемического инсультов или, другими словами, каждому клинико-патогенетическому варианту инсульта соответствуют вариации определенных генов. В

настоящее время лишь в единичных работах учитывается подтип ишемического инсульта. Наиболее изученной моделью для изучения наследственной предрасположенности в развитии инфаркта мозга является атеротромботический инсульт [14]. Для данной формы инсульта было показано, что риск развития патологии увеличивается не только под влиянием полиморфизма одного гена, но и при сочетании аллелей нескольких генов, т.е. имеет место полигенная наследственная предрасположенность к тромботическим поражениям мозговых сосудов. Существует несколько подходов к изучению мультифакториальных заболеваний, в том числе ИБС и ИБМ. Наиболее широко используются методы ассоциативного анализа в дизайне "случай-контроль".

Одним из предлагаемых подходов является выявление и описание большого числа генов, определенные аллели которых ассоциируются с риском развития цереброваскулярных и кардиоваскулярных заболеваний. В частности, к таким генам можно отнести гены системы гемостаза, ген фибриногена, тромбоцитарного гликопротеина GP IIb/IIIa, V, VIII и XII факторов свертывания, протромбина, гены, регулирующие фибринолиз (tPA, PAI-1), гены ренин-ангиотензиновой системы, NO-синтазы, метаболизма сывороточных липидов и гомоцистеина [2]. В таблице 1 представлен далеко не полный перечень генов-кандидатов сердечно-сосудистых заболеваний [1, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22].

Таблица 1

Связь риска возникновения ССЗ с мутациями ряда генов

Ген-кандидат	Характеристика генетического полиморфизма	Заболевания, с которыми ассоциируются полиморфизмы
Ген ангиотензин I-превращающего фермента (<i>ACE</i>)	Инсерция /делеция Alu-элемента из 286 пар нуклеотидов в 16 интроне гена (<i>ACE/ID</i>)	ИБС, инфаркт миокарда
Ген бета-1-адренорецептора (<i>ADRB1</i>)	Замена серина на глицин в позиции 49 (Ser49Gly) и замена аргинина на глицин в позиции 389 (Arg389Gly) аминокислотной цепи	Индивидуальная восприимчивость к бета-адреноблокаторам.
Ген бета-цепи фибриногена (<i>FGB</i> beta polypeptide)	Полиморфизм -148C>T гена <i>FGB</i> представляет собой нуклеотидную замену цитозина (C) на тимин (T) в промоторном участке гена.	ССЗ, ИИ, ИБС, инфаркта миокарда.
Ген аполипопротеина E (<i>APOE</i>)	Три основные изоформы белка (apoE2, -E3, and -E4), идентифицированные путем изоэлектрического фокусирования, кодируются 3 аллелями. E3 является наиболее широко распространенной изофор-	Гиперлипопротеинемии III и V типа, атеросклероз и ИБС

	мой.Е4 отличается от Е3 заменой цистеина на аргинин в позиции 112 полипептида (Cys112Arg). Е2 отличается от Е3 одной из 4 мутаций: Е2(Arg158Cys), Е2(Lys146Gln), Е2(Arg145Cys) and Е2(Arg136Ser).	
Ген поверхностного рецептора тромбоцитов (GPIIb/IIIa)	Замена цитозина на тимидин в нуклеотидной позиции 1565, приводящая к замене лейцина на пролин в позиции 33 субъединицы GPIIa (PIA2).	Тромбоэмболические осложнения при остром коронарном синдроме, внезапная смерть от коронарного тромбоза
Ген метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR)	Замена цитозина на тимин в позиции 677 (677C-T), приводящая к замене аланина на валин в позиции 222 полипептида.	Атеросклероз, инфаркт миокарда
Ген хемокинового рецептора (CCR2)	Замена гуанина на аденин в 190-й позиции кодирующей части гена, приводящая к замене валина на изолейцин в 64-й позиции аминокислотной последовательности белка (V64I).	Инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия

Одним из основных пусковых механизмов патогенеза ИБС и ИБМ является нарушение функциональных свойств эндотелия, что в дальнейшем приводит к изменению тонуса сосудистой стенки и дальнейшему развитию и прогрессированию патологического процесса. Кроме того, так как важную роль в патогенезе ИБС могут играть изменения гемодинамики и кровяного давления, то интерес представляет изучение генов, кодирующих белки, участвующие в процессах регуляции солевого и жидкостного гомеостаза и поддержания сосудистого тонуса. Полученные ранее данные позволяют утверждать, что ангиотензин превращающий фермент (ACE) и ангиотензиноген (AGT) являются ключевыми элементами РАС и вносят существенный вклад в развитие ССЗ [22, 23, 24].

Ангиотензин-превращающий фермент – это интегральный мембранный протеин, высвобождаемый с клеточной поверхности цинковой металлоэстеразой. У здоровых индивидуумов уровень концентрации ACE может варьировать пятикратно. В гене ACE имеется инсерционно-делеционный полиморфизм, связанный с инсерцией (I) или делецией (D) Alu-повтора размером 287 п.н. в интроне 16 [22, 25, 26].

Данный полиморфизм ассоциирован с повышенным уровнем ACE в плазме крови и развитием целого ряда ССЗ, таких как ИМ, ИБС, эссенциальная гипертензия и др. [12, 22, 23]. Уровень АПФ в сыворотке у здоровых людей гомозиготных по D аллелю почти в два

раза выше, чем у гомозиготных по I аллелю. Носительство D-аллеля гена *ACE* рассматривается как фактор риска возникновения ИМ, спазма коронарных сосудов, геморрагического инсульта, высоким риском развития атеросклероза [23, 24, 25, 27, 28].

В.В. Назаров [29] при изучении патогенетических особенностей острой церебральной ишемии у лиц молодого возраста установил, что у пациентов перенесших ИИ, распределение генотипа по гену АПФ соответствовало распределению в усредненной популяции жителей Европы: в 19,6% наблюдений выявлялись - инсерционные гомозиготы (II), в 47,1% наблюдений – инсерционные гетерозиготы (ID) и в 33,3% наблюдений выявлялись – делеционные гомозиготы (DD). Умеренная гипергомоцистеинемия обнаруживается чаще у делеционных гомозигот (DD), тогда как не выявлена связь между гетерозиготами и инсерционными гомозиготами с гипергомоцистеинемией. В группе пациентов молодого возраста в 22,9% наблюдений диагностирована умеренная гипергомоцистеинемия, сопровождавшаяся утолщением комплекса интима-медиа брахиоцефальных артерий до 1,7 мм. Показано, что делеционные гомозиготы (DD) с умеренной гипергомоцистеинемией более подвержены риску развития ишемического инсульта, а генотип (DD) по гену АПФ в сочетании с умеренной гипергомоцистеинемией следует рассматривать как независимый фактор риска развития ишемического инсульта [29].

Среди большого числа генов-кандидатов особое внимание привлекает ген рецептора (тип 1) ангиотензина II (*AGTR1*) [24, 30, 31].

Через этот тип рецепторов опосредуется не только вазоконстрикторное действие ангиотензина II, но и экспрессия факторов роста и пролиферации гладкомышечных клеток сосудов. Продукт гена *AGTR1* обуславливает основные кардиоваскулярные эффекты ангиотензина-II. Полиморфизм гена *AGTR1* A1166C является маркером повышенного риска развития ССЗ. Вариантный аллель 1166C обнаруживается с частотой 30-40% в европейских популяциях. Вариант 1166C чаще обнаруживается у пациентов с артериальной гипертензией (АГ), чем у здоровых доноров. Исследование 206 больных артериальной гипертензией и 298 доноров с нормальным давлением показало статистически значимое увеличение частоты варианта 1166C у гипертоников (вероятность развития АГ при наличии у пациента генотипа 1166C увеличивается в 1,3 раза) [32].

При наличии у пациента сахарного носительство аллеля 1166C увеличивает риск развития гипертонии в 3,6 раза [26]. Исследование пациентов с диабетической нефропатией показало, что наличие варианта 1166C соответствует двукратному повышению риска развития указанного осложнения сахарного диабета [23]. При исследовании 2579 пациентов с кардиоваскулярными заболеваниями было показано, что наличие гомозиготного генотипа 1166C/C приводит к повышению риска кардиоваскулярных заболеваний в 1,7 раза вне зависимости от уровня артериального давления [25]. В отечественных исследованиях

связи полиморфизма A1166C гена *AGTR1* у больных ИБС установлено увеличение частоты выявления аллеля 1166C среди больных ИБС, по сравнению со здоровыми лицами. Отмечена большая частота носительства аллеля 1166C и генотипов 1166CC и 1166AC у больных, перенесших в анамнезе инфаркт миокарда [27].

Ген *ITGA2* кодирует белок $\alpha 2B$ интегрин – специализированного рецептора тромбоцитов, за счет которых происходит взаимодействие тромбоцитов с тканевыми белками, секретируемыми при повреждении стенки сосудов. Изменение первичной структуры интегринов может приводить к повышенному риску тромбофилии. Ген *ITGB3* кодирует белковую компоненту тромбоцитарного рецептора фибриногена ($\beta 3$ -интегрин). Данный рецептор обеспечивает взаимодействие тромбоцитов с фибриногеном плазмы крови, в результате чего происходит агрегация тромбоцитов и образование тромба. При полиморфизме гена тромбоциты приобретают повышенную склонность к агрегации, поэтому его носители имеют повышенный риск тромбообразования с такими последствиями как инсульт, ИМ.

Исследование полиморфизма -148C>T гена бета-цепи фибриногена (*FGB* beta polypeptide) имеет прогностическое значение и позволяет оценить относительный риск развития заболеваний сердечно-сосудистой системы вследствие нарушений в свертывающей системе крови. Ген *FGB* кодирует аминокислотную последовательность бета-цепи фибриногена. Фибриноген занимает одно из главных мест в свертывающей системе крови. Из фибриногена образуется фибрин – основной компонент кровяного сгустка. Полиморфизм -148C>T гена *FGB* представляет собой нуклеотидную замену цитозина (C) на тимин (T) в промоторном участке гена. Вариант -148T сопровождается повышенной экспрессией гена, что приводит к увеличению содержания фибриногена в крови и повышает вероятность образования тромбов, что способствует увеличению риска заболеваний сердечно-сосудистой системы, в том числе ИИ, ИБС, ИМ [10, 19]. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных участков G-455A, C-249T и C-148T гена *FGB* у русских не отличается от других популяций европеоидов. В то же время у больных с ишемическим инсультом и, в меньшей степени, у пациентов с хронической недостаточностью мозговых сосудов наличие определенных аллелей ассоциируется с повышением уровня фибриногена и активности тромбоцитарного звена гемостаза. Гомо- и гетерозиготное носительство аллеля -455A полиморфного участка G-455A промоторной области гена β -фибриногена ассоциируется с повышенным уровнем фибриногена в группе с ишемическим инсультом и в группе с хронической сосудистой мозговой недостаточностью, а также с повышенной функциональной активностью тромбоцитов только в группе с ишемическим инсультом. Носительство T-аллеля C-249T полиморфизма гена β -фибриногена в гомо- и гетерозигот-

ном варианте сочетается с более легким течением инсульта, с более высоким уровнем фибриногена [33].

Наиболее хорошо изучены механизмы развития ССЗ, обусловленные нарушением липидного обмена и развитием атеросклеротического процесса [3, 4]. Изменение их структуры и функций генов, регулирующих липидный обмен, может быть фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний – ИБС и ИБМ. Ген *GP1BA* кодирует гликопротеин 1В (ГЛ-1В), который является мембранным гликопротеином тромбоцитов, состоящим из альфа- и бета-цепей, связанных между собой дисульфидной связью. ГЛ-1В является рецептором к фактору Виллебрандта. Полный рецепторный комплекс включает в себя ассоциацию нековалентно связанных альфа- и бета-субъединиц с гликопротеином IX и гликопротеином V тромбоцитов. Связывание комплекса ГЛ-1В–IX–V с фактором Виллебрандта инициирует адгезию тромбоцитов после повреждения кровеносного сосуда, их активацию и тромбообразование. Мутации в этом гене способствуют повышенному тромбообразованию.

Вторым направлением изучения потенциальных патогенетических факторов при различных ССЗ в последние годы рассматривают явление апоптоза [4, 8, 13, 22]. Известно, что апоптоз является одним из механизмов ишемического повреждения клетки и, возможно, основным фактором увеличения зоны инфаркта мозга при инсульте. В связи с этим особую актуальность приобретают исследования, направленные на изучение генов, продукты которых вовлечены в реализацию программы клеточной гибели, что позволит в дальнейшем раскрыть молекулярно-генетические основы ишемического повреждения мозга и выявить факторы индивидуальной чувствительности мозга к ишемии.

Третьим современным, и одним из эффективных методов поиска кандидатных генов ИБС и ИБМ, является анализ пар сибсов [4, 34]. Метод сибсов позволяет проводить анализ сцепления между геном и заболеванием, поиск ассоциаций для выявления возможных связей между анализируемым полиморфизмом гена и различными клиническими проявлениями заболевания как в группе пробандов, так и в группе их сибсов, оценить риск развития того или иного заболевания у лиц с отягощенным семейным анамнезом [3].

Результаты исследования близнецовых пар [35, 36] и родословных [37, 38, 39] в целом показали повышенную частоту ишемического инсульта в пределах одной семьи [22, 40].

Выявлено несколько случаев полиморфизма, четко связанного с ишемическим инсультом. Геномные исследования широко не проводились. Ранее публиковались обзоры многочисленных исследований, направленных на поиск генов-кандидатов [16, 41]. В последнее время при геномных исследованиях выявлены гены фосфодиэстеразы 4D

(*PDE4D*) [42] и *ALOX5AP*, кодирующий 5-липоксигеназоактивирующий белок (FLAP) [43] как потенциальные гены - факторы риска ИИ.

Так, Тупицына Т.В. [3] при использовании sibсового метода провела анализ вклада десяти диаллельных ДНК-маркеров в развитие ИБС и ИБМ. Она показала, что ни один из изучаемых генов-кандидатов ССЗ не является главным геном ИБС и ИБМ, подчеркивая многофакторный характер этих заболеваний. При изучении пар sibсов обнаружено, что инсерционно-делеционный (I/D) полиморфизм гена *ACE* ассоциирован с развитием ишемической болезни сердца у лиц с отягощенным по ИБС семейным анамнезом. Генетическим маркером заболевания является генотип DD. Впервые показано, что DD генотип также ассоциирован с развитием ИБС у sibсов с отягощенной по инсульту наследственностью. Установлено, что R219K полиморфизм гена *ABCA1* ассоциирован с развитием ИБС. Аллель 219K и генотипы 219RK и 219KK являются фактором повышенного риска развития и тяжелого течения ИБС. Установлено, что R1587K полиморфизм гена *ABCA1* ассоциирован с развитием ИБС, инфаркта миокарда и стенокардии. Аллель R1587 и генотип R1587R являются фактором повышенного риска развития этих заболеваний у лиц с отягощенным семейным анамнезом. Была обнаружена связь полиморфизма -1131T/C гена *APOA5* с параметрами, характеризующими выраженность атеросклеротического процесса в коронарных артериях у больных ИБС. Показано, что генотипы -1131C/C и -1131T/C ассоциированы с более высокой степенью поражения коронарных артерий. Впервые показана ассоциация R72P полиморфизма гена *p53* с риском развития гипертрофии миокарда левого желудочка (ГЛЖ) у больных ИБС. Установлено, что аллель Р является протективным фактором риска развития ГЛЖ у этих больных [3]. Установлено, что С311S полиморфизм гена *PON2* ассоциирован с развитием инфаркта миокарда, гипертрофии миокарда левого желудочка у лиц с отягощенной по ИБС наследственностью, а также с гипертонической болезнью [44, 45]. Фактором повышенного риска развития данных заболеваний является аллель С311 и генотип С311С. Проведен анализ вклада полиморфных вариантов ряда генов-регуляторов апоптоза в патогенез ишемического инсульта. Показана корреляция А>G полиморфизма (rs3219023) в первом интроне гена *PARP1* и С/А полиморфизма в 3'-фланкирующей области гена *EFNB3* с размером очага инфаркта мозга и тяжестью состояния больных. Установлено, что генотип А/А по гену *PARP1* и генотипы А/А и С/А гена *EFNB3* ассоциированы с развитием и прогрессированием инсульта и являются вариантом тяжелого течения заболевания у русских больных. Обнаружено, что аллель С полиморфизма IVS9-675C>А гена HIF-1A и генотипы С/С и С/А являются факторами повышенного риска развития ишемического инсульта в русской популяции [3].

В настоящее время не рекомендуется проводить исследование на определение индивидуального полиморфизма в повседневной клинической практике [46].

Поэтому исследование генетических факторов риска ИИ целесообразно проводить в профилактических целях лицам, имеющим родственников 1 или 2 степени родства, перенесших это заболевание. Из-за высокой социальной значимости, вероятно, будет определена молекулярная основа инсульта. Степень, с которой генные нарушения, предрасполагающие к инсульту, отличаются от генных нарушений, предрасполагающих к известным промежуточным фенотипам, таким как артериальная гипертензия, сахарный диабет, гиперлипидемия, неизвестна. Открытие группы риска с гаплотипом PDE4D в исландской популяции подтвердило точку зрения о том, что молекулярные методы могут с успехом применяться при инсульте [42, 47]. Результаты исследований (например, «Исследование Сибсов с Ишемическим Инсультом» – SWISS) в будущем позволят оценить, являются ли повреждения гена PDE4D факторами риска по ишемическому инсульту для более разнородной Северо-Американской популяции [34, 41]. Исследования по методу «случай-контроль», скорее всего, останутся основными при определении генетических факторов риска при инсульте из-за трудностей в выполнении исследований по выявлению сцепления в подверженной инсульту популяции старшего возраста [34, 41].

Таким образом, все исследования, связанные с изучением генетических факторов риска ССЗ (ишемического инсульта, ИБС) демонстрируют, что в их развитии задействовано большое число генов, участвующих в различных молекулярных механизмах [28]. Дальнейшее исследование функций генома, возможно, позволит выявить новые кандидатные гены. Возможно, будущие достижения молекулярной биологии и генетики, создание новых технологий, расшифровка генома человека позволят пролить свет на механизмы полигенных сердечно-сосудистых заболеваний и закономерности взаимодействия генотипа с факторами внешней среды.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke// *Lancet Neurol.* - 2007. -Vol. 6. –P.149–161
2. Гусев Е. И. Полиморфизм генов фибриногена у больных с ишемическим инсультом// Е. И. Гусев О. О. Фаворова М. А. Судомоина и др.// *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* – 2008. - №4.- С. 27-30.
3. Тупицына Т.В. Молекулярно-генетический анализ факторов риска коронаросклероза и ишемической болезни мозга: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Тупицына Татьяна Викторовна. - Москва, 2007 г. -31 с
4. Торшин И.Ю., Громова О.А. Сосудистые заболевания сердца, мозга и молекулярные гены. Ассоциативные исследования и патофизиология сосудистых заболеваний// *ж-л «Трудный пациент».*- 2008. - №2-3.- с. 15-19
5. Hamosh A. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders/ Hamosh A, Scott AF, Amberger J, Bocchini C, Valle D, McKusick VA.// *Nucleic Acids Res.* -2002.- Vol.30. -P. 52-55.
6. Мешиа Дж.Ф. Применение геномного подхода при изучении ишемического инсульта// *Журнал "Stroke (Инсульт).*- 2007.- №1

7. Herrmann S., Paul M. Studying genotype-phenotype relationships: cardiovascular disease as an example // *J Mol Med.* – 2002. – Vol. 80(5). – P. 282–289.
8. Torshin I.Yu. Bioinformatics in the post-genomic era: physiology and medicine. - Nova Biomedical Books, NY, USA. – 2007/ ISBN: 1600217524/ P. 35–67.
9. Torshin I.Yu. Bioinformatics in the post-genomic era: studies in clinical genetics. - Nova Biomedical Books, NY, USA. - 2008.
10. Чудакова Д.А. Исследование ассоциации ряда генов системы гемостаза с ишемической болезнью сердца: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.03/ Чудакова Дарья Александровна. - Москва, 2005 - 145 с.
11. Rastenyte D. Genetics of stroke—a review/ Daiva Rastenyte, Jaakko Tuomilehto, Cinzia Sarti// *Journal of Neurological Sciences.* -1998. – Vol. 153. – P. 132–145.
12. Celentano A. Cardiovascular risk factors, angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism, and left ventricular mass in systemic hypertension/ Celentano A., Mancini F.P., Crivaro M. et al. // *Am J Cardiol.*- 1999. – Vol. 83. – P. 1196—1200.
13. Заклязьминская Е.В. Генетическое разнообразие сердечно-сосудистых заболеваний и возможности молекулярной диагностики/ Е.В. Заклязьминская, С.И. Козлова, А.В. Поляков// *Вестник аритмологии.* – 2005. - №37. - С. 69-76.
14. Adams H.P.Jr. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment/ Adams H.P.Jr., Bendixen B.H., Kappelle L.J. et al.// *Stroke.*- 1993. - Vol. 24. – P. 35—41.
15. Baumann R.E., Henschen A.H. Human fibrinogen polymorphic site analysis by restriction endonuclease digestion and allele-specific polymerase chain reaction amplification: identification of polymorphisms at positions A 312 and B 448// *Blood.* – 1993. – Vol. 82. – P. 2117—2124.
16. Hassan A., Hugh S. Markus. Genetics and ischaemic stroke.//*Brain.* – 2000. Vol. 123. – P 1784—1812.
17. Lane D., Grant P. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease// *Blood.* – 2000.- Vol. 95. P. 1517—1532.
18. Margaglione M. Prevalence of apolipoprotein E alleles in healthy subjects and survivors of ischemic stroke: an Italian case-control study/ Margaglione M., Seripa D., Gravina C. et al // *Stroke.* – 1998. - Vol. 29. – P.399—403.
19. Schmidt H. b-fibrinogen gene polymorphism (C148 to T) is associated with carotid atherosclerosis/ Schmidt H., Schmidt R., Niederkorn K. et al/ *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 1998. – Vol. 18. – P. 487.
20. Nabel E. Cardiovascular disease // *N Engl J Med.* - 2003. – Vol. 349(1). - P. 60–72.
21. Tang Z., Tracy R.P. Candidate genes and confirmed genetic polymorphisms associated with cardiovascular diseases: a tabular assessment // *J Thromb. Thrombolysis.*- 2001.- Vol. 11(1). - P. 49–81.
22. Meshia J.F. Genetics of Cerebrovascular Disorders/ James F. Meshia, Thomas G. Brott, Robert D. Brown// *Mayo Clinic Proceedings.* – 2005. - Vol. 80(1). – P. 122-132.
23. Buraczyńska M. Association of the renin-angiotensin system gene polymorphism with nephropathy in type II diabetes/ Buraczyńska M., Ksiazek P., Łopatyński J. et al // *Pol Arch Med Wewn.* - 2002. – Vol. 108(2). - P. 725-730.
24. Bataineh A., Raji L. Angiotensin II, nitric oxide, and end-organ damage in hypertension // *Kidney Int Suppl.*- 1998. – Vol. 68. - P. 614–619.
25. Jones A. Genetic variants of angiotensin II receptors and cardiovascular risk in hypertension/ Jones A., Dhamrait S.S., Payne J. R. et al// *Hypertension.* – 2003. – Vol. 42(4). P. 500-5006.
26. van Ittersum F.J. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and complications of insulin-dependent diabetes mellitus/ van Ittersum F.J., de Man A.M., Thijssen S. et al// *Nephrol Dial Transplant.* – 2000. Vol. 15(7). - P. 1000-1007.
27. Дисфункция эндотелия: связь с полиморфизмом гена рецептора (тип 1) ангиотензина II у больных ишемической болезнью сердца [Электронный ресурс]/ Л. О. Минушкина, Д. А. Затейщиков, О. Ю. Кудряшова, Д. А. Чистяков, В. В. Носиков, Т. Е. Цимбалова,

В. Г. Баринов, Е. М. Носенко, В. П. Седов, Б. А. Сидоренко. – Москва, РОО "Мир Науки и Культуры", Copyright © 2000-2009.- ISSN 1684-9876. Режим доступа <http://nature.web.ru/db/search.html>.

28. Роль полиморфных вариантов генов ренин- ангиотензиновой системы, эндотелиальной NO-синтазы и р53 в развитии основных факторов риска сосудистой патологии головного мозга и в формировании инфаркта мозга [Электронный ресурс]/ В.И.Скворцова, С.А. Лимборская, П.А. Сломинский, Е.А.Кольцова, И.М. Шетова// CONSILIUM MEDICUM – приложение, 2003.- Том 05, №5. Режим доступа: <http://old.consilium-medicum.com>.

29. Назаров В.В. Инсульт у лиц молодого возраста. Особенности патогенеза и диагностики: автореф. дис. ... д-ра мед. наук/ Назаров Вячеслав Владимирович.- Санкт-Петербург, 2009. - 38 с.

30. Dielis A.W. The prothrombotic paradox of hypertension: role of the renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems/ Dielis A.W., Smid M., Spronk H.M. et al // Hypertension.- 2005. – Vol. 46(6). P. 1236–1242.

31. Fogari R., Zoppi A. Antihypertensive drugs and fibrinolytic function // Am J Hypertens.- 2006. – Vol. 19 (12). - P. 1293–1299.

32. Bonnardeaux A. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension/ Bonnardeaux A., Davies E., Jeunemaitre X. et al// Hypertension. – 1994.- Vol. 24(1). P. 63-69.

33. Сердюк И.Е. Полиморфизм генов фибриногена у больных с ишемическим инсультом: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Сердюк Ирина Евгеньевна.- Москва, 2008. - 22с.

34. Meshia J.F. The Siblings With Ischemic Stroke Study (SWISS) protocol/ Meschia J.F, Brown RD Jr, Brott T.G. et al// BMC Med Genet.- 2002. – Vol. 3(1).

35. Bak S. Genetic liability in stroke: a long-term follow-up study of Danish twins/ Bak S. Gaist D, Sindrup SH, Skytthe A, Christensen K// Stroke. – 2002. – Vol. 33. - P. 769-774.

36. Brass L.M. A study of twins and stroke/ Brass L.M, Isaacsohn J.L, Merikangas K.R, Robinette C.D.// Stroke.- 1992. – Vol. 23. – P. 221-223.

37. Caicoya M. Family history and stroke: a community case-control study in Asturias, Spain./ Caicoya M, Corrales C, Rodriguez T. // J Epidemiol Biostat.- 1999. – Vol. 4. – P. 313-320.

38. Kiely D.K. Familial aggregation of stroke: the Framingham Study/ Kiely D.K, Wolf P.A, Cupples L.A, Beiser A.S, Myers R.H.// Stroke. – 1993- Vol. 24. – P. 1366-1371.

39. Liao D. Familial history of stroke and stroke risk: The Family Heart Study/ Liao D, Myers R. Hunt S, et al.// Stroke. -1997- Vol. 28. - P. 1908-1912.

40. Flossmann E. Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke/ Flossmann E, Schulz UG, Rolhwell PM.// Stroke. -2004. - Vol. 35. – P. 212-227.

41. Meshia J.F. The Ischemic Stroke Genetics Study (ISGS) protocol/ Meschia JF, Brott TG, Brown RD Jr, et al.//BMC Neurol. -2003. – Vol. 3(4).

42. Gretarsdottir S. The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke/ Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Reynisdottir ST, et al.// Nat Genet.- 2003. – Vol. 35. – P. 131-138.

43. Helgadottir A. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke/ Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson G, et al.//Nat Genet. -2004.-Vol. 36. – P. 233-239.

44. Полоников А.В. Эколого-токсикогенетическая концепция мультифакториальных заболеваний: от понимания этиологии до клинического применения/А.В. Полоников, В.П. Иванов, М.А. Солодилова// Медицинская генетика. – 2008. – Т. 7(11). – С. 3-20.

45. Анализ связи двух точковых мутаций генов параоксоназ Q192R PON1и S311C PON2 с предрасположенностью к гипертонической болезни в популяции русских жителей Центрального Черноземья/ А.В. Полоников, М.А. Солодилова, И.В. Хорошая и др.// Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2006. - №4. – С. 57-61.

46. Burke W. Genetic test evaluation: information needs of clinicians, policy makers, and the public/ Burke W, Atkins D, Gwinn M, et al. // Am J Epidemiol. -2002. – Vol. 156. – P. 311-318.

47. Gretarsdottir S. Localization of a susceptibility gene for common forms of stroke to 5q12/ Gretarsdottir S, Sveinbjornsdottir S, Jonsson HH, et al. // Am J Hum Genet.- 2002. – Vol. 70. – P. 593-603.

***КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СИНДРОМА НИЙМЕГЕН
(КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ)***

Волянская Л.А., Дмитриаш Л.Н.*

ГБУЗ Тернопольский государственный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского
46001 Украина, Тернополь, Майдан Воли, 1

E-mail: volyasnka@tdmu.edu.ua; Emilija_bb@yahoo.com.ua

*Тернопольская областная клиническая коммунальная детская больница
46000 Украина, Тернополь, ул. Сахарова, 2

РЕЗЮМЕ: Синдром Ниймеген относится к тяжелым наследственным заболеваниям с аутосомно-рецессивным типом передачи мутированного гена NBS1, который находится в 8 хромосоме (8q21). Фенотипическими признаками этого заболевания есть: микроцефалия, «птицеобразное» лицо, задержка физического и полового созревания, кожные поражения. Манифестация синдрома проявляется рецидивирующими, торпидными к лечению вирусно-бактериальными инфекциями. Последующее течение болезни часто сопровождается развитием злокачественных новообразований и снижением интеллекта. *Ключевые слова:* синдром Ниймеген

SUMMARY: Nijmegen breakage syndrome is related to severe combined immune deficient diseases with autosomal recessive type of inheritance. The disease is accounted by mutation of NBS1, located on chromosome 8 (8q21). Characteristic phenotypic manifestations of the disease are microcephalia, “briadlika” face, delay of physical development and puberty, skin lesions. Clinical presentation includes relapsing viral-bacterial infections, malignant neoplasms, intellectual regression.

Key words: Nijmegen breakage syndrome

Синдром Ниймеген (синдром хромосомных поломок Ниймеген, Nijmegen breakage syndrome, NBS) [D82.8/Q95.5] — это синдром хромосомной нестабильности, распространенный у славян, который характеризуется микроцефалией, комбинированным первичным иммунодефицитом, повышенной чувствительностью к радиоактивному излучению и высокой предрасположенностью к лимфоидным опухолям [2]. Синдром Ниймеген входит в группу заболеваний с хромосомной нестабильностью [3, 4, 5]. Необычное название связано с голландским городом Ниймеген, в университетской клинике которого в 1981 году заболевание было впервые описано Weemaes [6].

Этиология: мутация гена NBS1, который находится в 8 хромосоме (8q21). Болезнь наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Ген синдрома Ниймеген был картирован в длинном плече хромосомы 8 в 1998 г. и назван NBS1. Практически в 90 % случаев у боль-

ных в обоих локусах наблюдается одинаковая мутация гена NBS1(657del5, или «Славянская мутация»). Описано также и 7 других мутаций этого гена. Во всех описанных вариантах этого синдрома пациенты были гетерозиготными [1, 4].

Патогенез: ген NBS1 кодирует нибрин – белок, который принимает участие процессах репарации ДНК и контролирует процессы митоза. Накопление дефектных ДНК ведет к развитию иммунодефицита, злокачественных новообразований. Нибрин (p95) обеспечивает взаимодействие между двумя белками - h Mre 11 u Rad 50 - и контролирует репарацию парных разрывов двуспиральной ДНК, индуцированных ионизирующим излучением, или нормальными процессами — мейотическими реакциями и митотической VDG реанжировкой в зрелых лимфоцитах [6]. На основе образованной впоследствии ДНК обеспечивается синтез разнообразных специфических антител, Т-клеточных рецепторов. Синтез антител и рецепторов обеспечивает не только сам по себе иммунный ответ, но и созревание Т- и В-лимфоцитов. Двухнитевые разрывы ДНК также регулярно возникают в процессе кроссинговера при мейозе (пациенты с атаксией-телеангиэктазией страдают бесплодием [5], вызванным недостаточностью функций яичников). Процессы, напоминающие рекомбинацию генов иммуноглобулинов у пациентов с синдромом Ниймеген, происходят при созревании нейронов головного мозга, что, вероятно, и вызывает микроцефалию и умственные нарушения.

Распространенность: единичные случаи заболевания встречаются по всему миру, но чаще всего в странах Восточной Европы и на Украине. Поскольку в 90 % этих случаев диагностирована мутация 657del5 в обоих локусах гена NBS1, это заболевание еще называют «славянская мутация».

Клиническая картина:

- микроцефалия, которая возникает с момента рождения и прогрессирует с возрастом;
- поражение головного мозга (субарахноидальные кисты, агенезия мозолистого тела, гидроцефалия);
- птицеобразное выражение лица (низкий скошенный лоб на фоне микроцефалии, гипоплазия нижней челюсти, выступающая вперед средняя часть лица, большой нос, сравнительно большие и диспластические уши с большим носом; часто отмечается монголоидный разрез глаз, короткая шея, гипертелоризм);
- задержка физического развития, у подростков задержка формирования вторичных половых признаков;
- интеллект у младших детей не нарушен, но с возрастом нарастает отставание вплоть до олигофрении;

- нарушения пигментации кожи в виде пятен цвета «кофе с молоком», часто в наличии витилиго, телеангектазии, множественные пигментные невусы, капиллярные или кавернозные гемангиомы;
- изменения со стороны волос: у детей раннего возраста волосы редкие, с возрастом они нормализуются, часто ранняя седина;
- аномалии других систем и органов;
- проявления иммунодефицита включают частые рецидивирующие инфекции верхних дыхательных путей с последующим формированием бронхоэктатической болезни;
- оппортунистические инфекции (герпетическая инфекция, кандидозы и т.д.) встречаются редко.

Диагностические критерии:

- *типичная клиническая картина:*
- мутация гена NBS1;
- лимфопения, чаще за счет CD4+лимфоцитов, инверсии соотношения CD4+/ CD8+, повышение уровня NK-лимфоцитов, снижение уровня иммуноглобулинов IgA, IgG, возможны дефицит субкласса IgG2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе кафедры педиатрии с детской хирургией ТГМУ им. Горбачевского И.Я. и Львовского института наследственной патологии АМН Украины изучены медицинская документация (генетические карты, истории стационарного больного, история развития ребенка) произведена оценка фенотипа; общеклиническое и иммунологическое обследование девочки, историю болезни которой мы представляем как собственное наблюдение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На протяжении последних 5 лет на территории Тернопольской области (Западный регион Украины) зарегистрированы четыре случая синдрома Ниймеген, у трех из них диагноз подтвержден выявлением мутации гена NBS1, в одном случае диагноз выставлен фенотипически.

Приводим пример клинико-параклинических характеристик случая, который мы наблюдали лично в течение пяти лет с момента первого обращения ребенка за помощью. Девочка впервые попала в поле зрения иммунолога в возрасте 6 лет. Обратилась по поводу частых респираторных эпизодов, которые нередко сопровождались кожными поражениями. Ребенок-пробанд родился от второй беременности, которая протекала без осложнений и закончилась физиологическими родами. Масса при рождении 2300 г. Период новорожденности без особенностей. С 3-х летнего возраста девочка часто болеет на ОРЗ. До

6,5 лет восемь раз болела пневмонией, и в этом возрасте впервые начинает наблюдаться иммунологом по поводу подозрения на комбинированный иммунодефицит. В возрасте 7 лет диагноз врожденного комбинированного иммунодефицита - синдром Ниймеген подтвержден генетически во Львовском институте наследственной патологии АМН Украины. По данным молекулярно-генетического обследования, выявлена мутация 657del5 гена NBS1 в гомозиготном состоянии. У матери девочки аналогичная мутация в гетерозиготном состоянии (отец не обследован, но возможно, что и он гетерозиготен по данной мутации). С этого времени ребенок получал заместительную терапию, но нерегулярно из-за большой стоимости такого лечения и ограниченные бюджетные возможности нашей области. В семье трое детей: первый ребенок здоров (старшая сестра 13 лет), а у младшего брата 6 лет имела место кратковременная потеря зрения с последующим неполным восстановлением (причина неизвестна). Прародители по обеим линиям - западного региона Тернопольской области (Бережанский район). Мать и отец здоровы.

Данное сообщение базируется на повторном наблюдении за данным ребенком по достижению им возраста 11 лет во время очередного поступления на стационарное лечение по поводу: Синдром Ниймеген (Najmegen beakage-syndrome) (D82.8/Q95.5). Комбинированный иммунодефицит. Аллергический дерматит. Хронический обструктивный бронхит (J 44). Артрит левого коленного сустава. Задержка физического развития (по массе тела – 3,85 д, по росту – 3,65 д).

Объективное состояние: при осмотре девочка отстает в физическом развитии, астенизирована (рис.1). Особенности фенотипа: голова микроцефальной формы, гипертелоризм, большие уши, седловидный нос, «птичье» лицо (рис.2), клинодактилия мизинцев рук, аномалия размещения III пальцев. Кожа сухая со множественными ярко розовыми кольцевидными пятнисто-папулезными высыпаниями различной величины на руках, лице и туловище с кружевными краями, кое-где покрытых мелким шелушением (рис.3). Эмоционально лабильна, контакту доступна. Небные миндалины, периферические лимфоузлы гипоплазированы. Дыхание жесткое без хрипов. Одышка смешанного характера. Тоны сердца приглушены, тахикардия. Печень и селезенка выступают из подреберья на 3,5 и 1,0 см, соответственно. Стул и мочеиспускание не нарушены.

В гемограмме: тенденция к лейкопении, лимфопения, снижены уровни Ig A (< 10 mg/100ml при норме 79-169) и Ig G (124mg/100ml при норме 667-1169). Наблюдались также изменения со стороны клеточного звена иммунитета: CD3+ 61 % (при норме 66-73 %) 0,747 в абс. к-ве (N – 1,8-3,0) , CD4+ 24 % (при норме 32-43 %) 0,294 в абс. к-ве (N – 1,0-1,8), CD8+ 31 % (при норме 25-34 %) 0,38 в абс. к-ве (N – 0,8-1,5), CD19+ 10 % (при норме 16-24 %) 0,122 в абс. к-ве (N – 0,7-1,3), CD16/56 3 % (при норме 7-15 %) 0,04 в абс. к-ве (N – 0,2-0,6). Таким образом, иммунологические исследования свидетельствуют о

выраженном комбинированном иммунодефиците. Повышен уровень острофазовых белков. Рентгенография органов грудной клетки: хронический бронхит. УЗИ органов брюшной полости: гепатоспленомегалия, почки без патологии. УЗИ суставов: слева в проекции супрапателлярного кармана акустически прозрачная жидкость до 12 мм с пристеночными фибринозными наложениями, левосторонний бурсит. ЭхоЭГ: микроцефальный синдром. ЭЭГ: признаки энцефалопатии.

Ребенок получил заместительную иммунотерапию в дозе 0,2-0,4 мл/кг. На фоне заместительной терапии в комбинации с антибактериальными препаратами во время активации инфекционного процесса и антигистаминными препаратами - в связи с наличием проявлений атопии состояние девочки клинически стабилизировалось (во время амбулаторного лечения заместительная терапия проводилась крайне нерегулярно из-за материальных проблем).

Таким образом, клинико-лабораторные особенности нашей пациентки были близки параметрам международного регистра синдрома Ниймеген [5].

Вывод: Дети с микроцефалией уроженцы западных регионов Украины, как группа риска по синдрому Ниймеген, заслуживают тщательного иммунологического и медико-генетического обследования с целью раннего выявления у них этой аномалии и быстрого начала заместительной иммунотерапии. Необходимо дальнейшее совершенствование программ по ранней диагностике этого синдрома и решения проблем его пренатальной диагностики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эффект основателя при синдроме Ниймеген /И.Б. Резник, О.О.Тогоев, И.В. Кондратенко и др. // Педиатрия. – 2001. – №4. – С.14-18.
2. Імунологія: Підр. /А.Ю.Вершигора, Є.У.Пастер, Д.В. Коменота та ін.; за ред. Є.У.Пастер. – К.: Вища школа, 2005.
3. Наказ МОЗ України від 09.07.04 р. №355 «Про затвердження Протоколів лікування дітей за спеціальністю «Дитяча імунологія».
4. Чернишова Л.І., Самарін Д.В. Первинні імунодіцити у дітей. – К., 2004. - 240с.
5. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study group //Arch Dis Child. – 2000. – Vol.82. – P.400-406.
6. Saar K., Chrzanowska K.H., Stumm M., Jung M. et alt. // The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1 – cM interval on chromosome 8q21.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ



Рисунок 1.



Рисунок 2.

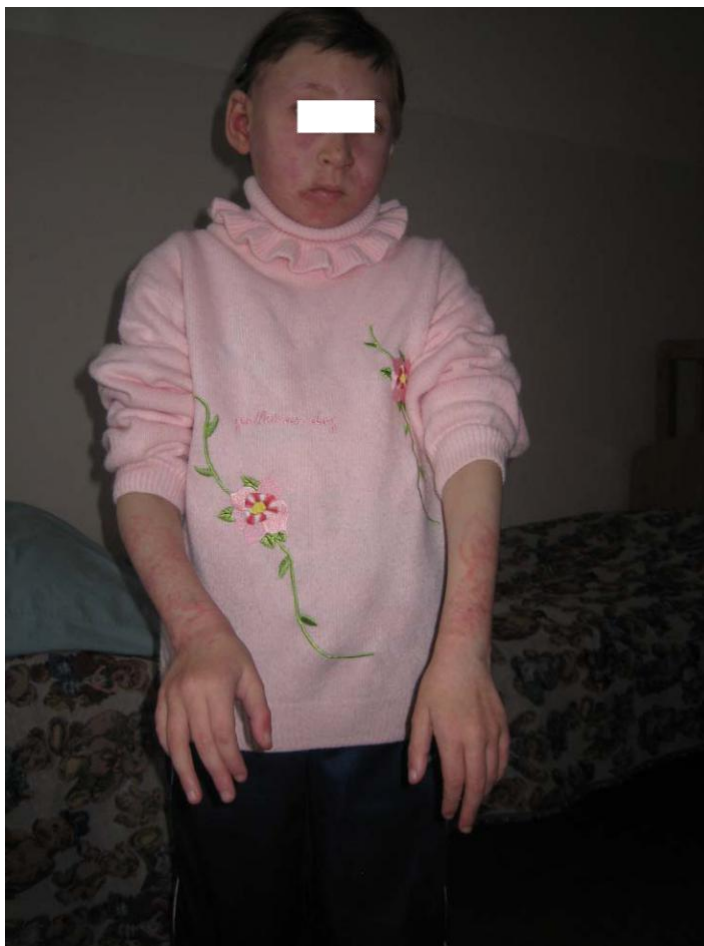


Рисунок 3.

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРИРОДА СЕНСОНЕВРАЛЬНОЙ ТУГОУХОСТИ У
ЖИТЕЛЕЙ БЕЛАРУСИ**

**Даниленко Н.Г., Синявская М.Г., Левая-Смоляк А.М. *, Олейник О.А., Меркулова Е.П. *,
Давыденко О.Г.**

Институт генетики и цитологии Национальной Академии Наук Беларуси

E-mail: cytoplasmic@mail.ru

*Белорусский государственный медицинский университет

E-mail: Anastasia_ls@tut.by

РЕЗЮМЕ: Обследованы 136 детей с сенсоневральной тугоухостью 2-4 степени на наличие мутации 35delG в гене GJB2. Мутация выявлена в гомозиготном состоянии у 47% исследуемых и в гетерозиготном состоянии - у 16 %. У одной девочки обнаружена митохондриальная мутация A1555G.

Ключевые слова: тугоухость, ген GJB2, митохондриальн ген 12S рРНК

SUMMARY: Analysis of the 35delG mutation was performed in 136 children with sensorineural hearing loss of various degrees, from severe to profound. Among 136 deaf children, 64 (47%) were homozygous for 35delG mutation; 22 (16%) were heterozygous carriers of 35delG. One child was found to be carrier of mitochondrial mutation A1555G.

Keywords: hearing loss, gene GJB2, mitochondrial gene 12S rRNA

К настоящему времени у человека известны почти сто генов, связанных с глухотой и тугоухостью, которые локализованы как в ядре, так и в митохондриях [www.geneclinics.org/deafness-overview]. Наиболее часто выявляются мутации в гене GJB2, кодирующем коннексин 26. В этом небольшом гене, состоящем из 681 нуклеотидов, описаны к настоящему времени 90 различных мутаций. Основная мутация - GJB2 – однонуклеотидная делеция 35delG – у европейцев обуславливает до 50% случаев нейросенсорной потери слуха [Antoniadi et al., 1999; Bitner-Glindzicz, 2002]. Гораздо реже обнаруживаются другие мутации: 167delT, 235delC, C254A, 313-314delAA, 360delG, однако частота каждой из них в различных европейских популяциях не превышает 1-2% от всех выявляемых мутаций. В ряде изученных популяций несиндромную глухоту вызывают мутации в генах GJB3, кодирующих соответственно коннексоны 31 и 30, и обнаруживающиеся с частотой от 0,5 до 5% [Bitner-Glindzicz, 2002].

На основании исследований последних лет установлено, что митохондриальные мутации составляют не менее 1% случаев доречевой потери слуха и 5% случаев - послеречевой несиндромальной глухоты во многих популяциях Европы и Азии, занимая таким образом второе место после GJB2 [Fischel-Ghodsian, 1999; Jacobs et al., 2005]. Основные из них локализованы в рибосомальном гене 12S (мутации A1555G и T961G) и гене сериновой тРНК митохондрий (чаще всего это однонуклеотидная замена A7445G) [Prezant et al., 1993; Hutchin et al., 2001].

Эти мутации передаются исключительно по материнской линии и вызывают несиндромную потерю слуха. Чрезвычайно важным представляется определение носительства мутации A1555G, поскольку ее проявление часто связано с применением ряда антибиотиков, таких как гентамицин, стрептомицин, тобрамицин, неомицин, канамицин, паромомицин и др. Риск ототоксичности указанных препаратов необходимо учитывать при выявлении мутации A1555G в каждой конкретной семье для корректировки назначаемых фармацевтических препаратов при любых инфекционных заболеваниях [Estivill et al., 1998, Bitner-Glindzicz, 2002]. Эта проблема приобретает особую актуальность, так как сегодня практические детские врачи интенсивной терапии и реанимации свидетельствуют о высокой потребности использования аминогликозидов ввиду их широкого спектра действия.

В Беларуси широкомасштабные исследования генетической природы тугоухости впервые начаты нами в 2009 году. Проводится как определение мажорной ядерной мутации 35delG в гене GJB2 у детей разного возраста с нейросенсорной тугоухостью 2-4 степени, так и определение митохондриальных мутаций различной локализации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ДНК для анализа выделяли из 0,05 – 0,1 мл периферической крови (пятно крови, высушенное на целлюлозном носителе) микромодификацией стандартного фенольного метода

циями в гене GJB2, и прежде всего с мутацией 35delG, составляет менее 15%, что гораздо меньше, чем в европейских группах, где эта мутация встречается более чем у 40% пациентов. Первые результаты, полученные нами в белорусской популяции пациентов с НСТ, сопоставимы с частотами мутаций 35delG и A1555G у населения европейской части России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Барашков Н.А. Молекулярно-генетическое изучение наследственной несиндромальной сенсоневральной глухоты в республике Саха(Якутия) /Автореф. дисс.канд. биол наук. Уфа, 2007.

Журавский С.Г., Тараскина А.Е., Курусь А.А., Иванов С.А., Гринчик О.В., Джемилёва Л.У., Хуснутдинова Э.К. Молекулярно-генетический анализ в установлении наследственной причины детской доречевой глухоты // Российская оториноларингология.-2009.- Приложение № 1.- С.70-73.

Маркова Т.Г. Клинико-генетический анализ врождённой и доречевой тугоухости / Автореф. дисс. доктора мед. наук. Москва, 2009.

Тазетдинов А.М. Анализ генов 12S rRNA, tRNASer(UCN), MYO7A и USH2A у пациентов с наследственными формами нарушения зрения и слуха /Автореф. дисс.канд. биол наук. Уфа, 2008

Джемилева Л.У., Посух О.Л., Тазетдинов А.М., Барашков Н.А., Журавский С.Г., Пониделко С.Н., Маркова Т.Г., Тадинова В.Н., Федорова С.А., Максимова Н.Р., Хуснутдинова Э.К. Анализ генов 12S rRNA и tRNASer(UCN) мтДНК у больных несиндромальной сенсоневральной тугоухостью/глухотой из различных регионов России // Генетика.- 2009.- Т. 45. № 7.– С. 982-991.

Хуснутдинова Э.К., Джемилева Л.У. Молекулярно-генетический анализ несиндромальной аутосомно-рецессивной тугоухости и глухоты у больных и в популяциях Волго-Уральского региона // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2005.– Т. 1. № 1.– С. 24-31.

Antoniadi T, Rabionet R, Kroupis C, Aperis GA, Economides J, Petmezakis J, Economou-Petersen E, Estivill X, Petersen MB. High prevalence in the Greek population of the 35delG mutation in the connexin 26 gene causing prelingual deafness // Clin Genet. – 1999.– Vol. 55, No5.– P.381-382.

Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans // Br. Med. Bull.–2002.–Vol. 63. – P.73-94.

Estivill X, Govea N, Barceló E, Badenas C, Romero E, Moral L, Scozzri R, D'Urbano L, Zeviani M, Torroni A. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides.// Am. J Hum Genet. 1998– Vol. 62, No1.–P.27-35..

Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial deafness mutations reviewed // Hum Mutat.– 1999.–Vol.13, No.4.–P.261-270.

Hutchin TP, Thompson KR, Parker M, Newton V, Bitner-Glindzicz M, Mueller RF. Prevalence of mitochondrial DNA mutations in childhood/congenital onset non-syndromal sensorineural hearing impairment. // J Med Genet.– 2001.– Vol. 38, No.4.– P.229-231.

Jacobs HT, Hutchin TP, Käppi T, Gillies G, Minkkinen K, Walker J, Thompson K, Rovio AT, Carella M, Melchionda S, Zelante L, Gasparini P, Pyykkö I, Shah ZH, Zeviani M, Mueller RF. Mitochondrial DNA mutations in patients with postlingual, nonsyndromic hearing impairment//Eur J Hum Genet. – 2005.–Vol.13, No.1.–P.26-33.

Leveque M., Marlin S., Jonard L., Procaccio V. et al. Whole mitochondrial genome screening in maternally inherited non-syndromic hearing impairment using a microarray resequencing mitochondrial DNA chip // Eur.J.Human Gen. – 2007.- Vol.15.- P.1145-1155.

Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with

both antibiotic-induced and non-syndromic deafness// Nat Genet. –1993.– Vol. 4, No.3.– Vol.289-294.

Rydzanicz M, Wróbel M, Cywińska K, Froehlich D, Gawecki W, Szyfter W, Szyfter K] Screening of the general Polish population for deafness-associated mutations in mitochondrial 12S rRNA and tRNA Ser(UCN) genes // Genet Test Mol Biomarkers.– 2009.– Vol.13, No. 2.–P.167-172.

Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T, Collins V, Wilcox LJ, McKinlay Gardner RJ, Kamarinos M, Cone-Wesson B, Williamson R, Dahl HH. High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene.// Hum Genet. –2000.– Vol.106, No.4.– P. 399-405

МУТАЦИЯ ГЕНА NF-1 И ДЕФОРМАЦИЯ ПОЗВОНОЧНИКА.

***Зайдман А.М., Завьялова Е.Л., Михайловский М.В., Новиков В.В. ,
Васюра А.С., Суздалов В.А., Садовой М.А.***

ФГУ Новосибирский Научно-исследовательский Институт Травматологии и Ортопедии

РЕЗЮМЕ. Исследованы структурные компоненты позвоночника, полученные в ходе коррекции деформации от 15 детей с III-IV степенью сколиоза на почве нейрофиброматоза. В хондробластах пластинок роста детей ПЦР-реакцией исследована экспрессия генов агрекана, люмикана и NF-1. Показано, что этиологическим фактором формирования деформации позвоночника при нейрофиброматозе является мутация в клетках ганглиозной пластинки гена NF-1. Миграция клеток, несущих мутантный ген в одну из зон склеротома, приводит к активации онкогена и интенсивной пролиферации хондро-, остео- и фибробластов в пластинке роста, межпозвоночном диске и теле позвонка. Продолженный процесс деформации позвоночника после оперативного вмешательства объясняется пролиферацией хондро- и фибробластов в теле позвонка и межпозвоночном диске и нарушением экспрессии генов люмикана и NF-1.

Ключевые слова: нейрофиброматоз, пластинка роста, склеротом, деформация позвоночника, экспрессия гена.

SUMMARY. Structural components of the spine were presented as specimens obtained in the course of surgical correction of spinal deformity performed in 15 children with III-IV grade scoliosis associated with neurofibromatosis. Aggrecan, lumican, and NF1 gene expression in growth plate chondroblasts in children was studied using PCR assay. The result of the study was identification of the mutation of the NF-1 gene in cells of ganglionic lamella mutation as the etiologic factor of the development of spinal deformity in neurofibromatosis. Migration of cells carrying mutant gene into one of the sclerotome zones results in oncogene activation and intensive proliferation of chondro-, osteo-, and fibroblasts in the growth plate, intervertebral disc, and vertebral body. Progressive development of the spinal deformity after surgical intervention is accounted by both proliferation of chondro- and fibroblasts in the vertebral body and in intervertebral disc and disturbance of the NF-1 and lumican genes expression.

Key words: neurofibromatosis, growth plate, sclerotome, spinal deformity, gene expression.

Нейрофиброматоз I типа – тяжелое системное наследственное заболевание с преимущественным поражением кожи, нервной, мышечной и костной систем. Наследуется по ауто-сомно-доминантному типу с высокой пенетрантностью генотипов и вариабельной экспрес-

сивностью [18]. Этиологическим фактором заболевания является мутация гена NF-1, локализуемого в 17q-хромосоме [19, 24].

Мутация гена NF-1 вызывает повышенную активность онкобелков Ras, что приводит к пролиферации клеток и формированию опухолей. Из костных повреждений на почве нейрофиброза наиболее часто (от 2% до 69%) встречаются деформации позвоночника – кифозы и сколиозы с грудной локализацией [7-11, 13, 14, 19, 21, 22].

Механизм деформации позвоночника остается неизвестным. По мнению А.Ι. Tsirikos [12, 23], деформация позвоночника возникает вследствие давления опухолью (нейрофибромой) на тела позвонков [11, 14]. Не исключается и первичная дисплазия мезодермы, остеомаляция и эндокринный дисбаланс [17, 20]. Но ни одна из теорий не имеет достоверных доказательств. Особенно труднообъяснимой является идиопатическая форма, которая по клиническому течению и R-логическим данным неотличима от идиопатического сколиоза и диагностируется на основании сопутствующих симптомов [14-16, 20].

В настоящее время в доступной литературе отсутствуют данные, касающиеся морфологических изменений в структурных компонентах позвоночника при нейрофиброматозе. В связи с этим предпринято исследование с целью изучения патогенетических механизмов формирования деформации позвоночника при нейрофиброматозе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Пластинки роста, межпозвонковые диски, фрагменты тел позвонков на высоте деформации, ниже и выше, получены в клинике детской ортопедии Новосибирского НИИТО от 15 детей в возрасте 10-14 лет с деформациями позвоночника (от 90 до 90-120 °) на почве нейрофиброматоза NF-1. Больные подвергались операции: anterior Releasing and interbody fusion. В качестве контроля были использованы структурные компоненты позвоночника детей (12-14 лет) без патологии позвоночника, полученные на кафедре судебной медицины. Ткани фиксировали в 10% растворе формалина, костную ткань подвергали декальцинации в холодном трилоне «Б». После депарафинирования срезы окрашивали гистологическими методами (гематоксилин-эозин по Ван Гизону и Маллори), гистохимическими методами (толуидиновым синим при разных значениях pH, альциановой синью, Хейл-реакцией, Шик-реакцией).

Материалом для исследования уровня экспрессии генов – GAPDH, агрекана, люмикана и NF-1 методом ПЦР-анализа служили клетки, выделенные из ПР тел позвонков (операционный материал). В качестве контроля использовались хондробласты, выделенные из пластинок роста тел позвонков человека в возрасте 12-14 лет. Гиалиновый хрящ отмывали в растворе Хенкса с канамицином 1г/л в течение 15 минут, измельчали в чашке Петри с минимальным объемом среды RPMI до размеров 1-2 мм², затем помещали в раствор 1,5% коллагеназы в силиконизированной посуде для инкубирования на шейкере при температуре 37 °С

в течение 18-22 часов. Суспензию пропускали через нейлоновый фильтр и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин.

Суммарную РНК выделяли с использованием реагента PureLink Total RNA Purification System (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. Для очистки РНК от ДНК использовали реагент DNA-free™ DNase Treatment and Removal Reagents (Ambion, США).

Для проведения обратной транскрипции использовали реагент M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, США). Все процедуры проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Для синтеза кДНК брали по 6 мкг РНК на пробу.

Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовались праймеры F: 5'-GTGCAGCAGGATGCAGCGGA-3' и R: 5'-GCACACTCCCCAAGGGCAC-3' для гена NF-1 человека с размером целевого фрагмента 548 bp, F: 5'-ATCGTCACCCCGAGGAGCAG-3' и R: 5'-GGCGCTGGACAAACCCCTCTG-3' (379 bp) для гена агрекана человека, F: 5'-GTGACTGGGCTGGGTCTCCCC-3' и R: 5'-GGCACTGGGTAGCTTTCAGGGC-3' для гена люмикана человека (329 bp), а также праймеры F: 5'-GGGCGCCTGGTCACCAG-3' R: 5'-AACATGGGGGCATCAGCAGAG-3' (350 bp) для гена GAPDH.

Аmplификацию фрагментов генов GAPDH, агрекана, люмикана и NF-1 проводили методом ПЦР на амплификаторе Терцик (Компания «ДНК Технологии», Россия). Ген GAPDH использовали в качестве эндогенного внутреннего контроля. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл, с добавлением ≈200 нг к ДНК, 2 мкл 10x ПЦР-буфера (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8,3), 20 пмоль каждого праймера, 0,2 ммоль каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата и 1 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы. Реакционную смесь покрывали равным объемом минерального масла. ПЦР проводили при следующих условиях: начальная денатурация 5 мин при 95,0 °С, денатурация 30 сек при 95,0 °С, отжиг праймеров 30 сек при 58-60,0 °С, элонгация 30 сек при 72,0 °С, 5 мин при 72,0 °С. Для гена GAPDH амплификация проводилась в течение 25 циклов, для генов агрекана и NF-1 в течение 30 циклов.

Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1,5-2% агарозном геле в буфере TAE (0,04 M Tris-HCl, 0,05 M EDTA pH 8,0) с содержанием 1 мкг/мл бромистого этидия. Сканирование геля проводили в УФ свете с помощью видеосистемы «DNA Analyzer» (Москва).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ Морфологические исследования структурных компонентов позвоночника показали, что на вогнутой стороне кривизны пластинка роста представлена мелкими, без определенной ориентации, плотно расположенными клетками, местами - в дистрофически измененном матриксе (рис.1). По своим фенотипическим признакам это малодифференцированные хондробласты эмбрионального типа, о чем свидетельствует как ультраструктурная организация, так и морфологическая характеристика этих клеток. Возникает вопрос: каким образом в пла-

стинке роста сохраняются клетки эмбрионального типа? Почему процесс дифференцировки и становления органной специфичности клеток не происходит? Для ответа на этот вопрос следует рассмотреть, прежде всего, происхождение этих клеток и причину их активной примитивной пролиферации.

Известно, что нейрофиброматоз – аутосомно-доминантная патология, в основе которой лежит мутация в клетках ганглиозной пластинки гена NF-1. Клетки ганглиозной пластинки на ранних стадиях гастрюляции, являясь производными нейроэктодермы, рассеиваются между экто- и эндодермой и формируют нервные ганглии, мозговое вещество надпочечников, вегетативную нервную систему, кости, хрящевые образования лицевого и головного черепа, дентин и т.д. (рис. 2). Надо полагать, что клетки ганглиозной пластинки мигрируют и в зачатки сегментированной мезодермы. Подтверждением подобного предположения является болезнь Реклингаузена - наличие множественных нейрофибром в дерме - производной сегментированной мезодермы. Кроме того, пролиферация хроматофоров в эпидермис является фактором формирования кофейных пятен – одного из ведущих симптомов нейрофиброматоза. Полученные факты свидетельствуют о возможности миграции клеток ганглиозной пластинки в дерматом и в склеротом, что согласуется с классическим высказыванием Дриша: «Если процесс движения клеток идет однотипно, то траектории клеток могут быть в известной степени случайными» [1]. Миграция клеток глиальной пластинки, несущих мутацию гена NF-1, в склеротом приводит к изменению фенотипа клеток глиальной пластинки, что согласуется с основным положением эмбриологии. «Мигрирующие клетки нервного гребня приобретают фенотип той среды, в которую они перемещаются, так как судьба клеток нервного гребня еще не детерминирована» [2]. На стадии хондрогенной дифференцировки склеротома клетки ганглиозной пластинки приобретают фенотип эмбриональных хондробластов, но генотип (мутация в гене NF-1) сохраняется. Ген NF-1 является опухолевым супрессором, экспрессирующим белок нейрофибромин. Этот ген контролирует активность онкобелков семейства Ras, переводя их в ГДФ – связанное состояние. Мутации в одном из аллелей гена NF-1 вызывает гиперэкспрессивность онкобелков Ras, что приводит к неконтролируемой стимуляции клеток и формированию опухолей. В пластинке роста – это хаотично, местами радиально расположенные низкодифференцированные хондробласты, сохраняющие «компетенцию эмбрионального материала». Эти клетки «лишены специализированных структур и не выполняют специальных частных функций, а обладают лишь органоидами общего значения, свойственными всякой клетке и выполняют лишь общие всем клеткам функции питания, дыхания, выделения, перемещения, растут, размножаются» [2]. На ранних стадиях развития большое количество клеток обеспечивает формирование матрикса и тканеспецифической структуры – это синтезы, направленные на образование тканеспецифических органоидов и рецепторного аппарата клеток. На смену ауто-паракринной

регуляции формируется соответствующая, иерархическая регуляция, при которой возникают межтканевые взаимодействия, обеспечивающие гомеостаз функционирующего органа. Тканеспецифичность – это предшествующая стадия органоспецифичности клеток. Нарушение процесса формирования органоспецифической функции хондробластов пластинки роста на вогнутой стороне кривизны приводят к асимметрии роста. Прimitивные хондробласты не проходят стадий дифференцировки – не интегрируются в хондроны, не формируют специфических рецепторов, способных к восприятию регулирующих «сигналов» гормональной и др. систем. «Одиночные клетки не воспринимают действия индуктора и не способны к синтезу специфических ферментов» [3]. Мутация гена NF-1 приводит к разрыву необходимой цепочки формообразовательного процесса «клетка – ткань – орган». Нарушение специфической пролиферации и дифференцировки хондробластов сопровождается и резким нарушением остеогенеза. Так же, как и в пластинке роста, на фоне пролиферации остеобластов и остеокластов наблюдается беспорядочное формирование неминерализованных балочных структур (рис.3). Интенсивная пролиферация хондробластов выходит за пределы пластинки роста. Пролiferаты внедряются в тело позвонка и ограничиваются тонкими костными пластинками, что обуславливает фистончатость тел позвонков - один из рентгенологических симптомов рассматриваемой патологии. Нарушение структурной организации костной ткани связано с активностью Ras – белков, стимулирующих митотическую активность остеобластов, на фоне низкой экспрессивности гена люмикана и высокой экспрессии гена агрекана (рис.4). Эти гены регулируют разные стадии остеогенеза, поэтому не исключено и двойное влияние этих генов.

Значительный интерес представляют изменения в межпозвоночном диске. На вогнутой стороне кривизны в разных отделах диска обнаруживаются как отдельные пролифераты, состоящие из малодифференцированных хондробластов, так и образования, подобные нейрофибромам (рис.5). В некоторых препаратах наблюдается формирование полисадных структур. Полученные факты подтверждают положение о том, что клетки ганглиозной пластинки в зависимости от места миграции приобретают соответствующий фенотип. Один из главных вопросов – это процесс формирования деформации позвоночника на фоне нейрофиброматоза. Морфологические исследования свидетельствуют о нарушении структурной организации пластинки роста на вогнутой стороне кривизны, тогда как на выпуклой сохраняются закономерности и стадийности дифференцировок хондробластов и адекватного остеогенеза (рис.6). Закономерности независимого развития разных отделов тел позвонков и дифференцированная генная регуляция этих зон подтверждает возможность миграции клеток ганглиозной пластинки в один из зачатков формирующихся структурных компонентов позвоночника. Об этом свидетельствует четкая граница между выпуклой и вогнутой сторонами кривизны (рис.7). Продолженный рост – адекватная пролиферация, дифференциров-

ка и остеогенез на выпуклой стороне кривизны и грубое нарушение функции роста на вогнутой стороне кривизны - является причиной асимметрии роста и формирования деформации позвоночника. Патогенетические механизмы деформации позвоночника при нейрофиброматозе и идиопатическом сколиозе отличны, хотя обе патологии являются результатом генетических нарушений роста.

Одной из особенностей сколиоза на фоне нейрофиброматоза является прогрессирование деформации после оперативного вмешательства. Прогрессирование деформаций (модуляцию) следует рассматривать в связи с продолжающейся пролиферативной активностью в структурных компонентах позвоночника – межпозвонковом диске, теле позвонка и хрящевой ткани. Патологический процесс при исследуемой патологии распространяется на все структурные компоненты позвоночника, а не только на пластинку роста, как это происходит при идиопатическом сколиозе.

Пролиферацию клеток в теле позвонка, пластинке роста и диске следует рассматривать как бластоматозный процесс. В таком случае прогрессирование деформации позвоночника и ложные суставы после оперативного вмешательства можно объяснить как продолжающейся пролиферацией хондро- и фибробластов в межпозвонковом диске и теле позвонка, так и нарушением osteo-хондрогенеза, регуляция которых в результате мутации гена NF-1 нарушена.

ВЫВОДЫ

Этиологическим фактором формирования деформации позвоночника при нейрофиброматозе является мутация в клетках ганглиозной пластинки гена NF-1. Миграция клеток, несущих мутантный ген в одну из зон склеротома, приводит к активации онкогена и интенсивной пролиферации хондро-, osteo- и фибробластов в ПР, межпозвонковом диске и теле позвонка. В связи с тем, что мутация затрагивает самые ранние стадии эмбриогенеза, становление дефинитивных структурных компонентов позвоночника в патологически измененных зонах нарушается.

Продолженный процесс деформации позвоночника (модуляция) после оперативного вмешательства объясняется пролиферацией хондро- и фибробластов в теле позвонка и межпозвонковом диске и нарушением процесса osteo-хондрогенеза в результате мутации гена NF-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоусов Л.В. Введение в общую эмбриологию. Москва: МГУ, 1980. 216 с.
2. Кнорре А.Г. Эмбриональный гистогенез. Ленинград: Медицина, 1971. 431 с.
3. Корочкин Л.И. Взаимодействие генов в развитии. Москва: Наука, 1977.
4. Aegeter E. The possible relation-ship of neurofibromatosis, congenital pseudoarthrosis and fibrous dysplasia // J Bone Joint Surg [Am]. 1950. V. 32. 618p.

5. Akbarnia B.A., Gabriel R.R., Beckman E., Chal D. Prevalence of scoliosis in neurofibromatosis // *Spine*. 1992. V.17. P. 244-248.
6. Betz R.R., Iorio Lombardi A.V., Clancy M., Steel H.H. Scoliosis surgery in neurofibromatosis // *Clin Orthop*. 1989. V. 245. P. 53-56.
7. Biesecker L.G. The multifaceted challenges of Proteus syndrome // *JAMA*. 2001. V. 285. P. 2240-2243.
8. Bunyatov R. Clinical roentgenographic characteristics of scoliosis in neurofibromatosis // *Pediatrics (USSR)*. 1983 . V. 5. P. 49-51.
9. Calvert P.T., Edgar M.A., Webb P.J. Scoliosis in neurofibromatosis. Natural history without operation // *J Bone Joint Surg [Br]*. 1989. V. 71. P.246-251.
10. Cawthon R.M., Weiss R., Xu G.F., Viskochil D., Culver M., Stevens J. et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations // *Cell*. 1990. V. 62. P.193-201.
11. Chaglassian J.H., Ristborough E.J., Hall J.E. Neurofibromatous scoliosis // *J Bone Joint Surg [Am]*. 1976. V. 58. P. 695-702.
12. Cnossen M.N., de Goede-Bolder A., van den Broek K.M., Waasdorp C.M., Oranje A.P., Stroink H. et al. A prospective 10 years follow up study of patients with neurofibromatosis type 1 // *Arch Dis Child*. 1998. V. 78. P. 408-412.
13. Crawford A.H. Neurofibromatosis. In: Weinstein SL (ed) // *The pediatric spine: Raven Press, New York*. 1994. P. 619-649.
14. Crawford A.H. Neurofibromatosis. In: Weinstein SL (ed) // *The pediatric spine: principles and practice, 2nd edn*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2001. P. 471-490.
15. Durrani A., Crawford A.H., Choudhry S.N., Saifuddin A., Morley T.R. Modulation of spinal deformities in patients with neurofibromatosis type 1 // *Spine*. 2000. V. 25. P. 69-75.
16. Flood B.M., Butt W.P., Dickson R.A. Rib penetration of the intervertebral foraminae in neurofibromatosis // *Spine*. 1986. V. 11. P.172-174.
17. Funasaki H., Winter R.B., Lonstein J.B., Denis F. Pathophysiology of spinal deformities in neurofibromatosis // *J Bone Joint Surg (Am)*. 1994. V. 76. P. 692-700.
18. Goldberg N.S., Collins F.S. The hunt for the neurofibromatosis gene // *Arch. Dermatol*. 1991. V. 124. P. 1701-1707.
19. Goldberg N.S., Collins F.S. The hunt for the neurofibromatosis gene // *Arch. Dermatol*. 1991. V. 127. P. 1705-1709.
20. Kim H.W., Wienstein S.L. Spine update: the management of scoliosis in neurofibromatosis // *Spine*. 1997. V. 22. P. 2770-2776.
21. North K. Neurofibromatosis type 1: review of the first 200 patients in an Australian clinic // *J Child Neurol*. 1993. V. 8. P. 395-402.
22. Sirois J.L., Drennan J.C. Dystrophic spinal deformity in neurofibromatosis // *J Pediatr Orthop*. 1990. V. 10. P. 522-526.
23. Tsirikos A. I., Saifuddin A., Noordeen M.H. Spinal deformity in neurofibromatosis type – 1: diagnosis and treatment // *Eur. Spine J*. 2005. V. 14. P. 427-439.
24. Vitale M. J., Juha A., Skaggs D.J. Ophthodaedic manifestation of neurofibromatosis in children: update // *Clin Orthop*. 2002. V. 401. P. 107-118.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ

Рисунок 1.

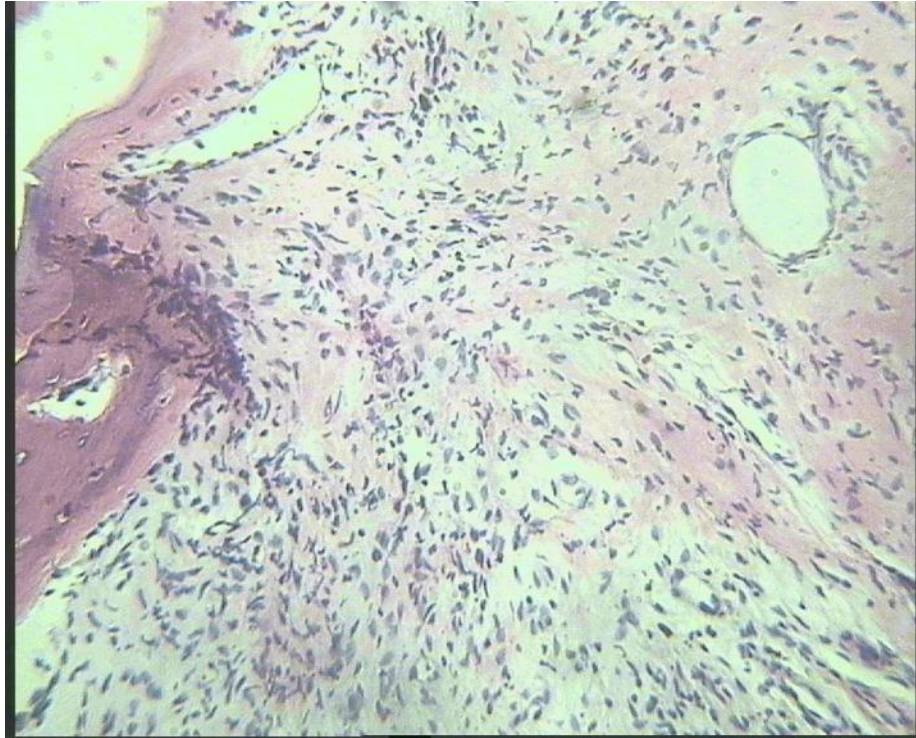


Рисунок 2.

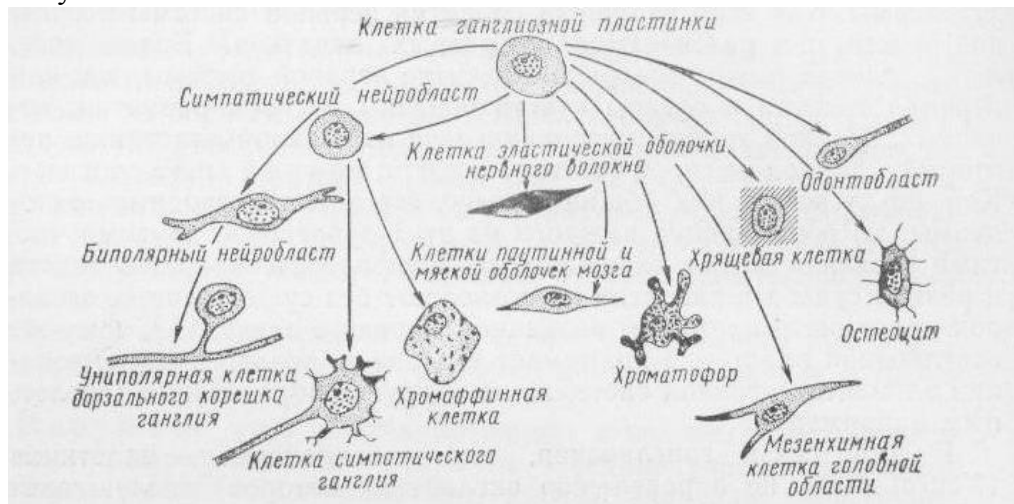


Рисунок 3.

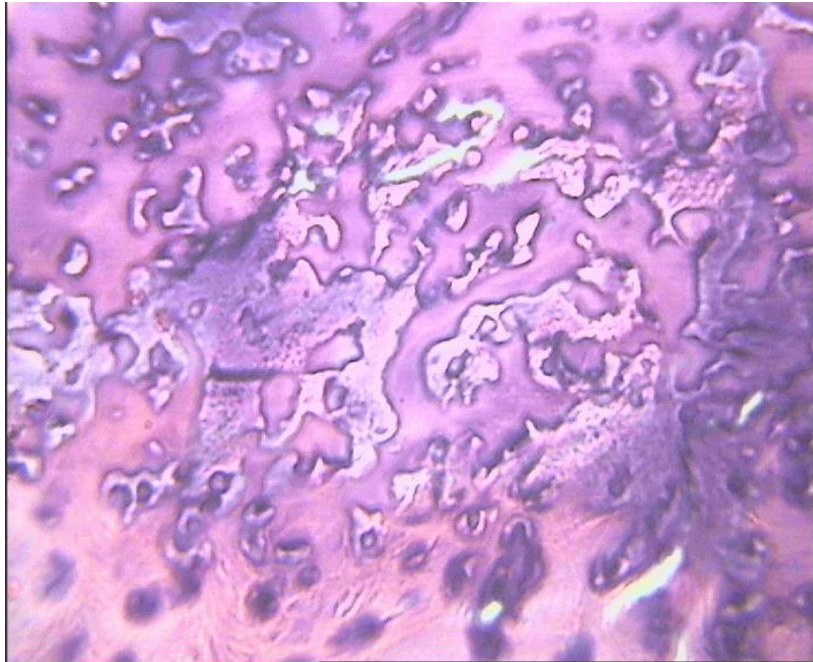
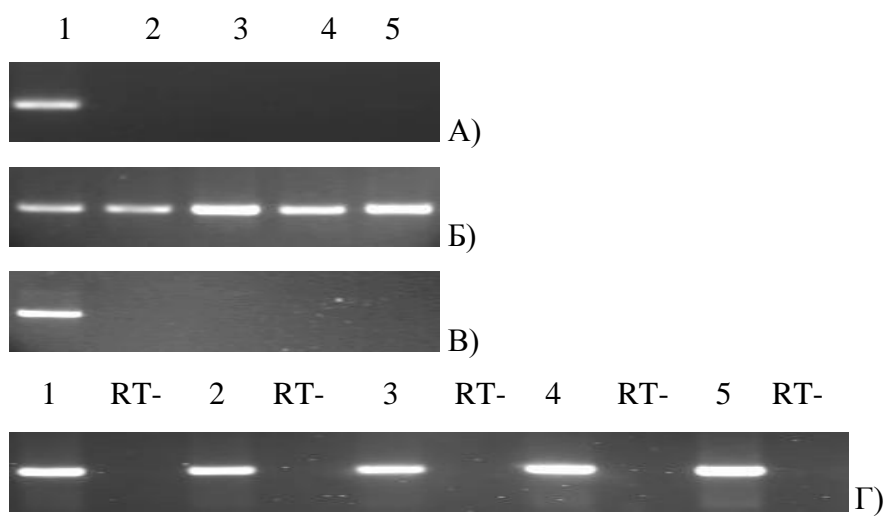


Рисунок 4.



ПЦР-анализ экспрессии генов: NF-1 гена (А), агрекана (Б), люмикана (В), GAPDH (Г).

Рисунок 5.

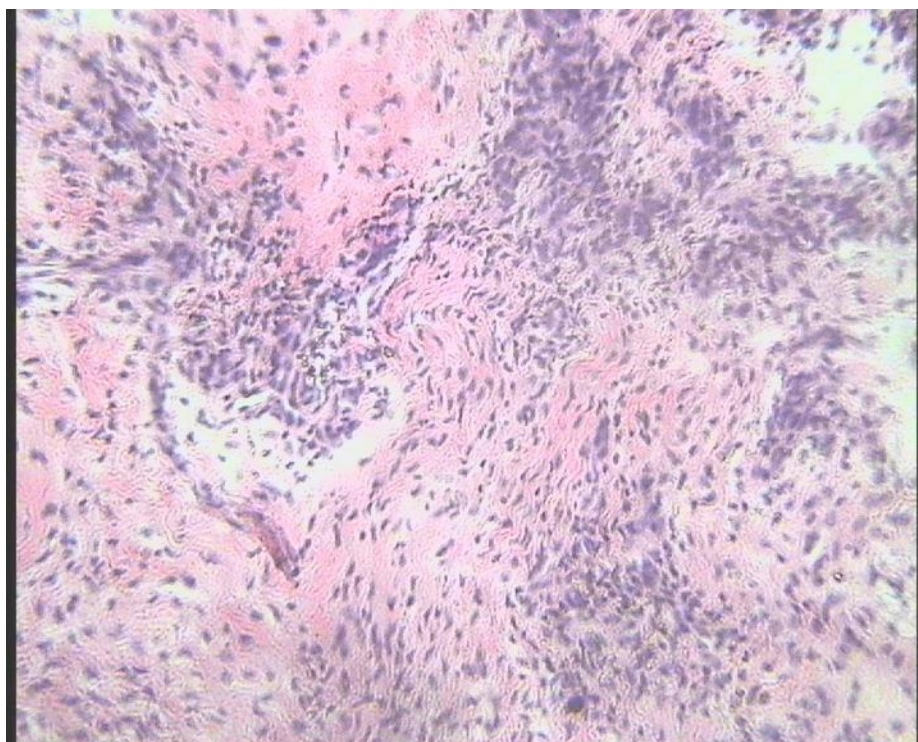


Рисунок 6.

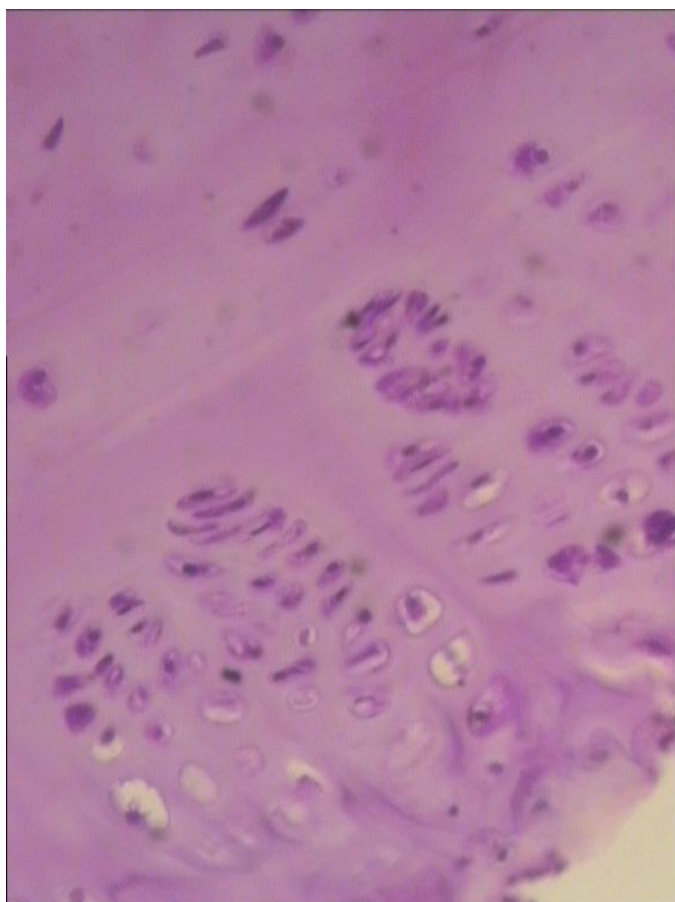
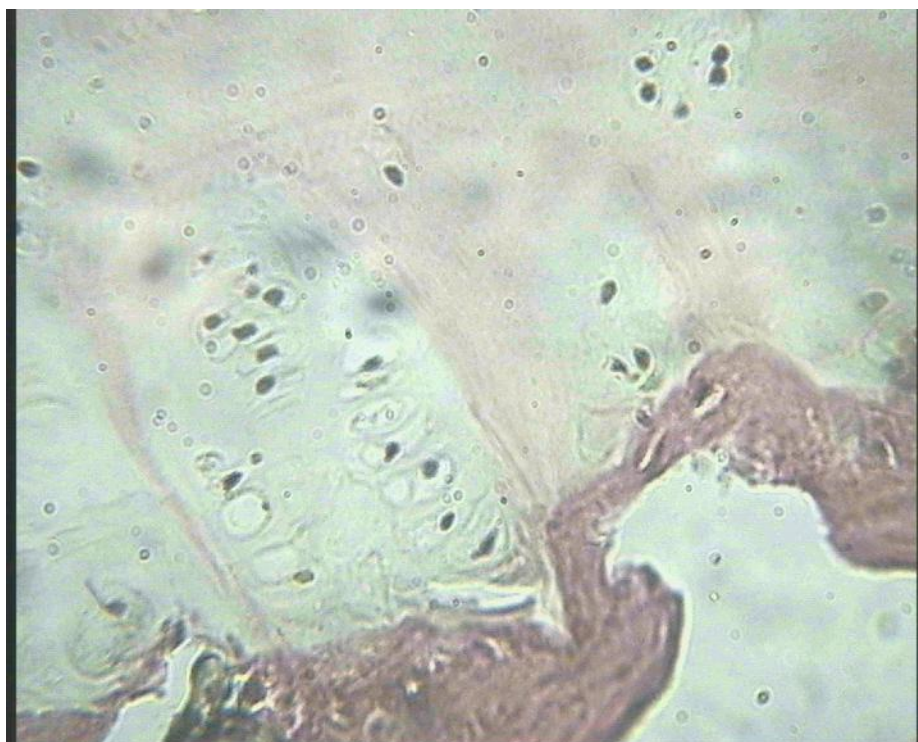


Рисунок 7.



Подписи к рисункам

Рис. 1. **Пролиферация низкодифференцированных хондробластов в пластинке роста тела позвонка на вогнутой стороне кривизны. Окраска гематоксилин-эозин; 10 x 20**

Рис. 2. «Судьба» клеток ганглиозной пластинки (по А.Г. Кнорре)

Рис. 3. **Беспорядочное расположение костных балок на стадии минерализации (вогну-тая сторона кривизны). Окраска гематоксилин-эозин; 10 x 10**

Рис. 4. ПЦР-анализ экспрессии генов: NF-1 гена (А), агрекана (Б), люмикана (В), GAPDH (Г).

1 – образец пластинки роста здорового ребенка;

2-5 – образцы пластинок роста детей, больных нейрофиброматозом NF-1;

RT- – отрицательный контроль.

Рис. 5. **Пролиферация хондро- и фибробластов в межпозвонковом диске. Окраска гематоксилин-эозин; 10 x 20**

Рис. 6. **Гранулы гликогена в цитоплазме клеток пластинки роста вогнутой стороны кривизны. Шик-реакция; 10 x 40**

Рис. 7. **Граница между вогнутой и выпуклой сторонами деформации. Пластинка роста тела позвонка на высоте деформации. Окраска по Ван Гизону; 10 x 40**

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА И АПОЛИПОПРОТЕИНА E

Корнева В.А.

Петрозаводский государственный университет Петрозаводск, пр. Ленина 33, кафедра факультетской терапии Тел.:8142-78-06-85, e-mail:vikkorneva@mail.ru

РЕЗЮМЕ: Множество исследований указывают на то, что в развитии артериальной гипертензии и атеросклероза наследственные факторы могут играть значительную роль. Атеросклероз и артериальная гипертензия являются мультифакторными заболеваниями. Для изучения таких заболеваний часто используется подход с выделением так называемых генов-кандидатов. Геном-кандидатом называют ген, продукт экспрессии которого (фермент, рецептор, структурный или транспортный белок) может прямо или косвенно участвовать в развитии изучаемой болезни. Целью обзора явилась систематизация сведений о генах – кандидатах, продукты экспрессии которых связаны с развитием сердечно-сосудистых заболеваний. Рассмотрены гены ангиотензинпревращающего фермента, ген аполипопротеина E.

Ключевые слова: ген ангиотензинпревращающего фермента, АпоЕ ген, аллель, прогноз, молекулярные и генетические маркеры, нестабильная стенокардия, инфаркт миокарда, атеросклероз, гипертрофия левого желудочка.

SUMMARY: Epidemiological studies suggest that arterial hypertension and atherosclerosis can be attributed to genetic loci. Atherosclerosis and essential hypertension are the multifactorial diseases. For elucidating the genetic causes of this diseases candidate gene studies are usually used. The product of the gene candidate (protein, enzyme, receptor) showed to be involved into pathogenesis of the disease. The aim of this review is to summarize data on candidate genes associated with cardiovascular disease. We present a study of the angiotensin-converting enzyme gene and ApoE gene.

Key words: ACE gene, ApoE gene, allele, prognosis, molecular and genetic markers, unstable angina, myocardial infarction, left ventricular hypertrophy.

В России в последние 30 лет отмечается эпидемический рост заболеваемости и высокая смертность от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), которая составляет около 55% общей смертности. Показатели общей смертности от ССЗ в России в 2-4 раза превышают таковые в западноевропейских странах: США, Канаде, Австралии[59]. Атеросклеротическое поражение сосудов занимает главенствующее место среди патогенетических механизмов ИБС. В связи с этим в настоящее время стоит проблема первичной профилактики атеросклероза. В каком возрасте нужно начинать первичную профилактику и кому[8]. Генотип человека не меняется в течение жизни и не подвержен влиянию модифицирующих факторов внешней среды, т.е. анализ ДНК позволяет выявить генетическую предрасположенность к нарушению липидного обмена задолго до проявления клинических признаков атеросклероза. К настоящему времени изучена роль нескольких десятков генов-«виновников» ИБС и атеросклероза.[8, 10]. Это гены, кодирующие синтез белков, участвующих в транспорте и метаболизме липидов; контролирующие пролиферацию клеток гладкомышечной ткани кровеносных сосудов кардиомиоцитов, уровень артериального давления, воспаления и апоптоза.

Ген ангиотензинпревращающего фермента. Одним из основных патогенетических механизмов сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе артериальной гипертензии, ИБС, атеросклероза, является нарушение функции эндотелия. Важнейшим фактором эндотелиальной дисфункции является гиперактивность ренин-ангиотензин-альдостеронной системы (РААС), которая отвечает за регуляцию тонуса кровеносных сосудов, поддержание водно-солевого гомеостаза, стимулирует пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов и кардиомиоцитов, т.е. РААС напрямую вовлечена в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний, что подтверждается клиническим опытом использования ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента в лечении артериальной гипертензии, сердечной недостаточности, цереброваскулярной патологии [1, 6, 7, 9, 10, 23, 25, 37, 49, 50].

Известно, что ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) гидролизует ангиотензин I в ангиотензин II-альдостерон-стимулирующий пептид, и в то же время он инактивирует брадикинин. Повышенный уровень АПФ через продукцию ангиотензина II и брадикинина способствует развитию атеросклероза, тромбоза и супрессирует эндогенную фибринолитическую функцию. Индивидуальные различия уровня фермента в плазме крови на 50% определяются инсерционно-делеционным полиморфизмом по Alu повтору 16 интроне гена АПФ (I/D полиморфизм). У пациентов с делеционным генотипом DD уровень фермента в плазме крови примерно 2 раза выше, чем у пациентов с генотипом II, а пациенты с генотипом ID имеют промежуточный уровень фермента [51].

Изучение инсерционно-делеционного (I/D) полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) позволило установить связи аллеля D и генотипа DD гена АПФ с предрасположенностью к инфаркту миокарда (ИМ) и летальному исходу, а аллеля I и генотипа ID и II – с более благоприятным течением заболевания [7, 17, 23]. При остром коронарном синдроме у больных с генотипом DD выявлялся значительно меньший временной интервал между первым ангинозным приступом и развитием ИМ, чем у носителей генотипов ID и II гена АПФ [34]. Данные наблюдения делают актуальным анализ связей генотипов гена АПФ с клиническим течением ИБС и своевременностью начала лечения ИМ [9].

По данным Малыгиной [2009], генотип DD гена АПФ ассоциируется с развитием крупноочагового КФК/КФК-МВ- позитивного инфаркта миокарда. Вероятность развития мелкоочагового ИМ, также как и нестабильной стенокардии, сопоставим с таковой у больных с ID и II генотипа гена АПФ [8]. При остром коронарном синдроме (ОКС) генотип DD гена АПФ выступает как фактор риска преимущественно в возрасте до 65 лет, при этом вероятность летального события при ОКС у носителей генотипа DD с возрастом меняется незначительно [8].

Ассоциативные связи генотипов, как правило, популяционно-специфические и отражают историю развития популяции, влияние отбора и др.

Ассоциация аллеля D гена ACE с увеличенной массой миокарда левого желудочка (ММЛЖ) была подтверждена в работе Iwai и соавт. [34]. В ряде работ [32, 49] установлено, что индекс массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ) у больных артериальной гипертензией с генотипами DD и ID выше, чем у носителей генотипа II. Однако по данным некоторых авторов [33, 40], не обнаружена ассоциация полиморфного маркера типа I/D гена ACE с гипертрофией левого желудочка (ГЛЖ).

Установлено, что соотношения частот аллелей и генотипов гена АПФ в разных популяциях значительно отличаются. Так, и меньшая частота аллеля D и генотипа DD обнаружены на Востоке: в Японии и в Китае, а наиболее высокие - в странах Западной Европы и США, что коррелирует с распространенностью ИБС и частотой факторов риска этого заболевания [56]. Однако, согласно данным ряда молекулярно-генетических исследований, повышение риска ИБС и вероятности ее неблагоприятного течения у носителей генотипа DD не опосредовано такими «классическими» факторами риска заболевания как курение, избыточная масса тела, артериальная гипертензия, гиперхолестеринемия [23]. Поэтому с точки зрения профилактического подхода представляет интерес связь генетических и личностно-поведенческих особенностей, рассматриваемых в качестве психологических факторов риска ИБС [7, 9]. Осуществленный по гену АПФ генотипический дифференцированный анализ психологического портрета больных ИБС показал, что носители генотипа DD достоверно чаще, чем носители генотипов ID и II, имели повышенный уровень общей враждебности (по шкале враждебности Кука и Мэдди) и принадлежали к поведенческому «стресс-коронарному типу А» (по сокращенному тесту Дженкинса). Сочетание повышенной враждебности, выражающейся в негативных отношениях и оценках применительно к окружающим людям и событиям, и признаков поведения типа А (склонность к соперничеству, амбициозность, нетерпеливость и напряженность) также достоверно чаще выявлялось у больных ИБС с генотипом DD [1]. Это может объяснять предрасположенность носителей генотипа DD к развитию ИБС даже при отсутствии у них общепризнанных факторов риска развития атеросклероза. При этом наиболее часто носители генотипа DD обнаруживались в группе пациентов с повторным и осложненным инфарктом миокарда, а у больных первичным инфарктом миокарда носительство генотипа DD ассоциировано с достоверно большей выраженностью эхокардиографических показателей постинфарктного ремоделирования и нарушения диастолической функции левого желудочка, а также с наличием идиопатической кардиопатии [1, 23, 35].

Показано, что генотип DD ангиотензин - превращающего фермента является потенциальным фактором риска для развития атеросклероза каротидных артерий с формировани-

ем гемодинамически значимых стенозов [19], при этом связь генотипа с развитием ишемического инсульта не установлена [15, 18, 21, 25, 43]. Вероятно, это свидетельствует о менее прямолинейной связи атеросклероза мозговых артерий крупного калибра с морфофункциональным состоянием мозга. Мозговой кровоток зависит не только от выраженности атеросклеротического поражения сосудов и степени стеноза. Но не в меньшей степени и от механизмов, предотвращающих развитие ишемии-состояния коллатерального кровообращения, способности мозговых сосудов к расширению, индивидуальной чувствительности ткани мозга к ишемии. Указанные гемодинамические резервы мозга позволяют существовать «бессимптомным» стенозам - без наличия жалоб и объективных клинических проявлений у пациентов [19].

По данным Скворцовой и соавт. [2007], распределение генотипов АПФ в популяции практически здоровых москвичей показало увеличение с возрастом частоты выявления аллеля D и генотипа DD. Наибольшая частота наличия генотипа DD наблюдалась у долгожителей (старше 80 лет), не имевших инсультов в анамнезе [15]. Вероятно, процесс формирования атеросклероза сосудов и ишемизация органов и тканей является универсальным компонентом процесса старения организма. Выбор же органа-мишени, наиболее подверженного воздействию ишемического повреждения, а также пути, по которому будет развиваться патологический процесс (острая ишемия или хронические дегенеративные изменения), вероятно, определяется другими факторами [14].

В исследовании REGRESS[5], было показано, что генотип DD ассоциируется с достоверно более высоким риском ишемических эпизодов и более низкой эффективностью правастатина, чем у пациентов с другими генотипами.

Генетический полиморфизм лежит в основе патофизиологии заболеваний и может сказываться на эффективности терапии лекарственными препаратами за счет модификации их метаболизма, всасывания, экскреции, изменения структуры и функции рецепторов, на которые воздействуют лекарства [10, 11].

Лечение артериальной гипертензии снижает риск возникновения ИМ у носителей генотипа DD в большей степени, чем у носителей ID генотипа гена АПФ. Напротив, у носителей II генотипа гена АПФ, имеющих исходно низкий риск развития ИМ, использование традиционных гипотензивных средств менее эффективно [13].

Гены, кодирующие элементы ренин-ангиотензиновой системы, рассматриваются как основные гены-кандидаты для препаратов из группы иАПФ и блокаторов ангиотензиновых рецепторов. Одним из первых исследований, посвященных изучению фармакогенетических взаимодействий иАПФ, было изучение гипотензивного эффекта внутривенного введения эналаприла в зависимости от генотипа полиморфного маркера I/D гена ACE у здоровых добровольцев. Оказалось, что у лиц с генотипом II реакция на ведение эналаприла была наибо-

лее выраженной и максимальной по длительности [60]. Влияние терапии эналаприлом в дозе 5-10 мг/сут на степень гипертрофии миокарда левого желудочка было изучено у 60 больных АГ, не получавших ранее гипотензивной терапии. Оказалось, что наибольшая степень регрессии гипертрофии левого желудочка при лечении эналаприлом была у больных с генотипом DD полиморфного маркера I/D гена ACE [54]. У этих же больных отмечалось улучшение диастолического расслабления левого желудочка. Однако такая закономерность наблюдалась не во всех исследованиях. Так, при исследовании немецкой популяции, в которое были включены 121 больной АГ и 125 здоровых лиц, не были выявлены ни ассоциация полиморфных маркеров I/D гена ACE, ни связь с эффективностью терапии каптоприлом [45]. Не была выявлена также зависимость влияния иАПФ на степень гипертрофии левого желудочка у больных АГ от генотипа гена ACE при длительном (в течение 5 лет) наблюдении [52]. При длительной терапии иАПФ наблюдается так называемый «феномен ускользания» альдостерона, когда у части больных отмечается повышение уровня этого нейрогормона. При проспективном наблюдении за 132 больными с сердечной недостаточностью (с фракцией выброса менее 45%) было выявлено, что феномен «ускользания альдостерона» ассоциируется с генотипом DD гена ACE. При этом дозы иАПФ у больных с разными генотипами ACE и разным уровнем альдостерона достоверно не различались [27].

Интересны также данные исследования по изучению фармакогенетических свойств разных иАПФ (каптоприл и лизиноприл), которые сравнивались в двойном слепом перекрестном исследовании у 34 больных с симптоматической сердечной недостаточностью, с выраженной систолической дисфункцией (средняя фракция выброса составила 24%). Оценивалось влияние препаратов на уровень АД и скорость клубочковой фильтрации. Оказалось, что снижение среднего АД при лечении каптоприлом было наиболее значимым у больных с генотипом II гена ACE по сравнению с носителями генотипов ID и DD (соответственно 7,4; 4,7 и 0,5 мм.рт.ст). Влияние лизиноприла на АД у носителей разных генотипов достоверно не различалось. Эффект обоих препаратов по отношению к скорости клубочковой фильтрации также не зависел от генотипа полиморфного маркера типа I/D гена ACE [58].

Показана также связь развития сухого кашля при терапии иАПФ с генотипом полиморфного маркера I/D гена ACE. При лечении иАПФ пожилых больных АГ в китайской популяции оказалось, что сухой кашель чаще возникал у больных с генотипом II полиморфного маркера I/D гена ACE. У этих же больных уровень АПФ был наименьшим по сравнению с носителями генотипов I/D и DD [62]. В то же время в американской популяции не была отмечена ассоциация появления сухого кашля при терапии иАПФ с полиморфными маркерами генов ACE, химазы и рецепторов брадикинина второго типа [62]. Генотип II полиморфного маркера I/D гена ACE ассоциировался с достоверно большим снижением диастолического АД при лечении ирбесартаном, для атенолола такой закономерности не было вы-

явлено [38, 39]. Не была выявлена связь регрессии гипертрофии левого желудочка под влиянием терапии ирбесартаном и атенололом с полиморфными маркерами гена ACE [44].

В исследовании, проведенном у 199 больных с сердечной недостаточностью, при длительном наблюдении (около 3 лет) не получены доказательства влияния полиморфного маркера I/D гена ACE на выживаемость этой группы больных. Эффективность терапии В-адреноблокаторами у данной группы больных также не связана с генотипом гена ACE [29].

Группой авторов [57] было показано, что у белых американцев максимальная эффективность стандартной гипотензивной терапии гидрохлортиазидом связана с разными аллелями гена ACE у мужчин и женщин, при этом у женщин эффект диуретиков был максимальным у носителей генотипа II, а у мужчин - у носителей генотипа DD.

По данным Никулиной [2002], генотипы ID и DD ассоциируются с развитием атрио-вентрикулярной блокады, в то время как генотип II - с формированием внутрижелудочковой блокады [12].

Ген аполипопротеина Е. Аполипопротеин Е является структурным компонентом нескольких видов липопротеинов. Он входит в состав атерогенных триглицерид-богатых липопротеинов (хиломикроны, ЛПОНП и ЛПНП) и в состав липопротеинов высокой плотности.

Человеческий апо-Е-генетический полиморфный белок, вовлеченный в транспорт и метаболизм холестерина, состоит из 299 аминокислот. Описаны около 30 вариантов апоЕ [5, 8]. Известны три аллеля гена апо-Е, содержащиеся в одиночном гене локуса хромосомы 19, в положении 19q13.2. $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ - это код трех изоформ аполипопротеина Е (E2, E3, E4), которые различаются по аминокислотной замене в остатках 112 и 158 и также детерминируют шесть фенотипов комбинаций двух из них [63]. Норме соответствует аллель $\epsilon 3$ [5]. Частота выявления аллелей гена апо-Е во Фремингемской исследовании у 2457 здоровых субъектов составила: $\epsilon 2$ -8%, $\epsilon 3$ -78% и $\epsilon 4$ -14% [55]. При исследовании распространенности полиморфизма гена апо-Е в мире установлено, что аллель $\epsilon 3$ - самый часто встречающийся во всей популяции людей, и его частота всегда отрицательно коррелирует с частотой аллеля $\epsilon 4$ [26], который выявляется относительно часто в популяции, где отмечается недоедание.

Форма белка E4 связана с повышенным уровнем общего холестерина и ЛПНП по сравнению с E2 и E3, что в дополнение к повышенной усвояемости в кишечнике лежит в основе хорошо известного гиперхолестеринемического эффекта аллеля $\epsilon 4$, который ассоциируется с высоким риском атеросклероза, инфаркта миокарда и сердечно-сосудистой смертности [28, 30, 58]. Кроме того, апо-Е4 в большей степени присутствует в ЛПОНП, а апоЕ3 - в ЛПВП [5]. Имея максимальное сродство к апо-Е-рецепторам и наибольшую скорость катаболизма, апоЕ4-содержащие ЛПОНП быстро переходят в ЛПНП. Есть данные, что ЛПНП-рецепторы имеют большую активность у гомозигот по $\epsilon 2$, а гомозиготы по $\epsilon 4$ - меньшую,

чем гомозиготы по $\epsilon 3$ [5]. Этим можно объяснить связь аллеля $\epsilon 4$ с повышенным риском ИБС и более высокими уровнями общего холестерина и ЛПНП, по сравнению с другими формами апо-Е. Форма E2, напротив, связана с более низким уровнем ЛПНП, но с повышенным уровнем ТГ [41].

Липопротеины, содержащие апо-Е2, уменьшают связывание с ЛПНП-рецепторами; таким образом, их уровень в плазме снижается. Это обуславливает низкий внутриклеточный уровень ХС и нерегулярный синтез ГМГ-КОА-редуктазы. Однако повышенный риск сердечно-сосудистой смертности у носителей аллеля $\epsilon 4$ может быть снижен с помощью терапии статинами [31]. В этом же исследовании было показано, что пациенты с исходно низким синтезом холестерина являются менее чувствительными к терапии.

Известно, что в восточных популяциях (жители Японии), где население характеризуется низким уровнем холестерина в плазме крови и где значительно ниже частота ИБС, частота аллеля $\epsilon 4$ примерно в два раза ниже, чем в Европе. Напротив, у аборигенов Австралии, где высока частота ИБС, частота аллеля $\epsilon 4$ в два раза выше, чем в Западной Европе [56]. Аллель $\epsilon 2$ гена апоЕ обнаруживается достоверно чаще у больных ИБС в возрасте старше 90 лет (долгожителей) по сравнению с более молодыми, что позволяет рассматривать их в качестве маркеров стабильного течения ИБС [6,8].

Интересны результаты, полученные при изучении ответа на проводимую липидкорректирующую терапию (диета, статины) у лиц с различными аллелями гена апоЕ. Установлено, что у носителей аллеля $\epsilon 2$ гена диетотерапия имеет значительно меньший эффект. Видимо, для этих больных показана медикаментозная коррекция липидного профиля. Напротив, при наличии аллеля $\epsilon 4$ в генотипе, эффективность диетотерапии максимальна: отмечалось значительное снижение уровней триглицеридов и холестерина [8, 21, 33]. Таким образом, аллель $\epsilon 4$ гена апо Е может служить маркером предрасположенности к ИБС [8].

Эти результаты подтверждают также исследования [20], показавшие, что статины могут быть менее эффективными в снижении уровня ХС у индивидуумов с апо-Е4, которые могут иметь исходно низкую активность ГМГ-КОА-редуктазы [24, 46, 47, 50]. Снижение уровня общего ХС и ХС ЛПНП было большим у субъектов с аллелем $\epsilon 2$, чем у носителей $\epsilon 3$ и $\epsilon 4$. В некоторых исследованиях не были найдены существенные различия в гиполипидемической терапии статинами между генотипами апо-Е [22, 31, 36, 42, 53]. Другие исследования выявили зависимость терапии у мужчин от изоформ апо-Е, в то время как у женщин такая связь выявлена не была [24, 48].

По данным Демидовой, у больных с семейной комбинированной гиперлипидемией аллель E2 выявляется в 2,2 раза чаще (различие достоверно), а аллель E4 - в 2,8 раза реже, чем в контрольной группе. У 45,8% пациентов с семейной формой гиперлипидемии (ГЛП) была выявлена аллель E2, в то время как у лиц с ГЛП, не имеющей семейного характера, и в

контрольной группе частота носителей аллеля E2 составляла 20% и 24% соответственно. Эти различия обеспечивались в основном за счет значительного увеличения среди больных с семейной комбинированной ГЛП лиц с генотипом E2/E2 и E2/E3 [3].

Таким образом, накопленных сведений о генетической природе сердечно-сосудистых заболеваний в настоящее время недостаточно, некоторые из полученных данных противоречивы. Однако уже сегодня можно сделать вывод, что большая часть мутаций, найденных к настоящему времени, в какой-то степени определяют течение атеросклероза, ишемической болезни сердца и артериальной гипертонии и сроки развития осложнений. Является интересным изучение особенностей действия лекарственных препаратов у пациентов с разными генотипами и изучение распространенности аллельных частот описанных генов в регионах России, имеющих разную частоту сердечно-сосудистой патологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вершинин А.А., Мелентьев И.А., Малыгина Н.А. и др. Клиническое течение ишемической болезни сердца и постинфарктное ремоделирование у больных с различными генотипами гена ангиотензин-превращающего фермента // Вестник РГМУ.-2006.-№3(50).С.9-15.
2. Бражник В.А., Горашко Н.М., Минушкина Л.О. и др. Полиморфные маркеры I/D и G7831A гена фермента, превращающего ангиотензин I, и гипертрофия миокарда у больных артериальной гипертонией // Кардиология.-2003.-№2. С.44-49.
3. Демидова Д.В., Ларионова В.И., Волкова М.В. и др. Анализ влияния структуры генов липопротеиновой липазы, аполипопротеинов С III и E на развитие комбинированной гиперлипидемии // Кардиология.- 2001.-№8.-С.17-21.
4. Карпов Р.С., Пузырев К.В., Павлюкова Е.Н. Молекулярно-генетический анализ гипертрофии миокарда левого желудочка // Кардиология.- 2001.-№6.-С.25-29
5. Королева О.С., Затейщиков Д.А., Сидоренко Б.А. Генетические аспекты индивидуальной чувствительности к статинам // Кардиология.- 2005.-№5-С.60-70.
6. Костомарова И.В. Молекулярно-генетические маркеры особенностей течения ишемической болезни сердца и продолжительности жизни больных старших возрастных групп. Автореферат на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, 2002.
7. Малыгина Н.А., Костомарова И.В., Криводубская Т.Ю. и др. Анализ полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента у больных ишемической болезнью сердца и гипертонией //Кардиология.2000.-№4.-С.19-22.
8. Малыгина Н.А., Костомарова И.В., Мелентьев И.А. и др.Молекулярно-генетические маркеры для прогноза течения ишемической болезни сердца у больных старших возрастных групп //Российский кардиологический журнал.-2009.-№4(78).-С.68-72.
9. Мелентьев И.А., Вершинин А.А., Колесников Е.А. и др. Клиническое течение ишемической болезни сердца, постинфарктное ремоделирование, психологический статус и сроки госпитализации у больных с различными генотипами гена ангиотензин-превращающего фермента // Российский кардиологический журнал.- 2006. №3 (59).-С.6-16.
10. Минушкина Л.О., Затейщиков Д.А., Сидоренко Б.А. Генетические аспекты регуляции эндотелиальной функции при артериальной гипертонии // Кардиология.-2000.-№3.-С.68-75
11. Минушкина Л.О., Затейщиков Д.А., Сидоренко Б.А. Индивидуальная чувствительность к антигипертензивным препаратам: генетические аспекты //Кардиология.-2005.-№7.-С.58-65
12. Никулина С.Ю., Шульман В.А., Воротникова Ю.В. и др. Полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента у больных с нарушением сердечной проводимости // Кардиология.-2002.-№11.-С.44-47.
13. Сайгитов Р.Т. Острый коронарный синдром: клинико-генетические аспекты прогнозирования и профилактики. Автореферат диссертации на соискание степени д.м.н., 2007

14. Скворцова В.И., Кольцова Е.А., Константинов Е.В. Клинические формы атеросклероза сосудов мозга // Руководство по атеросклерозу и ишемической болезни сердца/ Под ред. Е.И. Чазова, В.В. Кухарчука, С.А. Бойцова.-М.: «Материя-медика», 2007.-С.199-214.
15. Скворцова В.И., Кольцова Е.А., Лимборская С.А. и др. Полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента у больных ишемической болезнью мозга//Инсульт. Журн. Неврол. и психиатр. Приложение. -2001.-№3.С.11-15.
16. Чазов Е.И. Ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, атеросклероз.1992, Москва. 178с.
17. Шахнович Р.М. Полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента и ишемическая болезнь сердца // Кардиология.-1999.Т.39.-№8.-С.68-74.
18. Aalto-Setälä K, Palomaki H., Miettinen H. et al. Genetic risk factors and ischaemic cerebrovascular disease: role of common variation of the genes encoding apolipoproteins and angiotensin-converting enzyme.//Ann Med 1998;30(2):224-233.
19. Amant C., Bauters C., Bodart J. et al. D Allele of the angiotensin- converting enzyme is a major risk factor for restenosis after coronary stenting.// Circulation 1997; 96 (1): 25-8.
20. Ballantyne C.M., Herd J.A., Stein E.A. Apolipoprotein E genotypes and response of plasma lipids and progression–regression of coronary atherosclerosis to lipid-lowering therapy[In Process Citation]/J Am Coll Cardiol 2000; 36:1572-1578.
21. Barley J., Markus H., Brown M., carter N. Lack of association between angiotensinogen polymorphism (M235T) and cerebrovascular disease and carotid atheroma // J Hum Hypertens 1995;9: 681-683.
22. Berglund L., Wiklund O., Eggertsen G. et al. Apolipoprotein E phenotypes in familial hypercholesterolaemia: importance for expression of disease and response to therapy. J. Intern Med 1993; 233:173-178.
23. Cambien F, Poirier O., Lecerf L. et al. Deletion polymorphism in gene ACE is a potent risk factor of myocardial infarction // Nature 1992;359.-P.641-644.
24. Carmena R., Roederer G., Mattloux H. Et al. The response to lovastatin treatment in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia modulated by apolipoprotein E polymorphism // Metabolism 1993;42:895-901.
25. Catto A., Carter A., Barrett J. et al. Angiotensin-converting enzyme insertion /deletion polymorphism and cerebrovascular disease. Stroke 1996b;27:435-440.
26. Corbo R.M., Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE a thirty allele?// Ann Hum Genet 1999; 63: 301-310.
27. Cicoira M., Zanolla L., Rossi A. et al. Failure of aldosterone suppression despite angiotensin-converting enzyme(ACE) inhibitor administration in chronic heart failure is associated with ACE DD genotype // J Am Cardiol 2001;37:1808-1812.
28. Davignon J., Gregg R.E., Sing C.F. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis // Arteriosclerosis 1988;8: 1-21.
29. De Groote P., Helbecque N., Lamblin N. Et al. Beta-adrenergic receptor blockade and angiotensin- converting enzyme deletion polymorphism in patients with chronic heart failure// Eur. J Heart Fail 2004;6:17-21.
30. Ehnholm C., Lukka M., Kuusi T. et al. Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations // J.lipid Res 1986; 27: 227-235.
31. Gerdes L.U., Gerdes C., Kervinen K. et al. The apolipoprotein epsilon 4 allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infarction: a substudy of the Scandinavian Simvastatin Survival Study // Circulation 2000; 101: 1366-1371
32. Ghavari A.G., Lipkowitz M.S., Diamond J.A. et al Deletion polymorphism of the ACE gene is independently associated with left ventricular mass and geometric remodeling in systemic hypertension // Am J.Cardiol 1996; 77 : 1315-1319.
33. Gomez-Angelats e., de la Sierra A., Enjuto M. et al. Lack of association between ACE gene polymorphism and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. J Hum Hypertens 2000;14:47-49.
34. Iwai N., Ohmichi N., Kinoshita M. DD genotype of angiotensin- converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy // Circulation 1994;90:2622-2628.

35. Katsuya T., Koike G., Yee TW et al. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease // *Lancet* 1995;345 (8965):1600-1603.
36. Kniff de P., stalenhoel A.F., Mol M.J. et al. Influence of apo E polymorfism on the response to simvastatin treatment in patients with heterozygous familial hyperholesterolaemia // *Atherosclerosis* 1990; 83: 89-97.
37. Kurland L., Liljedahl U., Karlsson J. et al Angiotensin gene polymorphisms: relationship to blood pressure response to angiotensin II receptor typeI antagonist treatment in hypertensive patients // *J. Hypertens* 2001; 19:10:1783-1787.
38. Kurland L., Liljedahl U., Karlsson J. et al Angiotensin gene polymorphisms: relationship to blood pressure response to antihypertensive treatment. *AJH* 2004;17:8-13.
39. Kurland L, Melhus H., Karlsson J. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism predicts blood pressure response to angyotensin II receptor type I antagonist treatment in hypertensive patients // *J.hypertens* 2001;19:1783-1787.
- 40.L indpaintner K., Lee M.A. Larson M.G. et al. Absence of assotiation or genetic linkage between the angiotensin converting enzyme gene and left ventricle mass/n *Engl J Med* 1996;334: 1023-1028.
41. Luc G., Bard J.M., Arveiler D. Et al. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study // *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1412-1419.
42. O' Malley J.P., Hlingworth D.R. The influence of apolipoprotein E phenotype on the response to lovaststin therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia // *Metabolism* 1990;39:150-154.
43. Malik F., Lavie C., Mehra M. Et al Renin-angiotensin system: genes to bedside // *Am Heart J* 1997;25:514-526.
44. Miller J.A., Thai K., Scholey J.W. Angyotensin II type I receptor gene polymorphism predicts response to losartan and angyotensin II // *Kidney Int* 1999;56:2173-2180.
45. Mondorf U.F., Russ A., Wiesemann A. et al. Contribution of angiotensin 1 converting enzyme gene polymorphism to blood pressure regulation in essential hypertension // *Am J Hypertens* 1998; 11:174-183.
46. Nestel P., Simons L., Barter P. et al. A comparative study of the efficacy of simvastatin and gemfibrosil in combined hyperlipoproteneemia: Prediction of response by baseline lipids, apoE genotype, lipoprotein (a)and insulin. *Atherosclerosis* 1997; 129:231-239.
47. Ojala J.P., Helve E., Ehnholm C. Et al. Effect of Apolipoprotein E polymorphism and Xbal polymorphism of apolipoprotein B on response to lovastatin treatment in familial and non-familial hyperholesterolaemia // *J. Intern Med* 1991; 230:397-405.
48. Pedro-Botel J., Schaefer E.J., Bakker-Arkema R.G. et al. Apolipoprotein E genotype affects plasma lipid response to atorvastatin in a gender specific manner // *Atherosclerosis* 2001;158: 118-193.
49. Pontremoli M., Sofia A., Tirotta A. et al. The deletion polymorphism of the Angiotensin 1-converting enzyme gene is associated with target organ damage in essential hypertension // *J.Am Soc Nephrol* 1996; 7 :2550-2558.
50. Resch K.L., Ernst E., Matrai A., Paulsen H.F. Fibrinogen and viscosity as risk factors for subsequent cardiovascular events in stroke survivors // *Ann Intern Med* 1988; 19:634-636.
51. Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F. et al. An insertion /deletaion polymorphism in the angiotensin 1-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels// *J.Clin Invest* 1990; 86: 1343-1346.
52. Rugale C., du Cailar G., Ribstein J., Mimran A. I/D gene polymorphism of angiotensin - converting enzyme and left ventricular hypertrophy. Response to converting enzyme inhibitors // *Arch Mai Coeur Vaiss* 2003;96:772-775.
53. Sanllehy C., Calas E., Rodrigaes-Villar C. et al. Lack of interaction of apolipoprotein E phenotype with the lipoprotein response to lovastatin or gemfibrosil in patients with primary hypercholesterolemia // *Metabolism* 1998;47: 560-565.
54. Sasaki M., Oki T., Iuchi A. Relationship between the angiotensin converting enzyme gene polymorphism and the effects of enalapril on left ventricular hypertrophy and impaired diastolic filling

- in essential hypertension: M-mode and pulsed Doppler echocardiographic studies // *J.Hypertens* 1996; 14:1403-1408.
55. Schaefer E.L., Lamon-Fava S., Johnson S. et al. Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels. Results from the Framingham Study // *Atheroscler Thromb* 1994;14:1105-1113.
56. Schachter F., Faure-Delanef L., Guenot F. et al Genetic association with human longevity at the APOE and ACE loci // *Nature Genetic*. 1994; 6:29-32.
57. Schwartz G.L., Turner S.T., Chapman A.B. et al. Interacting effects of gender and genotype on blood pressure response to hydrochlorothiazide // *Kidney Int* 2002;62:5:1718-1723.
58. O'Toole L., Stewart M., Padfield P., Channer K. Effect of the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin -converting enzyme gene on response to angiotensin -converting enzyme inhibitors in patients with heart failure // *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 1998;32: 988-994.
59. The World Health report 2003. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003.
60. Ueda S., Meredith P.A., Morton J.J. et al. ACE (I/D) genotype as a predictor of the magnitude and duration of the response to an ACE inhibitor drug (enalaprilat) in humans // *Circulation* 1998; 98: 2148-2153.
61. Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease // *Am Heart. J* 1987; 113:2:Pt2:433-440.
62. Yang S.M., He QY., Miao Y.D. The relationship between polymorphism of angiotensin converting enzyme gene and cough caused by angiotensin converting enzyme inhibitors. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2003;26:203-205.
63. Zannis V.I., Just P.W., Breslow J.L. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined // *Am. J. Hum. Genet* 1981;33: 11-24.

О РОЛИ КОРРЕКТОРСКИХ ЭКЗОНУКЛЕАЗ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Кравецкая Т. П., Ронжина Н. Л., Крутяков В. М.

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
РАН 188300 Ленинградская область, Гатчина Тел.: (81371)-36826,
e-mail: krav@omrb.pnpi.spb.ru

РЕЗЮМЕ: Мутации в генах ДНК-полимераз или корректорских 3'→5'-экзонуклеаз приводят к снижению точности биосинтеза ДНК по всему геному. Это сопровождается повышением вероятности мутагенеза и канцерогенеза. В настоящей работе исследованы активности 3'→5'-экзонуклеаз и ДНК-полимераз в экстрактах нормальных и раковых клеток грызунов и человека, впервые измерены их интегральные соотношения с целью выяснения роли корректирующих экзонуклеаз в канцерогенезе. Так, в опытах на клетках, растущих в культуре, обнаружено, что в дермальных фибробластах взрослого человека величина отношения активности 3'→5'-экзонуклеаз к ДНК-полимеразной активности (3'-экзо/пол) в несколько раз превосходит таковую величину для клеток HeLa. Аналогичная картина наблюдается и при сравнении нормальных фибробластов эмбрионов крысы и трансформированных фибробластов китайского хомячка A238. Опыты с экстрактами клеток некоторых органов здоровых крыс разного возраста показали, что в норме пролиферирующим клеткам свойственна более высокая активность 3'→5'-экзонуклеаз и более высокое значение величины 3'-экзо/пол, чем покоящимся клеткам. Сопоставление этих данных позволяет сделать вывод о нарушении функции корректорских 3'→5'-экзонуклеаз в патологически растущих раковых клетках.

Ключевые слова: 3'→5'-экзонуклеазы, ДНК-полимеразы, нормальные и раковые клет-ки.

SUMMARY: Mutations in the genes of corrective 3'→5'-exonucleases as well as in DNA polymerases lead to decrease of DNA biosynthesis accuracy all over genome. This is accompanied

by the increase of mutagenesis and carcinogenesis probabilities. In this work, the activities of 3'→5'-exonucleases and DNA polymerases are studied in the extracts from normal and cancer cells of rodents and human, and we are the first to measure their integral ratios. As example, in cultivated dermal fibroblasts of an adult human, the value of the ratio of activities of 3'→5'-exonucleases to DNA polymerase activity (3'-exo/pol) surpasses several fold the such a value for HeLa cells. Similar picture is observed during the comparison of normal fibroblasts of rat embryos and transformed fibroblasts of Chinese hamster A238. Experiments with cell-free extracts of some organs from the healthy rats of various age have shown that normal proliferating cells demonstrate higher 3'→5'-exonuclease activity and higher values of 3'-exo/pol than quiescent cells. Comparison of these data allows to come the conclusion about violation of function of the corrective 3'→5'-exonucleases in abnormally growing cancer cells.

Key words: 3'→5'-exonucleases, DNA polymerases, normal and cancer cells.

Принятые сокращения: КЭ – корректорские 3'→5'-экзонуклеазы, 3'-экзо/пол – отношение активности 3'→5'-экзонуклеаз к ДНК-полимеразной активности, ФЛЭЧ – легочные фибробласты эмбрионов человека, MMR (mismatch repair) – система пострепликативной репарации гетеродуплексов.

Эукариотические ДНК-полимеразы, за исключением главной элонгирующей ДНК-полимеразы δ , ДНК-полимеразы ϵ , митохондриальной ДНК-полимеразы γ и специализированных ДНК-полимераз θ и σ , лишены собственной 3'→5'-экзонуклеазной активности [Крутяков, 2006]. Корректорские 3'→5'-экзонуклеазы (КЭ) как связанные, так и не связанные ковалентно с ДНК-полимеразами, часто входят в состав комплексов с другими белками, исправляют ДНК-полимеразные ошибки, которые в отсутствие коррекции могут стать мутациями при следующем раунде репликации. Мутации в генах, в норме поддерживающих стабильность генома, в частности, в генах ДНК-полимераз и (или) КЭ, нередко приводят к снижению точности биосинтеза ДНК по всему геному («катастрофа ошибок»), и клетка становится мутатором. Такие клетки отличаются повышенной частотой спонтанного и индуцированного мутагенеза по сравнению с клетками дикого типа, и вероятность канцерогенеза увеличивается [Крутяков, 1980; Loeb, 2001; Sarasin, 2003]. В опытах на трансгенных мышах показано, что инактивация корректорской 3'-экзонуклеазной функции ДНК-полимеразы δ приводит к образованию множественных эпителиальных злокачественных опухолей [Goldsby et al., 2002]. В раковых клетках обнаружены формы ДНК-полимеразы β , проявляющие меньшую точность синтеза ДНК по сравнению с ДНК-полимеразой β дикого типа в 2 раза или более [Dalal et al., 2005; Starcevic et al., 2004; Chan et al., 2006]. Суперпродукция специализированных ДНК-полимераз, склонных к ошибкам [Крутяков, 2006], таких как β , ι , κ , λ , была обнаружена в некоторых опухолях человека [Chan et al., 2006]. КЭ, участвуя в исправлении ошибок ДНК-полимеразного синтеза, могут играть антимуtagenную роль [Shevelev, Hubscher, 2002; Крутяков, 2004]. Показано, что КЭ увеличивают до 30-ти раз точность работы ДНК-полимеразы α [Belyakova et al., 1993], β [Белякова и др., 2007] и δ [Шевелев и др., 2002], входя в состав комплексов с

этими полимеразми. Пока не ясна роль активации или инактивации КЭ в канцерогенезе. Сопоставление генетики и энзимологии бактериофага Т4, у которого известны мутаторные и антимутаторные штаммы с увеличением или уменьшением частоты спонтанного мутагенеза на два порядка величины по сравнению с диким типом, и эти признаки картируются в гене ДНК-полимеразы, кодирующем и 3'→5'-экзонуклеазную активность, дало следующие результаты. В антимутаторных штаммах фага Т4 наблюдается повышение в 10 – 20 раз величины отношения активностей 3'-экзо/пол по сравнению с диким типом, а в мутаторных штаммах, наоборот, понижение на порядок этой величины [Muzyczka et al., 1972].

Задача данного исследования – определить, как изменяется соотношение суммарной активности КЭ (как связанных ковалентно с ДНК-полимеразми, так и не связанных с ними) и суммарной активности ДНК-полимераз в клетках млекопитающих при нормальном и патологическом их росте. В настоящей работе впервые измерена величина 3'-экзо/пол в нормальных и раковых клетках грызунов и человека с целью выяснения роли КЭ в канцерогенезе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клетки HeLa рака шейки матки, трансформированные фибробласты китайского хомячка линии А238, саркомы крысы линии RA235 и нормальные фибробласты эмбрионов крысы предоставлены Р. А. Пантиной (лаборатория клеточной биологии ОМРБ ПИ-ЯФ РАН). Легочные фибробласты эмбрионов человека (ФЛЭЧ) приобретены в ГУ НИИ гриппа РАМН (Санкт-Петербург), дермальные фибробласты взрослого человека – в ООО «Центр клеточных технологий» (Институт цитологии РАН). Использовали белых беспородных крыс разного возраста, а также их эмбрионы (с 10 дней беременности – середина эмбриогенеза). Несколько самок после контакта с самцом рассаживали по отдельным клеткам, используя затем для получения эмбрионов разных сроков и новорожденных крысят, часть которых выращивали до разного возраста (0 – 120 дней). Вес взрослых крыс 130 – 160 г. Животных забивали эфирным наркозом. Как правило, в опыт брали не менее трех животных.

Мы намеренно работали с экстрактами целых клеток, а не с отдельными клеточными компартментами и ферментами, чтобы предотвратить неизбежные и неравные потери изучаемого материала при фракционировании клеток.

Получение экстрактов клеток и измерение экзонуклеазной и ДНК-полимеразной активностей описаны ранее [Ронжина и др., 2000]. Ферментативные активности измеряли при 37 °С в параллельных опытах в одинаковом объеме (150 мкл) и с одинаковым количеством экстракта (5, 10 или 20 мкл). Концентрация белка экстракта в пробе составляла 80 – 160 мкг/мл.

Величину 3'-экзо/пол определяли как отношение количества выщепленных из ДНК нуклеотидов (пмоль) к количеству включенных в ДНК нуклеотидов (пмоль) за соответствующее время.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для всех клеток и тканей мы брали в расчет данные, где наблюдается линейная зависимость от концентрации экстракта в пробе и времени инкубации, т.е. начальная скорость ферментативных реакций. Это дает возможность сравнивать результаты, полученные на разных объектах.

Как видно из табл. 1, величина 3'-экзо/пол в экстракте нормальных дермальных фибробластов взрослого человека в 4.5 раза выше, чем в экстракте клеточной линии человеческой эпителиальной карциномы HeLa (рак шейки матки). ФЛЭЧ незначительно, всего в 1.5 раза, превышают этот показатель по сравнению с клетками HeLa. Что касается грызунов, то в нормальных фибробластах эмбрионов крысы величина 3'-экзо/пол в 1.8 раза более, чем в клетках саркомы крысы RA235 и в 8.3 раза выше, чем в трансформированных фибробластах китайского хомячка A238. Таким образом, в опытах с клеточными культурами наблюдается достоверное уменьшение величины 3'-экзо/пол в раковых и трансформированных клетках, которые мы исследовали, по сравнению с нормальными клетками.

Кроме того, мы измерили интегральные соотношения 3'-экзо/пол в экстрактах клеток различных органов здоровых взрослых крыс: самца и беременной самки (табл. 2), пол животных не влиял на эти показатели. В быстро пролиферирующих тканях, где идет активная репликация, а именно в селезенке, величина 3'-экзо/пол в 5.8 раза превышает такую для печени, имеющей потенциальную способность к репликации, и в 15 раз – для сердца и мозга, клетки которых практически не способны к репликации.

На рис. представлена удельная 3'→5'-экзонуклеазная активность в бесклеточных экстрактах (цитозоль + ядерный экстракт) некоторых органов крысы в зависимости от возраста. Видно, что примерно в последней трети эмбриогенеза (–7 дней) селезенка, печень, сердце и головной мозг имеют одинаковые показатели, но уже в последней четверти эмбриогенеза (–4 дня) в селезенке отмечается заметное повышение 3'→5'-экзонуклеазной активности, и она продолжает возрастать по сравнению с таковой активностью в других органах в течение всего срока наблюдения (до 120 дней). В головном мозге эта активность держится на уровне эмбрионов и возрастает у новорожденных и молодых крысят, но к моменту взросления (после 30 дней) значительно снижается.

Таким образом, в норме пролиферирующим тканям свойственна в несколько раз более высокая 3'→5'-экзонуклеазная активность (рис.) и более высокое значение величини-

ны 3'-экзо/пол (табл. 2), чем покоящимся клеткам. Сравнение данных двух таблиц наводит на мысль о том, что в быстро размножающихся раковых клетках нарушена функция КЭ. Действительно, чем быстрее размножаются клетки (например, селезенки), тем выше 3'→5'-экзонуклеазная активность и, соответственно, величина 3'-экзо/пол в здоровых клетках. Для раковых клеток также характерен быстрый рост, однако величина 3'-экзо/пол существенно ниже. Чем выше репликативный статус клетки, тем быстрее идут обменные процессы, биосинтез ДНК и белка, и возможные неточности ДНК-полимеразного синтеза нуждаются в коррекции. Т.е., интенсивному росту клеток должен соответствовать определенный уровень величины 3'-экзо/пол.

Возможно, высокое соотношение 3'-экзо/пол в пролиферирующих здоровых тканях обеспечивает нормальную пролиферацию. При патологически бурном росте мутаторных клеток не хватает активности КЭ, что выражается в более низком значении 3'-экзо/пол. Тогда как в нормальных дифференцированных клетках аналогичное значение 3'-экзо/пол может быть достаточным для того, чтобы поддерживать точный синтез ДНК. Если в процессе репликации ДНК ошибка синтеза не удалена КЭ, образуется гетеродуплекс, который затем может быть устранен системой пострепликативной репарации «mismatch repair» (MMR), состоящей из продуктов четырех генов *hMSH2*, *hMSH6*, *hMLH1* и *PMS2*. Мутации в любом гене MMR являются причиной наследственного колоректального рака, дефекты MMR приводят к значительному увеличению уровня спонтанных мутаций в различных организмах от бактерий до человека и обнаружены во многих случаях sporadических раков [(Hsieh, Yamane, 2008)].

Следовательно, система пострепликативной репарации MMR и КЭ дополняют друг друга в процессе биосинтеза ДНК в клетках. Под действием различных мутагенных факторов возрастает репаративный синтез ДНК [Крутяков и др., 1985] и вероятность «ошибок» при репликации ДНК увеличивается. Можно предположить, что при канцерогенезе дефекты MMR приводят к тому, что клетки нуждаются в более высоком уровне 3'-экзо/пол и КЭ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Белякова Н. В., Кравецкая Т. П., Легина О. К., Ронжина Н. Л., Шевелев И. В., Крутяков В. М. 2007. Комплекс репаративной ДНК-полимеразы β с автономной 3'→5'-экзонуклеазой проявляет повышенную точность синтеза ДНК. Известия РАН, серия биол. № 5: 517-523.

Крутяков В. М. 1980. Надежность синтеза ДНК в связи с проблемами мутагенеза, канцерогенеза и клеточного старения. В кн.: Повреждения и репарация ДНК. Пушино, Научный центр биологических исследований АН СССР, 95-107.

Крутяков В. М. 2004. Антимутагенная роль автономных 3'→5'-экзонуклеаз. Молекулярная биология. 38 (5): 823-833.

Крутяков В. М. 2006. Эукариотические ДНК-полимеразы, склонные к ошибкам: предполагаемая роль в репликации, репарации и мутагенезе. Молекулярная биология. 40 (1): 3-11.

Крутяков В. М., Белякова Н. В., Кравецкая Т. П., Нарыжный С. Н. 1985. Ферментативные и структурные механизмы репарации ДНК в выделенном хроматине млекопитающих. Известия АН СССР, серия биол. № 4: 562-571.

Ронжина Н. Л., Кравецкая Т. П., Крутяков В. М. 2000. Ассоциированные с ДНК-полимеразами и автономные 3'→5'-экзонуклеазы позвоночных. Ж. эвол. биохим. и физиол. 36 (3): 198-201.

Шевелев И. В., Белякова Н. В., Кравецкая Т. П., Крутяков В. М. 2002. Корректорская роль автономных 3'→5'-экзонуклеаз в составе мультиферментных ДНК-полимеразных комплексов млекопитающих. Молекулярная биология. 36 (6): 1054-1061.

Belyakova N. V., Kleiner N. E., Kravetskaya T. P., Legina O. K., Naryzhny S. N., Perrino F. W., Shevelev I. V., Krutyakov V. M. 1993. Proofreading 3'→5'-exonucleases isolated from rat liver nuclei. Eur. J. Biochem. 217: 493-500.

Chan K. K., Zhan Cg Q. M., Dianov G. L. 2006. Base excision repair fidelity in normal and cancer cells. Mutagenesis. 21: 173-178.

Dalal S., Hile S., Eckert K. A., Sun K. W., Starcevic D., Sweasy J. B. 2005. Prostate-cancer-associated 1260M variant of DNA polymerase β is a sequence-specific mutator. Biochemistry. 44: 15664-15673.

Goldsby R. E., Hays L. E., Chen X., Olmsted E. A., Slayton W. B., Spangrude G. J., Preston B. D. 2002. High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase δ proofreading. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 15560-15565.

Hsieh P., Yamane K. 2008. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. Mech. Ageing Dev. 129: 391-407.

Loeb L. A., 2001. A mutator phenotype in cancer. Cancer Res. 61: 3230-3239.

Muzyczka N., Poland R. L., Bessman M. J. 1972. Studies of the biochemical bases of spontaneous mutations. I. A comparison of the DNA polymerases of mutator, antimutator and wild type strains of bacteriophage T4. J. Biol. Chem. 247: 7116-7122.

Sarasin A. 2003. An overview of mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. Mutat. Res. 544: 99-106.

Shevelev I. V., Hubscher U. 2002. The 3'→5'-exonucleases. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3: 364-376.

Starcevic D., Dalal S., Sweasy J. B. 2004. Is there a link between DNA polymerase β and cancer? Cell Cycle. 3: 998-1001.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ

Таблица 1

Соотношение 3'→5'-экзонуклеазной и ДНК-полимеразной активностей (3'-экзо/пол) в экстрактах нормальных и раковых клеток грызунов и человека, растущих в культуре

Клетки	3'-экзо/пол
HeLa	13±1
Легочные фибробласты эмбрионов человека	19±4
Дермальные фибробласты взрослого человека	58±4

Трансформированные фибробласты китайского хомячка А 238

7 ± 1

Саркома крысы RA 235

32 ± 2

Нормальные фибробласты эмбрионов крысы

58 ± 6

Таблица 2

Соотношение 3'→5'-экзонуклеазной и ДНК-полимеразной активностей (3'-экзо/пол) в экстрактах клеток некоторых органов взрослых крыс

Органы	3'-экзо/пол
Печень	13 ± 1
Селезенка	75 ± 7
Сердце	5 ± 2
Головной мозг	5 ± 1

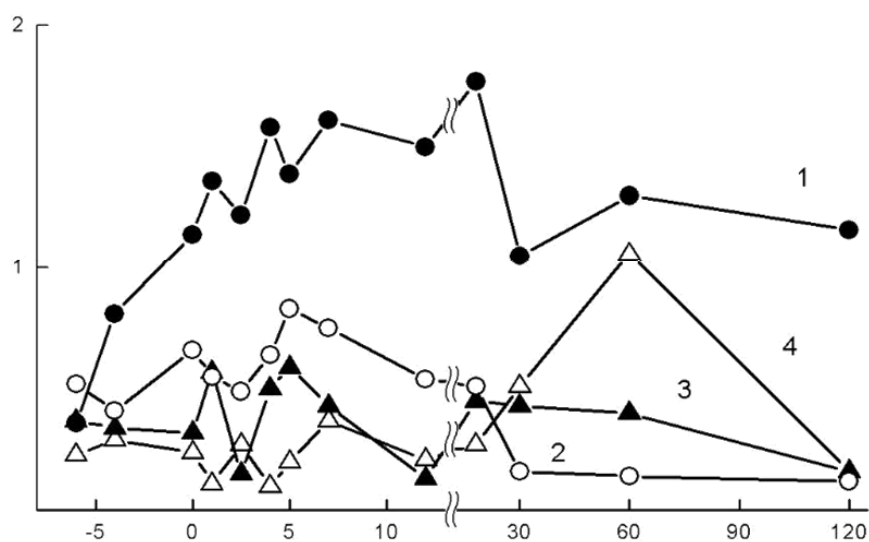


Рисунок. Удельная активность 3'→5'-экзонуклеазы в экстрактах органов крысы

По оси абсцисс – возраст крыс, дни; по оси ординат – % выщепления меченых нуклеотидов из однонитевой 3'- [³H]-ДНК за 1 мин / мкг белка экстракта; 1 – селезенка; 2 – головной мозг; 3 – сердце; 4 – печень.

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ CD38/АДФ-РИБОЗИЛЦИКЛАЗЫ И ЦИТОКИНОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ Кривошина А.Ю., Собко Е.А., Каптюк Л.И., Демко И.В., Салмина А.Б.

ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» МЗиСР РФ
660022 Красноярск, ул. П. Железняка, 1
Тел.: 89029903767, e-mail: angelina-maria@inbox.ru

РЕЗЮМЕ: В статье оценивается роль CD38/АДФ-рибозилциклазы как маркера воспаления при бронхиальной астме и его взаимосвязь с уровнем цитокинов в сыворотке крови. Исследовали экспрессию фермента CD38 лимфоцитами периферической крови и его роль в развитии воспалительного процесса при бронхиальной астме тяжелой и средней степени тяжести. Обнаружили увеличение экспрессии CD38 лимфоцитами периферической крови у пациентов с бронхиальной астмой тяжелой и средней степени тяжести в соответствии с группой контроля. Динамика снижения экспрессии CD38 лимфоцитами у больных с бронхиальной астмой при выписке отражает эффективность проведенного лечения. Независимо от тяжести течения бронхиальной астмы обострение заболевания сопровождается повышением содержания в сыворотке крови ИЛ-6 и ФНО α . На основании наших результатов мы полагаем, что экспрессия CD38 на лимфоцитах периферической крови является объектом регуляции ФНО- α и ИЛ-6 у больных бронхиальной астмой, и может рассматриваться в качестве мишени для фармакологического преодоления феномена стероидорезистентности.

Ключевые слова: бронхиальная астма, CD38/АДФ-рибозилциклаза, глюкокортикоиды, цитокины.

SUMMARY: We studied the role of CD38/ ADP- ribosyl cyclase as a marker of inflammation in bronchial asthma and its interrelation with level of cytokines in peripheral blood. We assessed expression of CD38 in peripheral blood lymphocytes and its role in the process of inflammation development in severe and mild bronchial asthma. We found increase in CD38 expression in the peripheral blood lymphocytes in patients with severe and mild bronchial asthma in comparison with the control group. The dynamics of lymphocytes' CD38 expression in patients with bronchial asthma represents the efficiency of the treatment.

Irrespective of the degree of the disease aggravation we identified dramatics elevation of ИЛ-6 and TNF- α in the peripheral blood. On the basis of our results we suggest that CD38 expression in the peripheral blood lymphocytes is an object for regulation by TNF- α and ИЛ-6 in patients with bronchial asthma, and it can be considered as a target for pharmacological overcoming of a phenomenon steroid resistance.

Keywords: bronchial asthma, CD38/ ADP - ribosyl cyclase, glucocorticoid, cytokines.

Бронхиальная астма (БА) представляет собой глобальную проблему здравоохранения. Во всем мире, в том числе и в России, прогрессивно увеличивается число больных, страдающих бронхиальной астмой [1, 2, 7]. По данным крупных

исследований, бронхиальной астмой страдают около 8 – 18% взрослого населения индустриально развитых стран [4, 5, 6, 7]. Ежегодно от астмы умирают 250 тыс. человек, что свидетельствует о недостатке адекватного контроля над этим заболеванием. Недостаточный контроль заболевания приводит к снижению качества жизни, поскольку неконтролируемые симптомы нарушают сон, ограничивают повседневную активность на работе и дома, приводят к необходимости госпитализации.

Основным патогенетическим механизмом при бронхиальной астме является гиперреактивность дыхательных путей. Установлено, что бронхоспазм характеризуется увеличенной продукцией циклической *аденозиндифосфат - рибозилциклазы* (АДФР) в гладкомышечных клетках, фактор некроза опухоли и дексаметазон регулируют экспрессию гена CD38 в гладкомышечных клетках бронхиального дерева, CD38-нокаутные животные демонстрируют редукцию гиперреактивности бронхов в ответ на ИЛ-13 [9, 13], что позволило ряду авторов считать CD38 ответственным за феномен гиперчувствительности бронхов к действию бронхоконстрикторов, регулятором локального иммунного ответа, а также мишенью для фармакологической коррекции бронхиальной астмы [12].

В терапии бронхиальной астмы глюкокортикостероиды (ГКС) оказывают влияние на ранние и поздние патохимические, патофизиологические, иммунологические реакции, действуя на раннюю и позднюю фазу воспаления [3]. Молекулярная основа фармакодинамических свойств ГКС хорошо изучена, однако ответ организма на действие этих препаратов неоднозначен и определяется большим количеством факторов.

Ранее нами было показано, что в лимфоцитах периферической крови экспрессия CD38 увеличивается на пике концентрации ИЛ-6 при системном воспалительном ответе организма. В мононуклеарах периферической крови экспрессия CD38 регулируется (стимулируется) ФНО- α [11], но не ИЛ-4 или ИЛ-10 [10].

В связи с этим мы предположили, что уровень экспрессии CD38 в лимфоцитах периферической крови больных бронхиальной астмы может быть объектом регуляции про- и противовоспалительных цитокинов, синтезируемых в организме в период обострения этого заболевания. Для проверки этой гипотезы мы исследовали уровень некоторых цитокинов – ФНО- α , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 – в периферической крови пациентов с бронхиальной астмой, характеризующейся стероидорезистентностью, и в контрольной группе.

Цель исследования: изучить клиническую характеристику и особенности экспрессии CD38/АДФ-рибозилциклазы в лимфоцитах периферической крови у больных среднетяжелой и тяжелой бронхиальной астмой (БА), а также оценить взаимосвязь уровня экспрессии CD38 и цитокинов сыворотки крови.

Задачи исследования:

- оценить степень выраженности нарушения проходимости дыхательных путей у больных БА среднетяжелого и тяжелого течения в период обострения и ремиссии;
- изучить экспрессию CD38 на лимфоцитах периферической крови больных БА среднетяжелого и тяжелого течения в период обострения и ремиссии;
- изучить содержание ФНО- α , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 в сыворотке крови у больных БА среднетяжелого и тяжелого течения в период обострения и ремиссии.

Научная новизна. Впервые показано, что организация и течение воспалительного процесса при бронхиальной астме характеризуется взаимосвязями между уровнем экспрессии CD38 в лимфоцитах и содержанием в сыворотке крови провоспалительных цитокинов.

Впервые показано, что уровень экспрессии CD38 в лимфоцитах периферической крови может являться маркером, отражающим эффективность проводимой противовоспалительной терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 50 больных персистирующей бронхиальной астмой среднетяжелого и тяжелого течения в возрасте от 23 до 60 лет, средний возраст 47 (34–53) лет, среди них были 11 (22%) мужчин и 39 (78%) женщин. Средняя длительность заболевания составила 10 (2–15) лет. В группу контроля вошли 12 практически здоровых человек.

Забор венозной крови производили натощак на первые и 14-е сутки госпитализации. Лимфоциты выделяли из цельной гепаринизированной периферической крови на градиенте плотности фиколл-верографин. Детекция CD38⁺ лимфоцитов периферической крови осуществляли с использованием мышиных античеловеческих CD38 АТ и овечьих антимышиных FITC-меченых АТ по стандартному протоколу ИГХ исследования в фиксированных препаратах и регистрацией результатов с помощью люминесцентного микроскопа Люам. Интерлейкины определяли с помощью ИФА с использованием стандартных наборов.

Статистическая обработка результатов проведена с помощью прикладных программ Statistica for Windows, Release 6.0. Использовали непараметрические методы подсчета. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ:

В зависимости от степени тяжести БА больные были разделены на 2 группы. В 1-ю группу вошли 26 пациентов со среднетяжелой БА, во 2-ю - 24 человека с тяжелой БА, средний возраст составил 42 (32-53) и 50 (45-54) лет соответственно (табл. 1). Отмечено, что средняя длительность заболевания была выше у пациентов с тяжелой БА 13 (10,5-19,5] ($p=0,0003$).

При поступлении в стационар у всех пациентов степень тяжести обострения расценивалась как тяжелая. Все больные получали СГКС в течение 8-12 дней в дозе 40 мг/сутки по преднизолону. Исследование ФВД проводили в динамике заболевания (табл. 2). Данные спирограммы свидетельствовали о том, что у больных как 1-й, так и 2-й группы, имелись нарушения проходимости дыхательных путей, более выраженные в группе больных с тяжелым течением БА: показатели ОФВ₁% и ОФВ₁/ФЖЕЛ% были достоверно ниже как показателей контрольной группы, так и показателей больных со среднетяжелым течением БА ($p=0,0001$, $p=0,0000$). Обструкция дыхательных путей была обратимой в обеих группах, что подтверждалось пробой с бронходилататором. В процессе лечения отмечалась положительная клиническая и функциональная динамика: показатели ОФВ₁% и ОФВ₁/ФЖЕЛ% возрастали, однако не достигали показателей контрольной группы. Кроме того, в группе больных с тяжелым течением БА показатель теста Тиффно (ОФВ₁/ФЖЕЛ%) был достоверно ниже, чем в группе больных со среднетяжелым течением БА ($p = 0,0021$).

При проведении бодиплетизмографии установлено, что во всех исследуемых группах достоверно повышалось бронхиальное сопротивление выдоха (Rex), уровень которого превышал показатель как контрольной группы ($p=0,0113$), так и достоверно возрастал с тяжестью течения заболевания ($p=0,0043$). Во всех анализируемых группах наблюдалось увеличение остаточного объема (RV) - 132,85 (110,5-169,95) и 176,4 (144,5;194) в первой и второй группах соответственно, по сравнению со здоровыми 110 (95,9;118,5) ($p = 0,0058$ и $p = 0,0000$). По такому показателю, как отношение остаточного объема к общей емкости легких (RV/TLC), нами были получены достоверные различия в сравнении с контролем во всех анализируемых группах ($p=0,0004$ и $p=0,0000$, соответственно).

Для оценки уровня экспрессии CD38 были отобраны по 19 пациентов со средней и тяжелой бронхиальной астмой в стадии обострения. В контрольную

группу вошли 12 человек (табл. 2). Обнаружено, что уровень экспрессии CD38 на лимфоцитах периферической крови в период обострения был достоверно выше по сравнению с контролем (3 на 300 клеток) как в группе среднетяжелой (9 на 300 клеток), так и тяжелой (12 на 300 клеток) БА при поступлении ($p=0,0024$, $p=0,0017$, соответственно). В динамике заболевания регистрировалось снижение количества CD38+ клеток как в 1-й группе больных, так и во 2-й группе, но достоверных различий получено не было ($p=0,2113$ и $p=0,4795$ соответственно). Уровень экспрессии CD 38 на лимфоцитах периферической крови в период ремиссии был выше у пациентов 2-й группы (7 на 300 клеток) по сравнению с показателями 1-й группы (3 на 300 клеток) ($p=0,1746$). Как в 1-й, так и во 2-й группе, в период ремиссии количество CD38+ клеток оставалось повышенным в сравнении с показателями контрольной группы.

Мы предположили, что уровень экспрессии CD38 в лимфоцитах периферической крови больных бронхиальной астмы может быть объектом регуляции про- и противовоспалительных цитокинов, синтезируемых в организме в период обострения этого заболевания. Для проверки этой гипотезы мы исследовали уровень некоторых цитокинов – ФНО- α , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 – в периферической крови пациентов со среднетяжелой и тяжелой бронхиальной астмой, и в контрольной группе.

Мы обнаружили, что при рецидиве астмы наблюдается повышение уровня ФНО- α в сыворотке крови у больных с тяжелым течением заболевания (2-я группа) по сравнению с показателями пациентов со среднетяжелым течением заболевания ($p=0,1841$). При достижении ремиссии наблюдалась тенденция к снижению концентрации ФНО- α в сыворотке крови у пациентов 2 группы. Так, в 1 группе уровень ФНО- α в периферической крови составил 3,29 (2,53-4,39) и 3,17 (2,36-4,2) при поступлении и выписке, соответственно, а во 2-ой группе – 3,78 (3,07- 6,53) и 3,53 (2,79-4,1) пкг/л, соответственно. Достоверные различия в уровне другого Th1 провоспалительного цитокина – ИЛ-2 – в периферической крови больных 1 и 2 групп ни при поступлении, ни при выписке отмечены не были (табл. 3). Уровни цитокинов Th2-звена иммунного ответа – ИЛ-4 и ИЛ-6 – иным образом изменялись у больных 1 и 2 групп. Так, уровень ИЛ-6 прогрессивно увеличивался в динамике наблюдения за больными (в 4 раза по сравнению с исходными значениями), тогда как уровень ИЛ-4 оставался низким и только значимо отличался от контрольных значений: 0,65 (0,49-0,93), 0,74 (0,39-1,4), 0,74 (2,3-1,1), 0,39 (0,21-1,1) пкг/л в 1 и 2 группах при поступлении и выписке, соответственно), и в периоде обострения, но не ремиссии заболевания, мы зарегистрировали положительную

корреляционную связь между уровнем экспрессии CD38 и уровнем ИЛ-4 в периферической крови ($r=0,78$, $p<0,00001$). При анализе корреляционных связей нами также была обнаружена средней степени корреляционная положительная связь между уровнем экспрессии CD38 и концентрацией в периферической крови ИЛ-6 и ФНО- α у больных с тяжелой бронхиальной астмой на пике обострения заболевания ($r=0,52$, $p<0,0001$ и $r=0,36$, $p<0,03$, соответственно), но не в периоде ремиссии ($r=-0,14$, $p<0,39$ и $r=-0,31$, $p<0,05$, соответственно). Таким образом, уровни двух цитокинов периферической крови – ИЛ-4 и ИЛ-6 – значимо изменялись у пациентов с бронхиальной астмой средней и тяжелой степени тяжести.

ОБСУЖДЕНИЕ

По нашим данным, уровень экспрессии CD38 был достоверно выше в группе среднетяжелой и тяжелой астмы в сравнении с контролем, при этом отмечалось снижение количества CD38+ клеток при выписке в обеих группах. Также был обнаружен достоверно более высокий уровень экспрессии CD38 во 2-ой группе при сравнении с этим же показателем в 1-ой группе, что свидетельствует в пользу ассоциации увеличенной экспрессии CD38 на лимфоцитах периферической крови и степенью тяжести заболевания и прогрессированием феномена резистентности к глюкокортикостероидам.

В динамике заболевания регистрировалось снижение количества CD38+ клеток как в 1-й группе больных, так и во 2-й группе, но достоверные различия получены не были ($p=0,2113$ и $p=0,4795$ в 1 и 2 группах соответственно). Уровень экспрессии CD38 на лимфоцитах периферической крови в период ремиссии был выше у пациентов 2-й группы по сравнению с показателями 1-й группы ($p=0,1746$) и был выше, чем в контрольной группе.

Известно, что продукция Th1-цитокинов, в частности ФНО- α , характеризует, с одной стороны, интенсивность выраженности воспалительного ответа, но одновременно является индикатором запуска протективных механизмов, ограничивающих иммуновоспалительную реакцию, тогда как продукция Th2-цитокинов, в частности ИЛ-6, характеризует противовоспалительный ответ, но, одновременно свидетельствует о развитии аллергической реакции. При бронхиальной астме именно профиль продукции цитокинов определяет низкую чувствительность к действию ГКС [8].

В целом на основании наших результатов мы полагаем, что экспрессия CD38 на лимфоцитах периферической крови является объектом регуляции ФНО- α и ИЛ-6 у больных бронхиальной астмой и может рассматриваться в качестве мишени для фармакологического преодоления феномена стероидорезистентности.

Выводы:

1. Хроническое персистирующее воспаление в дыхательных путях приводит к увеличению сопротивления в дыхательных путях и ограничению потока выдыхаемого воздуха. С тяжестью течения заболевания увеличение сопротивления выдоха возрастает параллельно выраженности нарушений бронхиальной проходимости.

2. Рецидив заболевания характеризовался повышением уровня экспрессии CD38 на лимфоцитах периферической крови независимо от тяжести течения бронхиальной астмы. Улучшение клинико-функциональных параметров происходило однонаправлено со снижением экспрессии CD38 на лимфоцитах периферической крови. Оценка экспрессии CD38 на лимфоцитах периферической крови может использоваться в качестве биомаркера иммуновоспалительного процесса и чувствительности к действию глюкокортикостероидов при бронхиальной астме.

3. Независимо от тяжести течения бронхиальной астмы, обострение заболевания сопровождается повышением содержания в сыворотке крови ИЛ-6 и ИЛ-4.

4. Сохранение высокого уровня ИЛ-6 в сыворотке крови больных бронхиальной астмой свидетельствует о сохранении механизмов воспаления и нестабильности достигнутой ремиссии.

4. Уровень экспрессии CD38 в лимфоцитах периферической крови больных бронхиальной астмы является объектом регуляции ИЛ-6 и ИЛ-4 и может рассматриваться в качестве мишени для фармакологического преодоления феномена стероидорезистентности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / под ред. А. Г. Чучалина. – М.: Атмосфера, 2007. – С. 104.
2. Биличенко, Т. Н. Распространенность хронического бронхита и бронхиальной астмы (данные эпидемиологических исследований) / Т. Н. Биличенко // Пульмонология. – 1994. - №1. – С. 78–83.
3. Трофимов В.И. Глюкокортикоидная зависимость и резистентность // Бронхиальная астма / под ред. Г.Б. Федосеева. СПб.- Медицинское информ. агенство, 1996. – С. 161-165.
4. Федосеев, Г. Б. Бронхиальная астма / Г. Б.Федосеев, В. И. Трофимов. – СПб.: Нормедиздат, 2006. – 308 с.
5. Чучалин А. Г. Тяжелая бронхиальная астма / А. Г. Чучалин // Рус. мед. журн. – 2000, №12. – С. 482-486.
6. В. А. Шестовицкий, Ю. И. Гринштейн, И. И. Черкашина и др. Тяжелые формы бронхиальной астмы, диагностика и лечение // Сиб. мед. обозрение. – 2002, №1. – С. 15–17.
7. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report / M. Masoli, D. Fabian, S. Holt, R. Beasley // Allergy. – 2004. –V. 59, №5. – P. 469-478.

8. Ito K. Impact of post-translational modifications of proteins on the inflammatory process // Biochemical Society Transactions. – 2007. - №35. – P. 281–283.
9. Kang B, Tirumurugaan K. G., Deshpande D.A. et al. Transcriptional regulation of CD38 expression by tumor necrosis factor- in human airway smooth muscle cells: role of NF-B and sensitivity to glucocorticoids // FASEB. – 2006. - Vol . 20. - P. 1000-1002
10. Musso T., Varesio L., Zhang X. et al. IL-4 and IL-13 induce Lsk, a Csk-like tyrosine kinase, in human monocytes // J. of Experimental Medicine, Vol. 180. – P. 2383-2388.
11. Tirumurugaan K. G., Kang B. N., Panettieri R. A. et al. Regulation of the cd38 promoter in human airway smooth muscle cells by TNF- α and dexamethasone // Respiratory Research. – 2008. - 9:26
12. Tliba O, Cidlowski J. A. and Amrani Y. CD38 Expression Is Insensitive to Steroid Action in Cells Treated with Tumor Necrosis Factor- and Interferon- by a Mechanism Involving the Up-Regulation of the Glucocorticoid Receptor Isoform // Mol. Pharmacol. – 2006. - Vol. 69 – P.588-596.
13. Wilson H.L., Dipp M., Thomas J.T. et al. ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase act as redox sensors // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276, № 14. — P. 1180-1188.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ

Таблица 1

Характеристика больных по полу, возрасту, длительность заболевания в группе среднетяжелой и тяжелой БА

Группа	N, чел.	Пол, %		Средний возраст, лет	Средняя длительность, лет
		Жен.	Муж.		
Среднетяжелая БА	26	76,9	23,1	42 [32; 53]	2 [0,83; 9]
Тяжелая БА	24	79,17	20,83	50 [45; 54]	13 [10,5; 19,5]*

* $p < 0,05$ между группами среднетяжелой и тяжелой БА

Таблица 2

Уровень экспрессии CD38 лимфоцитами периферической крови в зависимости от периода заболевания

Показатель	Группы больных				Контроль	p
	БА сред тяжести		БА тяжелая			
	Период наблюдения		Период наблюдения			
	обострение	ремиссия	обострение	ремиссия		
	I	II	III	IV		
CD 38 кл	9[3;10]	3[2;8]	12[3;21]	7[2;16]	3[0,5;3]	P_{I-II} 0,211300 P_{III-IV} 0,479500 P_{I-III} 0,144363 P_{II-IV} 0,174606 P_{I-V} 0,002353 P_{II-V} 0,062106 P_{III-V} 0,001672 P_{IV-V} 0,005137

Уровень концентрации ФНО- α , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 периферической крови в зависимости от периода заболевания.

Показатель	Группы больных				Контроль	Р
	БА сред тяжести		БА тяжелая			
	Период наблюдения		Период наблюдения			
	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия		
	I	II	III	IV		
ФНО α пкг/л	3,29[2,53; 4,39]	3,17[2,36; 4,2]	3,78[3,07; 6,53]	3,53[2,79; 4,1]	3,89[2,5; 4,78]	P _{I-II} 0,168669 P _{III-IV} 1,000000 P _{I-III} 0,184060 P _{II-IV} 0,474442 P _{I-V} 0,542969 P _{II-V} 0,350938 P _{III-V} 0,584037 P _{IV-V} 0,871132
ИЛ-2 пкг/л	4,8[3,5; 6,17]	4,65[2,8; 7,42]	4,43[2,38; 6,26]	3,9[2,7; 6,18]	4,45[3,6; 5,7]	P _{I-II} 0,656355 P _{III-IV} 0,646355 P _{I-III} 0,389104 P _{II-IV} 0,815328 P _{I-V} 0,570188 P _{II-V} 0,903168 P _{III-V} 0,871132 P _{IV-V} 1,000000
ИЛ-4 пкг/л	0,65[0,49; 0,93]	0,74[0,4; 1,4]	0,74[2,3; 1,1]	0,39[0,2; 1,1]	2,09[1,4; 2,8]	P _{I-II} 1,000000 P _{III-IV} 0,331975 P _{I-III} 0,690931 P _{II-IV} 0,021046 P _{I-V} 0,001667 P _{II-V} 0,002184 P _{III-V} 0,000971 P _{IV-V} 0,000045
ИЛ-6 пкг/л	2,75[2,01; 3,6]	3,14[2,6; 4,55]	2,19[2,01; 2,8]	4,3[3,3; 7,05]	2,8[2,4;3, 8]	P _{I-II} 0,358795 P _{III-IV} 0,005905 P _{I-III} 0,149382 P _{II-IV} 0,064233 P _{I-V} 0,504731 P _{II-V} 0,254093 P _{III-V} 0,061196 P _{IV-V} 0,020128

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ СЕМЕЙНОЙ

ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ В РОССИИ: ИТОГИ И

ПЕРСПЕКТИВЫ

Мандельштам М.Ю.¹, Захарова Ф.М.¹, Голубков В.И.¹, Головина А.С.¹, Комарова Т.Ю.¹, Масленников А.Б.², Татищева Ю.А.¹, Липовецкий Б.М.³, Константинов В.О.⁴, Корнева В.А.⁵, Денисенко А.Д.¹, Васильев В.Б.¹

¹Институт экспериментальной медицины СЗО РАМН
Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, д.12

Тел. (812)234-56-06, e-mail: michail@MM13666.spb.edu; ²Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр. ³Институт мозга РАН, г. Санкт-Петербург

⁴Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И.И. Мечникова

⁵Петрозаводский государственный университет

РЕЗЮМЕ: Исследования молекулярной природы семейной гиперхолестеринемии в России выявили чрезвычайно высокий уровень гетерогенности заболевания, при котором почти в каждой семье обнаруживается своя собственная мутация гена рецептора липопротеинов низкой плотности. К сожалению, до последнего времени исследования молекулярной природы СГ были ограничены лишь тремя мегаполисами Санкт-Петербурга, Москвы и Новосибирска. Предполагается, что начатое исследование семейной гиперхолестеринемии в популяции Петрозаводска и Карелии в целом позволит выявить новые этнически-специфичные для русского населения мутации.

Ключевые слова: ген *APOB*, молекулярная гетерогенность, Москва, мутации, Новосибирск, Петрозаводск, рецептор липопротеинов низкой плотности, Санкт-Петербург, семейная гиперхолестеринемия

SUMMARY: Investigations of familial hypercholesterolemia molecular basis in Russia have revealed an extremely high heterogeneity of the disease which nearly every new families possesses its own mutation of the low density lipoprotein receptor gene. Unfortunately, up to now molecular studies of familial hypercholesterolemia were conducted only in three megapolices of St. Petersburg, Moscow, and Novosibirsk. It is expected that recently started studies of familial hypercholesterolemia in general population of Petrozavodsk and Karelia will allow identifying new mutations ethnically specific for Russian population.

Key words: *APOB* gene, familial hypercholesterolemia, low density lipoprotein receptor, molecular heterogeneity, Moscow, mutations, Novosibirsk, Petrozavodsk, St. Petersburg

Раскрытие молекулярных механизмов семейной гиперхолестеринемии послужило основанием для присуждения Нобелевской премии 1985 года в области физиологии и медицины профессорам Джозефу Голдстайну и Михаэлю Брауну [10]. Немногим раньше из лаборатории нобелевских лауреатов стала доступна в виде плазмиды pLDLR-3 клонированная полноразмерная кДНК рецептора липопротеинов низкой плотности (ЛНП) человека [23]. Обнаружение первых геномных перестроек в локусе рецептора ЛНП стимулировало исследователей из разных стран к поиску крупных делеций и инсерций с помощью единственного тогда метода анализа генов – гибридизации по Саузерну [21, 18]. С помощью этого метода удалось выявить существенную генетическую гетерогенность семейной гиперхолестеринемии и определить, что крупномасштабные перестройки локуса рецептора ЛНП составляют порядка 5% от всех случаев заболевания. При этом были выявлены существенные различия между популяциями. В отдельных этнических изолятах, каким являются, например, франкоговорящие канадцы, одна крупная делеция (FH-French Canadian-1), захватывающая область промо-

тора и экзона 1, составляла до 80 % всех случаев СГ [16], а в аутбредной популяции англоговорящих канадцев различные делеции составляли не более 2,6% от всех мутаций [17]. Развитие метода ПЦР привело к быстрому нарастанию числа точковых мутаций, коротких делеций и инсерций. В обзорной работе Хоббс и соавторов [15] приведены уже 150 мутаций в локусе рецептора ЛНП, охарактеризованных преимущественно в лаборатории проф. Д. Голдстайна и М. Брауна в Далласе (Техас, США). К настоящему времени (март 2010 года) в базах данных уже были упомянуты 1703 аллельных вариантов гена рецептора ЛНП [11, 19, 22, 14; <http://www.ucl.ac.uk/ldlr/Current/>; http://www.umd.necker.fr/LDLR/Home_Page.html]. Из этих материалов следует, что СГ исключительно генетически гетерогенна, а мажорные мутации обнаруживаются почти исключительно в популяционных изолятах, таких как потомки буров в ЮАР, исповедующие христианство ливанцы, жители Исландии, финны и некоторые другие. В упомянутом обзоре [11] в силу ограниченности знаний авторов крайне скудны данные, касающиеся изучения СГ в России. Однако, может быть не очень быстрыми темпами, в крупных городах России - Санкт-Петербурге, Москве и Новосибирске - было развернуто исследование молекулярной природы СГ в российской популяции [8]. При поиске мутаций путем гибридизации по Саузерну уже к 1990 году среди 50 обследованных пациентов с СГ из Санкт-Петербурга была выявлена одна носительница новой, нигде в мире ранее не описанной делеции в гене рецептора ЛНП [4]. Эта делеция размером 5 т.п.н. элиминировала из последовательностей гена рецептора ЛНП экзоны 3-5, что должно было вести к продукции нефункционального рецепторного белка. Таким образом, было показано, что делеции гена рецептора ЛНП в Санкт-Петербурге являются не частой причиной развития СГ, и основное внимание должно быть уделено поиску точковых мутаций. Методом ПДРФ-анализа [5] было установлено, что в разных семьях с заболеванием сегрегируют разные гаплотипы, а, следовательно, на молекулярном уровне следовало ожидать не одного, а нескольких дефектов рецептора ЛНП. Плодотворное сотрудничество лабораторий проф. Е.И. Шварца и членкорр. РАМН В.С. Гайцхоки позволило их сотрудникам охарактеризовать значительное количество точковых мутаций гена рецептора ЛНП. Важной частью исследования стала проведенная Ф.М. Захаровой в течение двух месяцев работа в лаборатории профессора Оле Фаргемана (Ole Faergeman) (Университетский госпиталь города Орхус, Дания). К концу 2003 года из популяции Санкт-Петербурга были охарактеризованы 33 мутации гена рецептора ЛНП [3, 24], что позволило сделать некоторые выводы. Во-первых, было установлено, что мутация R3500Q гена *APOB*, являющаяся частой причиной гиперхолестеринемии в Европе [13], в Санкт-Петербурге крайне редка или не обнаруживается. Оценка ее частоты в Петербурге составила менее 1:20000 населения. Во-вторых, как и ожидалось, выявилась чрезвычайно высокая гетерогенность СГ в Санкт-Петербурге. В выборке больных СГ из 33 мутаций 18 были новыми, специфичными для популяции Санкт-Петербурга. Мажорная мутация была найдена

лишь в субпопуляции евреев-ашкенази литовского происхождения, в которой делеция G197del обнаруживалась почти у 30% (7 случаев из 22) пробандов с СГ [20, 12]. В остальной, условно называемой славянской, части населения в Санкт-Петербурге из 32 обнаруженных в выборке больных СГ мутаций гена рецептора ЛНП только пять мутаций (С139G, с.313+1G>A, с.651-653del3, W422X и С308Y), были найдены в двух семьях, а остальные – в единичных семьях [3, 24]. Лишь две мутации из 14 обнаруженных в Москве были общими с Санкт-Петербургом [9], и лишь одна мутация С139G была найдена одновременно в Санкт-Петербурге, Новосибирске и Москве [6].

Новый этап в изучении СГ в России начался с использованием метода ПЦР в режиме реального времени (real-time PCR) для генотипирования пациентов с мажорными мутациями при СГ (delta G197 и С139G) и оценки содержания транскриптов у пациентов с разными типами мутаций [7]. В этих исследованиях были разработаны экспресс-методы идентификации названных мутаций с помощью технологии TaqMan (для мутации G197del) или TaqMan в сочетании с аллель-специфичным праймированием (технология ARMS) (для мутации С139G). Уровень мРНК рецептора ЛНП в лейкоцитах больных с СГ очень сильно варьировал в зависимости от типа мутации; этот уровень оказывался существенно повышенным относительно нормы, если пациент получал лечение статинами. Наконец, для последнего этапа характерно вовлечение в процесс поиска мутаций при СГ новых коллективов. В конце 2008 года М.И. Воевода с соавторами опубликовали результаты исследования спектра мутаций у пациентов Новосибирска с высоким уровнем общего холестерина безотносительно семейного анамнеза гиперхолестеринемии [1]. Результатом исследования стало описание 7 новых и 12 ранее известных мутаций в гене рецептора ЛНП. Среди этих мутаций были распространенные полиморфизмы и потенциально значимые для развития заболевания миссенс-мутации, но из аминокислотных замен, способных вызвать заболевание, лишь одна мутация G571E (G592E по новой номенклатуре) была общей с Санкт-Петербургом.

Представляется возможным сказать несколько слов о будущем изучения молекулярной природы СГ в России. Необходимо увеличить охват населения выборками для изучения СГ и производить эти выборки не только из мегаполисов, Москвы, Санкт-Петербурга и Новосибирска. Развивая работы в этом направлении, мы запланировали на 2010 – 2012 годы изучение молекулярной природы СГ у пациентов Карелии – района Северо-Запада, сопредельного с Санкт-Петербургом. Первые результаты изучения СГ у жителей Петрозаводска показали, что в этой популяции, как и в Санкт-Петербурге, не обнаруживается мутация R3500Q в гене *APOB*. Также у больных СГ из Петрозаводска в гене рецептора липопroteинов низкой плотности не была выявлена финская мутация FH-North Karelia, найденная в одной из 43 семей с СГ Санкт-Петербурга, что говорит о преобладании славянского, а не собственно карело-финского населения в Карелии. У двух из 20 пациентов с СГ, жителей Пет-

розаводска, идентифицирована методом анализа конформационного полиморфизма однонитевых фрагментов ДНК однотипная мутация в третьем экзоне, которая в настоящее время секвенируется. При том, что мы напечатали статью [3] о трудностях диагностики СГ разными методами, появление дешевых методов секвенирования нового поколения делает возможным создание и в России национальных регистров СГ, какие, например, существуют уже в Голландии. Важным шагом в этом направлении стало создание Интернет-ресурсов на сайте Института экспериментальной медицины РАМН, суммирующем результаты по изучению генетики СГ в России [Мутации гена рецептора ЛНП в России: (<http://www.iemrams.spb.ru/russian/molgenru/fh/fh-rus.htm>). Наконец, внимание будущих исследований должен привлечь и ген *PCSK9*, мутации которого вызывают аутосомно-доминантную гиперхолестеринемию и который в России не исследовали [2]. Таким образом, у исследования молекулярной природы СГ в России совершенно очевидно имеется будущее.

Финансирование исследований, составивших предмет настоящей обзорной статьи, осуществлялось частично из средств Российского Фонда фундаментальных исследований (РФФИ) (проекты N 10-04-00563а и 05-04-48235).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воевода М.И., Куликов И.В., Шахтшнейдер Е.В. и др. Спектр мутаций гена рецептора липопротеинов низкой плотности в Российской популяции // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 10. – С. 1374 – 1378.
2. Мандельштам М.Ю., Васильев В.Б. Моногенные гиперхолестеринемии: новые гены, новые мишени для лечения // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 10. – С. 1309 – 1316.
3. Мандельштам М.Ю., Захарова Ф.М., Голубков В.И. и др. Диагностика семейной гиперхолестеринемии в России: достижения и проблемы // “Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике”. Под ред. А.Б. Масленникова. - Вып. 6. – Новосибирск, “Альфа Виста”. - 2004. - С. 9 - 23.
4. Мандельштам М.Ю., Липовецкий Б.М., Шварцман А.Л., Гайцхоки В.С. Идентификация новой делеции в гене рецептора липопротеинов низкой плотности человека у пациента с семейной гиперхолестеринемией// Биополимеры и клетка. - 1991. - Т.7, N 3. - С. 38 - 45.
5. Мандельштам М.Ю., Липовецкий Б.М., Шварцман А.Л., Гайцхоки В.С. Молекулярная гетерогенность семейной гиперхолестеринемии в популяции жителей Санкт-Петербурга// Генетика. - 1995. - Т.31, N 4. - С. 521 - 527.
6. Мандельштам М.Ю., Масленников А.Б. Изучение молекулярной генетики семейной гиперхолестеринемии в России. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике (под ред. А.Б.Масленникова)// Новосибирск: Издательский дом "Манускрипт". - 2001. - С. 58-64.
7. Мандельштам М.Ю., Пчелина С.Н., Татищева Ю.А. и др. Разработка методов генотипирования пациентов с семейной гиперхолестеринемией при помощи ПЦР в режиме реального времени // “Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике”. Под ред. А.Б. Масленникова. - Вып. 9. – Новосибирск, “Альфа Виста”. - 2006 - С. 44 – 48.
8. Мандельштам М.Ю., Сасина Л.К., Гайцхоки В.С. Конструирование молекулярных зондов для диагностики семейной гиперхолестеринемии// Современные направления создания медицинских диагностикумов: Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. 13-14 декабря 1988 г. - М., 1988. - С.102.
9. Мешков А.Н., Стамбольский Д.В., Крапивнер С.Р. и др. Мутации гена рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с клиническим диагнозом семейной гиперхолестеринемии // Кардиология. – 2004. – Т. 44, N 9. – С. 58 – 61.

10. Brown M.S., Goldstein J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis // *Science*. – 1986. – Vol. 232, N 4746. – P. 34 – 47.
11. Dedoussis G.V.Z., Schmidt H., Genschel J. LDL-receptor mutations in Europe // *Hum. Mutat.* – 2004. – Vol. 24. – P. 443 – 459.
12. Durst R., Colombo R., Shpitzen S. et al. Recent origin and spread of a common Lithuanian mutation, G197del LDLR, causing familial hypercholesterolemia: positive selection is not always necessary to account for disease incidence among Ashkenazi Jews. // *American Journal of Human Genetics*. - 2001. - Vol. 68. N 5. - P. 1172 - 1178.
13. Hansen P.S. Familial defective apolipoprotein B-100 // *Dan. Med. Bull.* – 1998. – Vol. 45. – P. 370 – 382.
14. Heath KE, Gahan M, Whittall RA, Humphries S. Low density lipoprotein receptor gene (LDL-R) world-wide website in familial hypercholesterolemia: update, new features and mutation analysis // *Atherosclerosis*. - 2001. – Vol.154. – P. 243 - 246.
15. Hobbs H.H., Brown M.S., Goldstein J.L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia // *Hum. Mutat.* – 1992. – Vol. 1. – P. 445 – 466.
16. Hobbs H.H., Brown M.S., Russell D.W. et al. Deletion in the gene for the low-density-lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia // *N. Engl. J. Med.* – 1987. – Vol. 317, N 12. – P. 734 – 737.
17. Langlois S., Kastelein J.J.P., Hayden M.R. Characterization of six partial deletions in the low-density-lipoprotein (LDL) receptor gene causing familial hypercholesterolemia (FH) // *Am. J. Hum. Genet.* – 1988. – Vol. 43. – P. 60 – 68.
18. Lehrman M.A., Schneider W.J., Südhof T.C. et al. Mutation in LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains // *Science*. -1985. – Vol. 227. No. 4683. – P. 140 - 146.
19. Leigh S.E., Foster A.H., Whittall R.A., Hubbard C.S., Humphries S.E. Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database // *Ann. Hum. Genet.* – 2008. – Vol.72., Pt. 4. – P. 485 - 498.
20. Mandelshtam M.Ju., Chakir Kh., Shevtsov S.P. et al. Prevalence of Lithuanian mutation among St.Petersburg Jews with familial hypercholesterolemia// *Human Mutation*. – 1998. - Vol. 12, N 4. – P. 255-258.
21. Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // *J. Mol. Biol.* – 1975. – Vol. 98, N 3. – P. 503 – 517.
22. Villéger L., Abifadel M., Allard D. et al. The UMD-LDLR Database: additions to the software and 490 new entries to the database // *Human Mutat.* – 2002. – Vol. 20. – P. 81 – 87.
23. Yamamoto T., Davis C.G., Brown M.S. et al. The human LDL receptor: cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA // *Cell*. – 1984. – Vol. 39, N 1. – P. 27 – 38.
24. Zakharova F.M., Damgaard D., Mandelshtam M.Y. et al. Familial hypercholesterolemia in St.Petersburg: the known and novel mutations found in the low density lipoprotein receptor gene in Russia // *BMC Med. Genet.* – 2005. – Vol. 6, No. 1. – P. 6 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2350-6-6>) (всего 10 страниц).

**АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL6 И TGFB1 С ПЛОТНОСТЬЮ
КОСТНОЙ ТКАНИ И УРОВНЕМ ЕЕ МЕТАБОЛИЗМА У БОЛЬНЫХ ОСТЕОПОРОЗОМ
В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ**

Е.Б. Мищенко¹, С.М. Котова², Т.П. Санькова³, Н.В.Цымбаленко⁴, И.И. Дорохова⁵

¹ Санкт-Петербургское государственное учреждение здравоохранения
Консультативно-Диагностический центр №85

² Санкт-Петербургская государственная медицинская академия имени И.И. Мечникова

³ Санкт-Петербургский государственный политехнический университет

⁴ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН ⁵

Эндокринологический научный центр РАМН

РЕЗЮМЕ: Целью данной работы является изучение ассоциации известных полиморфизмов генов IL6 и TGFB1 (TGFB1: экзон 5; IL6: AT повторы в 3'-UTR) с плотностью костной ткани и уровнем ее метаболизма у больных остеопорозом в Санкт-Петербурге. Основную группу составили 112 пациентов с диагнозом первичный остеопороз, для группы сравнения были использованы 48 образцов ДНК лиц без костной патологии. Частота различных аллельных вариантов генов IL6 и TGFB1 у больных и в контрольной группе не имела достоверных отличий. Среди больных носителей T аллеля гена TGFB1 (n=7) уровень остеокальцина и паратгормона оказался ниже, по сравнению с пациентами с CC генотипом (p<0,05). Наибольшие значения уровня ПТГ и наименьшие значения концентрации магния выявлены у носителей LL генотипа IL6 (p<0,05). У носителей LL генотипа IL6 выявлено нарушение минерального гомеостаза, а у носителей T аллеля гена TGFB1 выявлено снижение скорости костного ремоделирования.

Ключевые слова: остеопороз, полиморфизмы гена IL6 и TGFB1

SUMMARY: Polymorphisms of genes associated with osteoporosis (TGFB: exon 5; IL6: AT repeats in 3'-UTR) have been studied with respect to the mineral metabolism and bone density. Two groups have been formed: 112 patients with osteoporosis from St. Petersburg and 48 patients of control group without bone pathology. The frequency of different alleles of IL6 and TGFB1 genes was the same in bought cohorts. Reduction of the osteocalcin and PTH blood levels (p<0.05) among the carriers of the TGFB1 gene T allele may be an evidence of a low bone remodeling rate. In addition, a dependence of both magnesium level (p<0.05) and PTH (p<0.01) on the IL6 genotype has been revealed. The LL genotype carriers have the highest PTH values and lowest Mg concentrations.

Key words: osteoporosis, polymorphisms of IL6 and TGFB1 genes

Риск развития остеопороза на 70-80% связан с генетической предрасположенностью [22]. Баланс между процессами образования и резорбции костной ткани во многом регулируется соотношением факторов роста и цитокинов.

Интерлейкин-6 (IL-6) – цитокин плейотропного действия, участвующий в метаболизме костной ткани. Он активирует остеокласты, связываясь с их поверхностным рецептором, способствуя резорбции кости [10, 14]. Установлено, что влияние половых гормонов, паратиреоидного гормона (ПТГ), витамина D и тироксина на ремоделирование и гомеостаз костной ткани может быть опосредовано их действием на секрецию и активность IL-6, через регуляцию экспрессии его рецепторов [4, 18]. Ген человеческого интерлейкина-6 (IL6) картирован на хромосоме 7p21 и содержит пять экзонов [7]. Белок IL-6 состоит из 185 аминокислот. Моноциты экспрессируют, по крайней мере, пять различных молекулярных форм IL-6 с молекулярной массой от 21,5 до 28 кДа [6]. Исследования последних лет показали, что полиморфизмы гена IL6 в промоторной области [9] в 3'-нетранслируемой области [7], а также в 5'-фланкирующей области [18] и однонуклеотидная замена во втором экзоне [17] приводят к изменению процессов костного ремоделирования. При этом изменение уровня интерлейки-

на-6 крови связаны с изменением как степени [15] так и скорости потери минеральной плотности костной ткани (МПКТ) [21].

Трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) присутствует в костном матриксе. Он принимает активную форму, отщепляясь от пропептида. Резорбирующие остеокласты способны активировать TGF- $\beta 1$, за счет низкой pH на их рифленой границе [8]. Активный TGF- $\beta 1$ снижает экспрессию лиганда рецептора активатора ядерного фактора (RANKL) и повышает экспрессию остеопротегерина в остеобластах [19, 22]. Уменьшающееся за счет этого RANKL/RAN-взаимодействие приводит к ингибированию дифференциации и активации остеокластов [2]. С другой стороны, TGF- $\beta 1$ непосредственно стимулирует хемотаксис, пролиферацию и дифференциацию остеобластов, способствуя образованию новой костной ткани [48, 16]. Ген трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (*TGFBI*) картирован на хромосоме 19q13 и состоит из семи экзонов [8]. TGF- $\beta 1$ синтезируется и секретируется в виде пропептида, состоящего из 390 аминокислот, различными типами клеток, включая остеобласты [6]. В настоящее время идентифицировано и изучается 9 однонуклеотидных полиморфизмов гена *TGFBI* [23, 24]. Показана ассоциация между некоторыми из генотипов *TGFBI* и МПКТ [12, 11], наличием переломов шейки бедра, а также уровнем костного ремоделирования [5].

Задача данного исследования – изучить ассоциацию известных полиморфизмов генов *IL6* и *TGFBI* с плотностью костной ткани и уровнем ее метаболизма у больных остеопорозом в Санкт-Петербурге.

В работе определялась однонуклеотидная замена в экзоне 5 (C⁷⁸⁸-T) гена *TGFBI* и полиморфизм 3'-фланкирующей области гена *IL6*.

Обследованы 112 пациентов с диагнозом первичный остеопороз различной этиологии (86 человек, средний возраст 58,6±3,8) или остеопения (26 человек, средний возраст 41,8±6,4 лет). В качестве группы сравнения были использованы 48 образцов ДНК лиц без упоминания в анамнезе костной патологии, проживающих в Северо-Западном регионе.

Исследования МПКТ поясничного отдела позвоночника и проксимального отдела бедра у больных были выполнены на двухэнергетическом рентгеновском денситометре QDR-4500/C (Hologic, США) на базе Санкт-Петербургского Центра диагностики и лечения остеопороза. Диагностику остеопороза осуществляли согласно рекомендациям ВОЗ [1] по Т-критерию. Содержание ПТГ и 25-гидроксивитамина D остеокальцина и С-концевого телопептида коллагена I типа (CrossLaps) в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов (DSL, IDS, “nordicbioscience diagnostics” и “osteometer biotech”). Концентрацию неорганического фосфора, кальция (ионизированного), магния и щелочной фосфатазы в сыворотке крови измеряли с помощью стандартных клинических методик.

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови экстракцией фенолом с хлороформом или гуанидинизотиоцианатом. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе «ТЕРЦИК» (Москва) при оптимально подобранных профилях реакции амплификации. ПЦР-продукт 3'-UTR области гена *IL6* размером от 611 п.н. до 672 п.н. получали с использованием специфических праймеров:

F – 5'GCAACTTTGAGTGTGTACG3'

R – 5'TGACGTGATGCATGCAACAC3' (Murray, 1997)

Для выявления полиморфизмов гена *TGFBI* использовали ПЦР-опосредованный метод анализа полиморфизмов длин рестрикционных фрагментов. ПЦР-продукт размером 221 п.н. получали с использованием специфических праймеров:

F – 5'TGTCCCCTATCCCCTGACTCCC3'

R – 5'CCCAGCCTGGAAGGCCTCCATC3' (Landhal, 1997)

Продукты амплификации подвергали гидролизу эндонуклеазой рестрикции FokI. Анализ ПЦР-продуктов и рестрикционных фрагментов осуществляли методом электрофореза в полиакриламидном геле.

При исследовании полиморфизма 3'-фланкирующей области гена *IL6* были выявлены варианты, содержащие различное число АТ-богатых tandemных повторов [7, 15]. Частота короткого аллельного варианта "I" (размер ПЦР-продукта – 611 п.н. рис.) у больных составила 71,4% и не отличалась от контроля 75,0%. Частота генотипов II (53,6%), L1 (35,7%) и LL (10,7%) в группе больных также значимо не отличалась от контрольной (56,2%, 37,5% и 6,3%, соответственно).

При сравнении клинико-лабораторных характеристик больных с различными генотипами *IL6* выявлена достоверная зависимость уровня магния сыворотки крови и ПТГ от генотипа (табл.1), причем наибольшие значения уровня ПТГ и наименьшие значения концентрации магния выявлены у носителей LL генотипа *IL6*. У этих же пациентов наблюдается тенденция к снижению уровня кальция, витамина D сыворотки крови и МПКТ (табл.1). Полученные данные свидетельствуют о нарушении минерального гомеостаза у носителей LL генотипа *IL6*, что может способствовать нарушению минерализации кости.

В экспериментальном исследовании [20] на костных биоптатах показано, что 50% женщин в постменопаузе имеют повышенный уровень экспрессии гена *IL6*, а среди пациентов с остеопоротическими переломами эта цифра достигает 95%. Предполагая возможное влияние изучаемого полиморфного 3'-фланкирующего участка на транскрипцию гена *IL6*, мы оценили представленность генотипов *IL6* среди таких пациентов. Однако в нашей группе пациентов с остеопоротическими переломами и в группе старшего возраста не обнаружено преимуществ какого-либо генотипа *IL6* по сравнению с контрольной группой.

При определении однонуклеотидной замены в экзоне 5 (C⁷⁸⁸-T) гена *TGFBI* были выявлены два аллеля С и Т (Т означает наличие тимина, обеспечивающего сайт узнавания эндонуклеазы FokI в амплифицированном фрагменте ДНК). При этом были обнаружены два возможных генотипа – СС и СТ, гомозигот ТТ не обнаружено.

Частота аллеля Т у больных и в контрольной группе не имела достоверных отличий (5,5% и 6,2%). Среди больных носителей Т аллеля гена *TGFBI* (n=7) уровень остеокальцина оказался ниже, по сравнению с пациентами с СС генотипом (20,7±2,9 нг/мл и 23,1±1,1 нг/мл, соответственно, p<0,05, табл.2). Уровень ПТГ также был ниже у носителей Т аллеля гена *TGFBI* (27,9±4,5 нг/мл и 38,1 ±3,7 нг/мл, p<0,05). Таким образом, однонуклеотидная замена С⁷⁸⁸-Т, приводящая к замене треонина на изолейцин в пропептиде [23], возможно, влияет на образование активного TGF-β1, что сказывается на скорости ремоделирования.

У обследованных больных не выявлено достоверных отличий частоты полиморфизмов генов *TGF* и *IL6* по сравнению с контрольной группой. Однако у носителей LL генотипа *IL6* выявлено нарушение минерального гомеостаза, а у носителей Т аллеля гена *TGFBI* выявлено снижение скорости костного ремоделирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедух Н.В., Бенгус Л.М., Басти А. Магний и костная ткань // Остеопороз и остеопатии. – 2003. – №1. – С. 18–22.
2. Шварц Г.Я. Молекулярно–биологические основы создания новых лекарственных средств для лечения остеопороза: I. Остеопротегерин, ЛОПГ (RANKL), и RANK: физиологические механизмы регуляции костной резорбции // Остеопороз и остеопатии. – 2003. – №2. – С. 21–24.
3. Beck, L.S., Ammann, A.J., Aufdemorte, T.B., Deguzman, L., Xu, Y., Lee, W.P., McFtridge, L.A. and Chen, T.L. *In vivo* induction of bone by recombinant human transforming growth factor β1. // J. Bone Miner. Res. – 1991. Vol. 6. – P. 961–968.
4. Bellido T., Stahl N., Farruggella T.J., Borba V., Yancopoulos G.D., Manolagas S.C. Detection of receptors for interleukin–6, interleukin–11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells // J Clin Invest. – 1996. – Vol. 97. – P. 431–437.
5. Bertoldo F, D'Agruma L, Furlan F, Colapietro F, Lorenzi MT, Maiorano N, Iolascon A, Zelante L, Locascio V, Gasparini P: Transforming growth factor–beta1 gene polymorphism, bone turnover, and bone mass in Italian postmenopausal women // J Bone Miner Res. – 2000. – Vol. 15. – P. 634–639.
6. Bhagavan N.V. Medical biochemistry. Fourth edition. – Academic press, 2001. – 1016 с.
7. Bowcock A.M., Ray A., Erlich H., Sehgal P.B. Rapid detection and sequencing of alleles in the 3' flanking region of the interleukin–6 gene // Nucl Acids Res. – 1989. – Vol. 17. – P. 6855–6864.
8. Brown P.D., Wakfield L.M., Levinson A.D., Sporn M.B., Physiochemical activation of recombinant latent transforming growth factor–betas 1, 2, and 3 // Growth factors. – 1990. – Vol. 3. – P. 35–43.
9. Chung, H. W.; Seo, J.-S.; Hur, S. E.; Kim, H. L.; Kim, J. Y.; Jung, J. H.; Kim, L. H.; Park, B. L.; Shin, H. D. Association of interleukin–6 promoter variant with bone mineral density in premenopausal women // J. Hum. Genet. – 2003. – Vol. 48. – P. 243–248.
10. Ershler W.B., Sun W.H., Binkley N., Gravenstein S., Volk M.J., Kamoske G., et al. Interleukin–6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and

- in vitro production is modifiable by dietary restriction // *Lymphokine Cytokine Res.* – 1993. – Vol. 12. – P. 225–230.
11. Keen RW, Snieder H, Molloy H, Daniels J, Chiano M, Gibson F, Fairbairn L, Smith P, MacGregor AJ, Gewert D, et al.: Evidence of association and linkage disequilibrium between a novel polymorphism in the transforming growth factor beta 1 gene and hip bone mineral density: a study of female twins // *Rheumatology (Oxford)* – 2001. – Vol. 40. – P. 48–54.
 12. Langdahl B.L., Carstens M., Stenkjaer L., Eriksen E.F. Polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene and osteoporosis // *Bone* – 2003. – Vol. 32. – P. 297–310.
 13. Langdahl BL, Knudsen JY, Jensen HK, Gregersen N, Eriksen EF: A sequence variation: 713–8delC in the transforming growth factor-beta 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women // *Bone* – 1997. – Vol. 20. – P. 289–294.
 14. Manolagos S.K The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease // *Intern. Med.* – 1998. – Vol. 128. – P. 127–137.
 15. Murray R.E, Grant F.A., Reid D.M., Ralston S.H. Polymorphisms of the interleukin-6 gene are associated with bone mineral density // *Bone* – 1997. – Vol. 21(1). – P. 89–92.
 16. Noda, M. and Camilliere, J.J. *In vivo* stimulation of bone formation by transforming growth factor-β. // *Endocrinology* – 1989. – Vol. 124. – P. 2991–2994.
 17. Ota, N.; Nakajima, T.; Nakazawa, I.; Suzuki, T.; Hosoi, T.; Orimo, H.; Inoue, S.; Shirai, Y.; Emi, M. A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density // *Hum. Genet.* – 2001. – Vol. 46. – P. 267–272.
 18. Pottratz S.T., Bellido T., Mocharla H., Crabb D., Manolagas S.C. 17 beta-estradiol inhibits expression of human interleukin-6 promoter-reporter constructs by a receptor-dependent mechanism // *J Clin Invest* – 1994. – Vol. 93. – P.944–950.
 19. Quinn, J.M., Itoh, K., Udagawa, N., Hausler, K., Yasuda, H., Shima, N., Mizuno, A., Higashio, K., Takahashi, N., Suda, T. *et al.* Transforming growth factor β affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. // *J. Bone Miner. Res.* – 2001. – Vol.16. –P. 1787–1794.
 20. Ralston S.H. Analysis of gene expression in human bone biopsies by polymerase chain reaction: evidence for enhanced cytokine expression in postmenopausal osteoporosis // *J Bone Miner. Res.* – 1994. – Vol. 9(6). – P. 883–890.
 21. Scheidt-Nave, C.; Bismar, H.; Leidig-Bruckner, G.; Woitge, H.; Seibel, M. J.; Ziegler, R.; Pfeilschifter, J. :Serum interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. *J. Clin. Endocr. Metab.* – 2001. – Vol. 86. – P. 2032–2042.
 22. Takai, H., Kanematsu, M., Yano, K., Tsuda, E., Higashio, K., Ikeda, K., Watanabe, K. and Yamada, Y. Transforming growth factor-β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells // *J. Biol. Chem* – 1998. – Vol. 273. – P. 27091–27096.
 23. Tzakas P., Wong B., Logan' A., Rubin L., Cole D. Transforming growth factor beta-1 (TGFB1) and peak bone mass: association between intragenic polymorphisms and quantitative ultrasound of the heel // *BMC Musculoskeletal Disorders* – 2005. – Vol. 6. – P. 29.
 24. Yamada Y: Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis // *Pharmacogenetics* – 2001. – Vol. 11. – P. 765–771.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ

Таблица 1

Клинико-лабораторные показатели у больных с различными генотипами *IL6*

Показатели	Генотипы <i>IL6</i>			Дисп. анализ
	LL n=12	Ll n=40	ll n=60	
Возраст (лет)	49,7±6,1	53,8±3,0	54,9±2,2	р
МПКТ L ₁ -L ₄ (г/см ²)	0,707±0,096	0,808±0,050	0,785±0,029	0,570
МПКТ L ₁ -L ₄ SD, Т-критерий	-2,8±0,7	-2,3±0,4	-2,5±0,3	0,802

МПКТ L ₁ -L ₄ SD, Z критерий	-1,7±0,6	-1,4±0,4	-1,5±0,3	0,944
Кальций ионизированный (N 1,12-1,29 ммоль/л)	1,10±0,04	1,14±0,02	1,12±0,02	0,690
Магний (N 0,8-1,0 ммоль/л)	0,63±0,05	0,77±0,02	0,80±0,02	0,049*
Фосфор неорганический (N 0,97-1,45 ммоль/л)	1,16±0,13	1,18±0,07	1,11±0,04	0,458
Щелочная фосфатаза (N 80-135 МЕ/л)	108,8±16,6	97,6±6,7	110,4±9,7	0,597
Паратгормон (N 16-62 нг/мл)	70,3±18,5	42,6±6,8	28,6±3,0	0,001*
25(OH)D (N 44,7-144 ммоль/л)	43,2±8,9	141,4±42,7	98,8±20,6	0,322
Остеокальцин (N 13.0-32.0 нг/мл)	20,4±6,4	23,1±2,6	22,9±2,3	0,952
СТХ (N 0,16-0,5 нг/мл)	0,479±0,047	0,431±0,058	0,561±0,099	0,489

* достоверная зависимость признака от генотипа

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА ПО
ПОЛИМОРФНЫМ МАРКЕРАМ ГЕНОВ АПОПТОЗА И СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА**
*Насибуллин Т.Р., Туктарова И.А., Васильева А.М., Граховская Е.М., Карамова И.М.,
Мустафина О.Е.*

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики
УНЦ РАН 450054 Уфа, пр. Октября 71

Тел. : +7 (347) 2356088, e-mail: NasibullinTR@yandex.ru

* ГУЗ Республиканский кардиологический диспансер, Уфа

РЕЗЮМЕ: Проведён сравнительный анализ частот генотипов и аллелей полиморфных маркеров 2592+58T>A (rs4648110) гена ядерного фактора каппа В1 (*NFKB1*), -877C>T (rs481736) гена каспазы 1 (*CASP1*), 33L>P (rs5918) гена β3 субъединицы интегрин (*ITGB3*) и -455G>A гена β цепи фибриногена (*FGB*) в группе больных, перенёвших инфаркт миокарда (ИМ, N=216), и контрольной группе (N=158). У больных ИМ в сравнении с контрольной группой наблюдали статистически значимые повышения частот генотипов T/A гена *NFKB1* (P=0.008), T/T гена *CASP1* (P=0.046), L/P гена *ITGB3* (P=0.028) и A/A гена *FGB* (P=0.002), кроме того отмечено снижение доли генотипов T/T гена *NFKB1* (P=0.001), L/L гена *ITGB3* (P=0.028) и G/G гена *FGB* (P=0.001). Логистический регрессионный анализ показал, что полиморфные маркеры генов *NFKB1*, *ITGB3* и *FGB* вносят существенный вклад в формирование наследственной предрасположенности к ИМ у татар.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, апоптоз, гемостаз, генетический полиморфизм

SUMMARY: Patients with myocardial infarction (MI, N=216) and healthy individuals (N=158) from Tatars populations (Bashkortostan) were examined for presence of 2592+58T>A (rs4648110) polymorphism gene *NFKB1*, -877C >T (rs481736) gene *CASP1*, 33L>P (rs5918) gene *ITGB3*, -455G>A (rs800790) gene *FGB*. Our investigation showed that in MI patients frequencies of genotypes T/A of *NFKB1* gene, T/T of *CASP1* gene, L/P of *ITGB3* gene, A/A of *FGB* gene, were significantly higher compared to control group (P=0.008, P=0.046, P=0.028, P=0.002 respectively), while proportion of T/T of *NFKB1* gene (P=0.001), L/L of *ITGB3* gene (P=0.028), G/G of *FGB* gene (P=0.001) was lower. Logistic regression analysis showed that polymorphisms 2592+58T>A of *NFKB1* gene, 33L>P (rs5918) of *ITGB3* gene, -455G>A (rs800790) of *FGB* gene may be beneficial in assessment of the genetic risk MI.

Key words: myocardial infarction, apoptosis, haemostasis, genetic polymorphism.

Инфаркт миокарда (ИМ) остаётся одной из наиболее частых причин инвалидизации и смертности населения большинства развитых стран мира. В связи с этим актуальной задачей геномики является разработка новых подходов ранней диагностики и выявления предрасположенности к данной патологии. Одним из таких подходов является анализ ассоциаций полиморфных маркеров генов-кандидатов с ИМ. При этом выбор генов основывается на функциональной значимости кодируемых ими белков в этиопатогенезе изучаемого заболевания.

Цель настоящего исследования состояла в анализе ассоциаций полиморфных маркеров 2592+58T>A гена *NFKB1*, -877C>T гена *CASP1*, 33L>P гена *ITGB3* и -455G>A гена *FGB* с ИМ.

Ядерный фактор каппа В (NFκB), универсальный фактор транскрипции, играет важную роль в регуляции экспрессии более 200 генов, к числу которых относятся гены цитокинов, молекул клеточной адгезии [8], матриксных протеаз [4]. Показана роль NFκB в регуляции экспрессии генов апоптоза [2, 10]. Ген *NFKB1* контролирует синтез двух белков семейства NFκB – p50 и p105, причём p50 не является продуктом p105, а образуется в результате посттрансляционной модификации с участием протеосомы 26S, что обеспечивает сбалансированный синтез и независимую функцию белков p50 и p105 [12]. Белок p105 является ингибитором специфической Rel-белковой транскрипции, тогда как p50 образует комплекс с белком p65. Указанный комплекс является активатором транскрипции, в то время как гомодимеры p50/p50 способны подавлять экспрессию генов-мишеней, что позволяет клетке тонко регулировать экспрессию своих генов [5].

Каспаза 1 (*CASP1*) – цистеиновая протеаза - относится к группе каспаз, обеспечивающих процессинг провоспалительных цитокинов, в частности *CASP1* участвует в процессе активации интерлейкина 1β. Кроме того, показана роль *CASP1* в процессах FAS индуцированного апоптоза [7].

Ген *ITGB3* контролирует синтез β3 субъединицы интегрина. Интегрин αIIbβ3 является основным рецептором, взаимодействующим с факторами свёртывания (фибриноген, фактор Виллебранда) [9]. Кроме того, интегрины, обладая способностью связываться со специфическими белками экстрацеллюлярного матрикса, являются участниками каскада передачи сигнала, запрещающего апоптоз. Разрыв же связи рецептор – лиганд, наоборот, генерирует сигнал, индуцирующий апоптоз [16].

Ген *FGB* кодирует β-цепь фибриногена. Образование β-цепи фибриногена является скоростью-лимитирующей стадией в процессе синтеза зрелого белка [19]. Фибриноген - это один из основных факторов, обуславливающих вязкость плазмы крови. При повреждении кровеносных сосудов фибриноген переходит в фибрин - основной компонент тромбов. Фибрин взаимодействует с тромбоцитами, способствуя их агрегации, что является первым эта-

пом тромбообразования, также он участвует в активации фибринолитической системы, является матрицей, на которой происходит активация плазминогена [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группу больных составили 216 мужчин, перенёсших ИМ в возрасте от 26 до 55 лет, неродственных между собой. Из группы больных были исключены больные с эндокринной патологией, с заболеваниями крови, лица с выраженной хронической патологией лёгких. Все больные обследованы на базе Республиканского кардиологического диспансера (Уфа).

Контрольную группу составили 158 практически здоровых мужчин, в возрасте от 27 до 60 лет, неродственных между собой. Все участники исследования были татарами по этнической принадлежности.

ДНК из лимфоцитов периферической крови выделяли методом фенольно-хлороформной экстракции. Анализ полиморфизма осуществляли методом полимеразной цепной реакции, последовательности праймеров, использованные эндонуклеазы, размеры полученных фрагментов и номенклатура аллелей представлены в таблице 1. Продукты расщепления разделяли с помощью электрофореза в 7% полиакриламидном или 2% агарозном гелях.

Сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей проводили с помощью точного двухстороннего критерия Фишера. Логистический регрессионный анализ проводили с помощью программы SPSS 13.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты сравнительного анализа изученных полиморфных маркеров в группе больных и контрольной группе представлены в таблице 2. У больных с ИМ, в отличие от контрольной группы, статистически значимо повышены частоты генотипов Т/А гена *NFKB1* (P=0.008), Т/Т гена *CASP1* (P=0.046), L/P гена *ITGB3* (P=0.028) и А/А гена *FGB* (P=0.002), кроме того отмечено снижение доли генотипов Т/Т гена *NFKB1* (P=0.001), L/L гена *ITGB3* (P=0.028) и G/G гена *FGB* (P=0.001).

Для изучения совместного влияния изучаемых полиморфных маркеров на развитие ИМ было использовано уравнение множественной логистической регрессии. Использовали алгоритм пошагового включения переменных в уравнения регрессии. В таблице 3 представлены результаты регрессионного анализа по трём полиморфным маркерам. Полиморфизм -877C>T гена *CASP1* не был включён в уравнение регрессии, поскольку уровень значимости этой переменной составил 0.234.

В исследованиях по анализу ассоциаций полиморфных маркеров гена *NFKB1* с различными заболеваниями наиболее часто используется полиморфный маркер -94(4)I/D, локализованный в промоторной области гена. Так, выявлена связь данного маркера с различными новообразованиями [11, 20], кардиомиопатией [21], показана связь с функциональным со-

стоянием эндотелия [6]. Эти данные, вместе с полученными нами результатами, дают основание предположить, что полиморфные маркеры гена *NFKB1* могут вносить значительный вклад в формирование наследственной предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям.

В проспективном исследовании Blankenberg с соавт. показана связь полиморфного маркера 943+34G>T (rs505901), расположенного в 6-ом интроне гена *CASP1*, со смертью от ИМ в течение 6-ти лет лиц с атеросклерозом коронарных артерий, в этом же исследовании выявлена связь данного маркера с уровнем экспрессии гена *CASP1* [3].

Анализ полиморфизма 33L>P гена *ITGB3* показал, что полученные нами результаты схожи с результатами, описанными в работе Weiss с соавт., где выявлено повышение частоты аллеля P у лиц, перенёсших ИМ, или у лиц с нестабильной стенокардией старше 60 лет [14]. В другом исследовании показано, что у носителей аллеля P наблюдается более высокий уровень тромбина в области микрососудистого повреждения, а также у них нарушена чувствительность к антикоагулянтам (аспирину) [18].

Среди нескольких полиморфных маркеров гена FGB маркер -455G>A наиболее изучен с точки зрения прогностической значимости. Установлено, что наличие аллеля A определяет более высокий уровень его транскрипции, что приводит к повышенному уровню фибриногена в крови и увеличивает вероятность образования тромбов [17, 15]. Также в ряде исследований, продемонстрировано, что носительство генотипа A/A связано с повышенной частотой сердечно-сосудистых осложнений [13, 15].

Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что полиморфные маркеры 2592+58T>A гена *NFKB1*, 33L>P гена *ITGB3* и -455G>A гена FGB вносят значительный вклад в формирование наследственной предрасположенности к ИМ, что же касается -877C>T полиморфизма гена *CASP1*, то его роль в формирование наследственной предрасположенности требует дополнительных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балуда В.П., Балуда М. В., Деянов И.И., Тепшуков И.К. Физиология системы гемостаза. Москва, 1995. С. 19-35
2. Beg A.A., Baltimore D. An essential role of NF-kB in preventing TNF-a induced cell death //Science. 1996; 274: 787-789.
3. Blankenberg S, Godefroy T, Poirier O. et al. Haplotypes of the caspase-1 gene, plasma caspase-1 levels, and cardiovascular risk. //Circ Res. 2006; 99: 102-108.
4. Breuss J.M., Cejna M., Bergmeister H., et al. Activation of nuclear factor-kappa B significantly contributes to lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model. //Circulation. 2002; 105: 633-638.
5. Grossmann M., O'Reilly L., Gugasyan R., et al. The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression //The EMBO Journal. 2000; 19(23): 6351-6360.
6. Joon-Young Park, Iain K. G. Farrance, Nicola M. Fenty et al. NFKB1 promoter variation implicates shear-induced NOS3 gene expression and endothelial function in prehypertensives and stage I hypertensives. //Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007; 293: H2320-H2327.

7. Kuida K.; Lippke J. A.; Ku G.; et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1-beta converting enzyme. //Science. 1995; 267: 2000-2003.
8. Landry D.B, Couper L.L, Bryant S.R, Lindner V. Activation of the NFkappa B and I kappa B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 //Am J Pathol. 1997; 151: 1085 - 1095.
9. Lefkovits J.; Plow E. F.; Topol E. J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. //New Eng. J. Med. 1995; 332: 1553-1559.
10. Legembre P., Barnhart B.C., Peter M.E. The relevance of NF-kappaB for CD95 signaling in tumor cells. //Cell Cycle. 2004; 3:87-91.
11. Lewander A., Butchi A.K., Gao J. et al. Polymorphism in the promoter region of the NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer in Swedish but not in Chinese populations. //Scand J Gastroenterol. 2007; 42(11):1332-1338.
12. Lin, L.; DeMartino, G. N.; Greene, W. C. Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. //Cell. 1998; 92: 819-828.
13. Martiskainen M, Pohjasvaara T, Mikkelsen J. et al. Fibrinogen gene promoter -455 A allele as a risk factor for lacunar stroke. //Stroke. 2003; 34(4):886-91.
14. Michelson A.D., Furman M.I., Goldschmidt-Clermont P. et al. Platelet GP IIIa P1A polymorphisms display different sensitivities to agonists //Circulation. 2000; 101: 1013-1018.
15. Siegerink B., Rosendaal F. R. and Algra A. Genetic variation in fibrinogen; its relationship to fibrinogen levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. //Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2009; 7: 385-390.
16. Stupack D.G., Puente X.S., Boutsaboualoy S et al. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. //J Cell Biol. 2001; 155(3):459-70.
17. Tybjaerg-Hansen A., Agerholm-Larsen B., Humphries S. E. et al. A common mutation (G(-455)-to-A) in the beta-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease: a study of 9,127 individuals based on the Copenhagen City Heart Study. //J. Clin. Invest. 1997; 99: 3034-3039.
18. Undas A.; Brummel K.; Musial J. et al. PI(A2) polymorphism of beta-3 integrins is associated with enhanced thrombin generation and impaired antithrombotic action of aspirin at the site of microvascular injury. //Circulation. 2001; 104: 2666-2672.
19. van 't Hooft F.M., von Bahr S.J., Silveira A. et al. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration. //Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999; 19(12):3063-3070.
20. Zhang P., Wei Q., Li X. et al. A functional insertion/deletion polymorphism in the promoter region of the NFKB1 gene increases susceptibility for prostate cancer. //Cancer Genet Cytogenet. 2009; 191(2):73-77.
21. Zhou B., Rao L., Peng Y. et al. Functional polymorphism of the NFKB1 gene promoter is related to the risk of dilated cardiomyopathy. //BMC Med Genet. 2009; 31:10:47.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ

Таблица 1

Локализация, последовательности праймеров и номенклатура аллей полиморфных маркеров генов-кандидатов ИМ

Ген, хромосомная локализация	Полиморфизм (ло- кализация)	Праймеры (рестриктаза)	Аллели (размер фрагментов, п.о.)
<i>NFKB1</i>	2592+58T>A	F 5' -aaa cac tta tgg aca act atg agg-3'	T (118)

4q24	rs4648110 (интрон 22)	R 5'-agt taa gga aaa ggg aag gag att-3' (<i>Bse</i> NI)	A (86, 32)
Casp1 11q22.3	-877C>T rs481736 (промотор)	F 5'-gag cca ccc acc cat cct g-3' R 5'-aaa taa tct gca aat aat cat cct-3' (<i>Taq</i> I)	C (85, 253) T (338)
<i>FGB</i> 4q32.1	-455A>G rs800790 (промотор)	F 5'-agg gtc ttt ctg atg tgt att-3' R 5'-atg tgt atc ttg ttt ctg gta a-3' (<i>Hae</i> III)	A (311) G (188, 123)
<i>ITGB3</i> 17q21.32	33L>P rs5918 (экзон 2)	F 5'-tgg cct caa gca gtc ct-3' R 5'-tgt ctc cag agc cct tgt c-3' (<i>Msp</i> I)	L (230) P (230, 132)

Таблица 2

Частоты генотипов и аллелей генов апоптоза и системы гемостаза в группе больных с инфарктом миокарда и контрольной группе

			Контроль		Больные		P
			Численность	Частота (%)	Численность	Частота (%)	
<i>NFKB1</i>	Генотип	ТТ	110	73.33	130	60.19±3.33	0.01
		ТА	34	22.67±3.42	78	36.11±3.27	0.008
		АА	6	4	8	3.7	1
	Аллель	Т	254	84.67	338	78.24	0.035
		А	46	15.33	94	21.76	0.035
<i>CASP1</i>	Генотип	ТТ	3	1.96	14	6.48	0.046
		ТС	49	32.03	73	33.8	0.738
		СС	101	66.01	129	59.72	0.232
	Аллель	Т	55	17.97	101	23.38	0.082
		С	251	82.03	331	76.62	0.082
<i>ITGB3</i>	Генотип	LL	134	84.81	158	73.83	0.011
		LP	24	15.19	53	24.77	0.028
		PP	0	-	3	1.4	0.265
	Аллель	L	292	92.41	369	86.21	0.009
		P	24	7.59	59	13.79	0.009
<i>FGB</i>	Генотип	АА	6	3.9	28	13.73	0.002
		АG	39	25.32	67	32.84	0.13
		GГ	109	70.78	109	53.43	0.001
	Аллель	A	51	16.56	123	30.15	P<0.001
		G	257	83.44	285	69.85	P<0.001

Таблица 3

Коэффициенты множественной логистической регрессии и статистическая оценка

Маркер		B	OR (expB)	P
<i>NFKB1</i>	ТТ	-0.033	0.968	0.04
	ТА	0.559	1.749	
	АА	-0.526	0.591	

<i>ITGB3</i>	LL	-0.333	0.717	0.02
	LP+PP	0.333	1.395	
<i>FGB</i>	AA	0.882	2.416	0.002
	AG	-0.184	0.832	
	GG	-0.698	0.498	

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ НАСЛЕДСТВЕННЫХ КАРДИОМИОПАТИЙ

Пинелис В.Г., Березнева Н.А., Асанов А.Ю.

НЦЗД РАМ, Москва
E-mail: vpinelis@nczd.ru

Заболевания сердечно-сосудистой системы являются наиболее частой причиной заболеваемости и смертности во всем мире. Постоянное накопление информации о патогенезе заболеваний сердечно-сосудистой системы привело к пониманию того, насколько значительную роль в их развитии играют генетические факторы. Сегодня практически не осталось болезней, в формировании которых не было бы установлено наследственной компоненты. Наиболее частые заболевания - ишемическая болезнь сердца (ИБС), атеросклероз и артериальная гипертензия (АГ) - являются мультифакторными. В формирование клинического фенотипа при этих заболеваниях приблизительно равный вклад вносят наследственность и среда. Для каждого заболевания существует достаточно большое число генов, различные аллельные формы которых влияют на вероятность развития заболевания, скорость прогрессирования и выраженность клинических симптомов. Как правило, генами предрасположенности являются те гены, белковые продукты которых прямо или косвенно вовлечены в патогенез заболевания. Наряду с мультифакторными, существует большое количество моногенных заболеваний, для развития которых достаточно наличия мутации в одном гене. В настоящее время описаны около 2,5 тысяч моногенных наследственных синдромов, при которых наблюдается вовлечение в патологический процесс сердца и/или сосудов. Известны около сотни наследственных заболеваний, при которых поражение сердца и сосудов являются ведущими в клинической картине (табл. 1). Даже из общей структуры таких классических мультифакторных заболеваний, как ИБС и АГ, вычлняются все большее число моногенных форм, которые наследуются по менделевскому типу.

В последнее время представления об этиологии многих заболеваний сердечно-сосудистой системы претерпели значительную эволюцию. В особенно большой степени это касается состояний, для которых не были получены убедительные данные, однозначно свидетельствующие в пользу инфекционных и/или воспалительных процессов, лежащих в их основе. Как правило, эти заболевания описывались как «идиопатические». Быстрое развитие

современных генетических методов позволило во многих случаях решить вопрос о наследственной природе заболевания, установить первичный биохимический дефект, разработать ДНК-диагностику, искать подходы к этиологической терапии.

Кардиомиопатии представляют собой группу гетерогенных заболеваний миокарда, характеризующихся структурными изменениями миокарда и сопровождающихся различными нарушениями сердечной деятельности: от длительно текущих бессимптомных форм до серьезных проявлений, таких как прогрессирующая сердечная недостаточность, разнообразные аритмии и кардиогенная внезапная смерть (КВС). Все виды кардиомиопатий классифицируются как первичные и вторичные кардиомиопатии. Вторичные кардиомиопатии являются следствием хронической ишемии миокарда, артериальной гипертензии, метаболических нарушений. Диагноз первичных кардиомиопатий основан на исключении вторичных кардиомиопатий и включают несколько различных клинических подтипов [15, 71]. Выделяют четыре основных фенотипических классов кардиомиопатий: гипертрофическую (ГКМП), дилатационную (ДКМП), аритмогенную правожелудочковую и рестриктивную [27, 30, 42]. Исследования последних лет установили роль генетических факторов в развитии данных заболеваний. Идентифицировано большое количество мутаций в генах, кодирующих белки сложной сети миофиламентов, и ассоциированных с ними белков, в комплексе образующих цитоскелет кардиомиоцита.

Белки цитоскелета могут быть разделены на 3 группы. Сократительный цитоскелет, генерирующий мышечное сокращение, состоящий из высокоспециализированного комплекса тонких и толстых актиновых волокон и связанных с ними белков, таких, как тропониновый, тропомиозиновый комплексы. Упорядоченные повторяющиеся тропониновые единицы формируют поперечную исчерченность миофибрилл. Внутрисаркомерный цитоскелет, содержащий титин-, α -актинин, миозин-связывающий С-белок и другие белки, которые удерживают миофиламенты и их саркомерные единицы и регулируют перемещения миофиламентов во время каждого сократительного цикла. Внесаркомерный цитоскелет, состоящий из десмина и содержащих ламин промежуточных филаментов. Эти структуры обеспечивают связь между соседними миофибриллами и структурами ядерной оболочки. Эта сеть включает в себя также субсаркомерные белки, обеспечивающие связь между периферическими миофибриллами с сарколеммой и внеклеточным матриксом. К ним относят белок дистрофии и ассоциированные с ним гликопротеины, связывающие саркомер с внеклеточным матриксом посредством ламинина. Внесаркомерный цитоскелет также содержит связанный с внеклеточным матриксом комплекс, содержащий белки талин, винкулин, интегрины. Мутации в генах, кодирующих собственно сократительные белки миокарда и белки внутрисаркомерного цитоскелета, являются причиной ГКМП.

Гипертрофическая кардиомиопатия является одним из самых распространенных наследственных заболеваний сердечно-сосудистой системы. Она характеризуется гипертрофией стенок левого желудочка без расширения его полости, усилением систолической и нарушением диастолической функции. В подавляющем большинстве случаев этого заболевания гипертрофия бывает ассиметричной с явным преобладанием утолщения межжелудочковой перегородки по сравнению со свободными стенками левого желудочка [6, 42,50]. Клинические проявления ГКМП связаны с наличием коронарной недостаточности, патологией вегетативной регуляции кровообращения, нарушением электрофизиологических процессов в сердце [10]. У больных с ГКМП часто регистрируются разнообразные нарушения ритма и проводимости: мерцательная аритмия, желудочковые, нередко злокачественные, жизнеугрожающие тахиаритмии. Наряду с длительным стабильным состоянием, ГКМП может осложниться острой и хронической сердечной недостаточностью, жизнеопасными расстройствами сердечного ритма, внезапной смертью [51, 67]. В последнее время отмечается рост числа зарегистрированных случаев ГКМП, как за счет внедрения в практику современных методов диагностики, так и, вероятно, в связи с истинным увеличением числа больных [2].

Оценки распространенности ГКМП варьируют от 1:500 до 1:5000 в зависимости от популяции [50]. При ГКМП наблюдаются гипертрофия миокарда, дезорганизация миоцитов и фиброз. Эти нарушения приводят к широкому спектру функциональных нарушений, которые включают ишемию миокарда, диастолическую дисфункцию, обструкцию выносящего тракта левого желудочка, клинически значимые аритмии и, у ряда пациентов, КВС. Чаще всего КВС наступает в молодом возрасте (до 30 лет), зачастую у пациентов с минимальной выраженностью собственно гипертрофических процессов. Источником жизнеугрожающих состояний, как правило, являются нарушения ритма разной локализации. Основным типом наследования ГКМП является аутосомно-доминантный [40, 42, 66]. Оставшуюся часть составляют спорадические случаи заболевания. Считается, что большинство, если не все случаи, спорадической ГКМП также имеют генетическую причину, то есть вызваны случайными мутациями. На данный момент идентифицированы, по крайней мере, 13 генов (таб.2), мутации которых могут приводить к развитию ГКМП [7, 15, 27, 42, 48, 62]. Идентифицированы около 150 мутаций в этих генах, при этом, как правило, в неродственных семьях молекулярно-генетические повреждения различны. К ним относятся гены β -миозина, миозинсвязывающего белка С, сердечного тропонина Т, сердечного тропонина С, сердечного тропонина I, α -тропомиозина, легких цепей миозина (основных и регуляторных), сердечного α -актина, тайтина а также протеинкиназы А (γ -субъединицы) и гена калиевых потенциалзависимых каналов. Более четверти всех случаев ГКМП обусловлено мутациями в гене MYHCB, кодирующем тяжелую цепь β -миозина. На долю мутаций в генах TNNT2 и MYBPC3 приходится по 15% случаев ГКМП. Остальные типы кардиомиопатии встречаются

более редко. Кроме того, описаны семьи с ГКМП, в которых исключено сцепление со всеми известными локусами заболевания. Большинство описываемых генов кодируют сократительные белки кардиомиоцитов или белки, входящие в структуру толстых и тонких филаментов. Данные об этих молекулярных дефектах позволяют в настоящее время рассматривать ГКМП как «болезнь саркомера» [5, 70].

Тяжелые цепи миозина являются основным компонентом толстых филаментов миофибрилл в поперечно-полосатой мускулатуре. В организме человека существуют две изоформы тяжелых цепей миозина- α и β . α -изоформа в высокой степени экспрессируется в миокарде предсердий, тогда как β -миозин является основным сократительным белком экспрессирующимся в миокарде желудочков [66, 67]. Мутация гена β -миозина была первой, описанной в качестве причины развития ГКМП в 1990 году. В настоящее время выявлены более 50 мутаций данного гена. Ген тяжелой цепи β -миозина картирован в хромосоме 14q11.2-q12 и состоит из 43 экзонов, 38 из которых являются кодирующими. Почти все мутации гена являются мисенс-мутациями [31] и локализованы в пределах первых 23 экзонов, кодирующих миозиновую головку и область перехода от головки к хвосту. В большинстве случаев ГКМП мутации гена β -миозина связаны с высокой пенетрантностью, выраженной гипертрофией левого желудочка и высоким риском внезапной смерти [48]. В организме человека экспрессируется три формы миозинсвязывающего белка C (МСБС) - две скелетные и одна кардиальная. Этот белок играет роль в формировании саркомеров миофибрилл, связываясь с миозином и тайтином, и регулирует сокращения посредством фосфорилирования [77]. Ген МСБС локализуется на 11 хромосоме (11p11) и состоит из 35 экзонов [20]. Описано более 30 мутаций этого гена. Большинство из них являются мутациями сплайсинга или мутациями типа вставка/делеция. ГКМП, возникающая вследствие мутации гена МСБС, в большинстве случаев поздно манифестируют и протекают относительно доброкачественно.

Тропонин T (Тр Т) связывается с тропомиозином и отвечает за положение тропонинового комплекса на тонких нитях филамента. Ген тропонина Т располагается хромосоме 1q32 [65] и состоит из 17 экзонов. Несмотря на большое количество мутаций и их различных механизмов, большинство случаев ГКМП, связанных с Тр Т, имеют сходную клиническую картину. Ее особенностями является незначительно выраженная гипертрофия левого желудочка, сочетающаяся с высоким риском внезапной смерти [74]. Тропонин I (Тр I) является одним из компонентов тропонин-тропомиозинового комплекса и отвечает за Ca^{2+} -чувствительное ингибирование актин-миозинового взаимодействия. Он является ключевым звеном, обеспечивающим связь между изменениями внутриклеточной концентрации ионов кальция и процессом сокращения. Ген сердечного тропонина I располагается на 19 хромосоме (19p13.2- q13.4). Описаны 8 его мутаций, приводящих к развитию ГКМП [26]. В зависимости от мутации ингибиторного региона молекулы или дистальной ее части, наблюдается

различная клиническая картина заболевания: развитие диастолической дисфункции или изолированная верхушечная гипертрофия миокарда [17]. Тропонин С (ТрС) существует в виде двух изоформ, которые экспрессируются в сердечной и скелетной мускулатуре. Ионы Ca^{2+} , связанные с сердечным ТрС, вызывают конформационные изменения в тропонин-тропомиозиновом комплексе, что приводит к мышечным сокращениям. При ГКМП описана одна миссенс-мутация гена тропонина С [36]. α -тропомиозин входит в состав тропомиозинового комплекса и способствует ингибированию актин-миозинового взаимодействия при низкой концентрации кальция в цитоплазме. Ген α -тропомиозина располагается на длинном плече 15 хромосомы (15q22) и состоит из 15 экзонов [27]. Клиническими особенностями ГКМП на фоне мутаций данного гена являются умеренная степень гипертрофии и раннее развитие диастолической дисфункции.

Основные и регуляторные легкие цепи миозина принимают участие в формировании толстых филаментов. Ген основной субъединицы легкой цепи миозина картирован в хромосоме 3p21 и состоит из 7 экзонов. Ген регуляторной субъединицы картирован в хромосоме 12q23-q24 и включает 7 экзонов. Все описанные к настоящему времени мутации являются структурными и обнаруживаются довольно редко [62]. Они проявляются массивной гипертрофией папиллярных мышц и прилегающих участков миокарда, что сопровождается явлениями обструкции выходного тракта левого желудочка [61]. Актин является компонентом структуры саркомера, входя в состав тонких филаментов, и белком цитоскелета. Ген сердечной формы актина локализован на длинном плече 15 хромосомы (15q14) и состоит из 6 экзонов [56]. Патология актина является редкой причиной развития ГКМП и, как правило, не характеризуется наличием синдрома внезапной смерти. Тайтин обеспечивает структурную целостность саркомера и стабилизацию толстых филаментов. Полная последовательность гена тайтина и его аминокислотный состав были расшифрованы только в 2001 году. Ген тайтина расположен на длинном плече второй хромосомы (2q31) и состоит из 363 экзонов, кодирующих белок длиной в 27000 аминокислот. К настоящему моменту отсутствуют данные об особенностях клинического течения ГКМП на фоне мутаций гена тайтина, что обусловлено малым количеством случаев заболевания [62].

В рамках исследования EUROGENE Heart Failure Project был проведен скрининговый анализ и идентификация мутаций всех известных на данный момент генов, связанных с развитием ГКМП [62]. Исключение составлял ген тайтина, что было связано с большим размером данного гена. В работе было исследовано 197 не родственных случаев ГКМП. В результате в 63% случаев мутации вышеперечисленных генов были идентифицированы в качестве причины заболевания. Наиболее частыми из них являлись мутации миозин-связывающего белка С и β -миозина (42% и 40%, соответственно). Таким образом, данные, полученные в этой работе, свидетельствуют о том, что около 40% всех генетических причин, приводящих

к развитию ГКМП, до сих пор являются не изученными. Их идентификация является одной из главных задач современной молекулярной кардиологии и может в дальнейшем привести к появлению новых диагностических и терапевтических алгоритмов в лечении заболевания [7].

Степень выраженности проявлений ГКМП широко варьирует даже у лиц с одним и тем же типом молекулярных дефектов сократительных белков миокарда. Внутри одной семьи, члены которой несут идентичные мутационные повреждения сократительных белков, клиническая картина и течение заболевания могут сильно отличаться [47]. В связи с этим в основе развития клинической гетерогенности ГКМП можно рассматривать две возможные причины: влияние факторов внешней среды или генетических детерминант [5, 6]. Такие кандидатные гены рассматриваются как гены-модификаторы [46, 47]. Они определяют клинический полиморфизм заболевания, в основе которого лежит мутация конкретного участка ДНК (эффект главных генов) [4]. Среди возможных генов-кандидатов, оказывающих влияние на степень выраженности патологического процесса, в настоящее время ведущая роль отводится генам ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Именно эта система определяет водно-солевой гомеостаз организма, оказывая тем самым прямое влияние на физиологию сердечно-сосудистой системы. С другой стороны, один из ее основных компонентов - ангиотензин II, являясь мощным вазоконстриктором, обладает также строгим митогенным эффектом для кардиомиоцитов и гладкомышечных клеток сосудистой стенки, вызывая гипертрофию миокарда независимо от гемодинамических и нейро-гуморальных эффектов [5, 6, 8, 9].

Одним из наиболее изученных компонентов РААС является ангиотензин-превращающий фермент. АПФ превращает ангиотензин I в ангиотензин II и конвертирует брадикинин в кинины. Синтез АПФ осуществляется во многих тканях [73], в том числе и в сердечной ткани, как в предсердиях, так и в желудочках [1]. Содержание АПФ в плазме крови и тканях варьирует у разных индивидуумов. Ген АПФ картирован на хромосоме 17q23. Полиморфизм гена АПФ определяется присутствием или отсутствием (делеция/вставка- D/I) фрагмента 287 пары нуклеотидов в 16 интроне. Этот полиморфизм влияет на степень экспрессии гена. Установлено, что у лиц с DD-генотипом уровень АПФ в 2 раза выше, чем у обладателей ID и II генотипа [37]. Выявлено, что аллель D и особенно DD- генотип гена АПФ являются важными генетическими факторами риска сердечно-сосудистых поражений в различных популяциях и ассоциируются именно с повышенным уровнем циркулирующего АПФ и AT II, тогда как I аллель и особенно II генотип являются протективными факторами [3]. По данным многих работ полиморфизм гена АПФ связан с повышенным риском острой коронарной недостаточности, внезапной смертью, инфарктом миокарда в молодом возрасте [18, 23, 68]. Изучение влияния DD-полиморфизма гена АПФ на фенотипическую экспрессию гипертрофии у больных ГКМП выявило, что степень гипертрофии левого желудочка значи-

тельно выше у лиц с генотипом DD по сравнению с ID и II ($p < 0,05-0,005$) [11, 44]. У 26 пациентов с ГКМП из одной семьи левожелудочковая гипертрофия была выше у обладателей именно DD генотипа [44]. Исследования ID полиморфизма гена АПФ при ГКМП носят противоречивый характер. Примерно одинаковое количество работ подтверждают и опровергают взаимосвязь ID полиморфизма с гипертрофией левого желудочка при ГКМП [4, 32, 78]. Неоднородность подобных результатов, по всей видимости, связана с популяционными и этническими особенностями частоты распределения генотипов у данной категории больных [4].

Ангиотензиноген (АТГ) является субстратом и предшественником ангиотензина I.

Ген ангиотензиногена локализован на 1-й хромосоме (1q 42-43) и включает пять экзонов и четыре интрона. На данный момент известны около 15 различных точечных мутаций в гене АТГ. Описаны два основных полиморфных маркера этого гена, приводящие к замене метионина на треонин (M 235 T) в структуре ангиотензиногена, и треонина на метионин в 174 (T 174 M) позиции [32]. Эти замены аминокислот являются результатом замены нуклеотидов в позициях +704 и +521 соответственно от начала транскрипции. Однако эти полиморфные маркеры не располагаются в непосредственной близости от места деления ангиотензиногена, в результате которого под влиянием ренина он превращается в ангиотензин I. Возможно, они не являются функциональными. Замена нуклеотидов гуанина аденином в регионе промотора гена АТГ в позиции -6 от места начала транскрипции приводит к появлению функциональной мутации [33]. В результате этого увеличивается транскрипция гена и повышается уровень ангиотензиногена. Полиморфизм G-6 A находится в тесной неустойчивой связи с полиморфизмом M 235 T гена ангиотензиногена [1].

Не существует единого мнения при оценке связи между полиморфными вариантами гена АТГ и гипертрофией левого желудочка. Одни авторы выявили связь M 235 T полиморфизма с этим процессом [37, 38], другие ассоциацию полиморфизма M 235 T и T 174 M с массой миокарда левого желудочка не обнаруживали [28, 45]. Туракулов Р.И. [13] продемонстрировал связь 174 M аллеля и генотипа MM с артериальной гипертензией, инфарктом миокарда и ГКМП в московской популяции. Исследование связи T 174 M полиморфизма и ГКМП в сибирской популяции не выявило [4]. Большинство исследователей отвергают наличие связи между полиморфизмами (T 174 M и M 235 T) гена АТГ и гипертрофией левого желудочка. Однако практически всегда выявляются ассоциации с показателями АД и уровнем ангиотензиногена в плазме крови. По-видимому, молекулярно-генетическая детерминация уровня АТГ в плазме крови ключевым образом не влияет на развитие гипертрофии, а сам АТГ не оказывает существенного прямого пролиферативного влияния на гладкомышечную ткань [4].

В результате активации рецепторов ангиотензина II первого типа (AT1 рецепторов) реализуются такие эффекты ангиотензина II как вазоконстрикция и стимуляция роста кардиомиоцитов. Ген AT1 R расположен на хромосоме 3q22 [24]. Описаны 16 его полиморфных состояний, из которых наиболее хорошо охарактеризована мутация в положении 1166, приводящая к замене аденина на цитозин (A 1166 C). Обнаружена ассоциация С-аллеля с артериальной гипертонией, инфарктом миокарда и гипертрофией левого желудочка [14, 68]. Другие авторы подобные закономерности отрицают, так, [35, 58] обнаружили корреляцию С-аллеля гена рецептора AT 1-го типа с индексом массы миокарда и толщиной межжелудочковой перегородки у больных с ГКМП, что соответствует данным по московской популяции [14]. Носители генотипа СС характеризуются достоверно более высоким индексом массы левого желудочка в сравнении с другими генотипами гена рецептора. Однако в Японии у больных с ГКМП и гипертонической гипертрофией миокарда подобные закономерности не наблюдались [38, 42]. Таким образом, полученные данные о влиянии ДНК-полиморфизмов гена рецептора AT1 на степень гипертрофии левого желудочка при гипертрофической кардиомиопатии носят противоречивый характер и, по всей видимости, также связаны с популяционными и этническими особенностями.

Ангиотензин II также стимулирует рецепторы ангиотензина II второго типа (AT2 рецепторы). Хотя содержание рецепторов ангиотензина II 2-го типа в сердце колеблется при различных патологических состояниях [52, 73, 74], большинство из их эффектов до сих пор не изучено. Исследования на животных показывают, что стимуляция рецепторов AT2 противоположна активации AT1 рецепторов, и включает вазодилатацию и уменьшение пролиферации кардиомиоцитов [19, 59]. Ген рецептора ангиотензина II 2-го типа локализован на хромосоме X. Полиморфизм гена связан с заменой аденина на цитозин (A 3123 C) в 3'- не-транслируемой области 3 экзона [41]. Среди немногочисленных работ, посвященных влиянию полиморфизма гена AT2 на развитие сердечно-сосудистых заболеваний обращает на себя внимание исследование [25], в котором была рассмотрена связь данного полиморфизма и ГКМП. Изучение влияния полиморфизма гена AT2 рецепторов выявило, что индекс массы миокарда левого желудочка и толщина межжелудочковой перегородки значительно ниже у женщин с генотипом СС по сравнению с АС и АА. У мужчин подобные ассоциации не наблюдались. Полученные результаты авторы связывают с локализацией генов AT2 рецепторов на X-хромосоме и эстроген-зависимыми факторами транскрипции.

Альдостерон контролирует баланс натрия в организме и объем циркулирующей крови. Он стимулирует синтез коллагена и пролиферацию фибробластов в сердце через активацию локальных рецепторов минералкортикоидов. Найдена корреляция уровня альдостерона в крови с толщиной межжелудочковой перегородки и задней стенки левого желудочка у лиц обоего пола [1]. У женщин выявлена положительная зависимость между уровнем альдосте-

рона и индексом массы миокарда левого желудочка. У пациентов с альдостеронсекретирующими аденомами наблюдалась гипертрофия левого желудочка, подвергавшаяся обратному развитию после резекции опухоли. Альдостерон синтезируется в коре надпочечников из дезоксикортикостерона ферментом митохондриального цитохрома P 450 альдостеронсинтетазой (CYP11B2). Ген альдостеронсинтетазы картирован в хромосоме 8q22. Описаны несколько полиморфных маркеров в регионе промотора и во втором интроне этого гена. Наиболее изучен полиморфизм в 5'-конце гена - замена цитозина тимидином в -344-й позиции, который участвует в связывании фактора транскрипции SF-1 и, таким образом, может влиять на экспрессию гена [1]. Связь полиморфизма гена альдостеронсинтетазы с массой миокарда была найдена лишь у здоровых молодых людей: в финской популяции: гомозиготы по -344 С аллелю имели достоверно большую массу миокарда, чем гомозиготы по -344 Т аллелю [43]. Не была обнаружена зависимость между полиморфизмом гена альдостеронсинтетазы и толщиной межжелудочковой перегородки у больных артериальной гипертензией [63] и перенесших инфаркт миокарда [34]. Не получены однозначные данные об ассоциации этого полиморфизма с массой миокарда левого желудочка при ГКМП [21, 58].

Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), характеризующаяся увеличением размеров полостей сердца и снижением систолической функции ЛЖ, обнаруживается в популяции с частотой не менее 1:10000 - 1:3000 населения. Несмотря на имеющийся прогресс, достигнутый в лечении этого заболевания, смертность при ДКМП остается высокой. Наследственные формы этого заболевания составляют около 40% от всех случаев ДКМП. Наиболее часто встречается аутосомно-доминантный тип наследования, на долю аутосомно-рецессивных форм приходится около 16% всех случаев наследственной ДКМП, X-сцепленный рецессивный тип наследования обнаруживается в 2-5% случаев. ДКМП является результатом мутаций в генах, кодирующих структурные внутри- и внесаркомерные белки миокарда (табл. 3). Это свидетельствует о том, что этиология семейных форм ДКМП очень гетерогенна. Рассматриваются мутации в генах, кодирующие белки плазматической мембраны и цитоскелета, самого саркомера [22, 29, 71, 55, 56]. Однако японские авторы в своих исследованиях не нашли указанные мутации, но выявили мутации в генах Z-диска миофибрилл [42]. Кроме того, описаны мутации в генах, кодирующие ядерные белки, хотя молекулярные механизмы этого неясны [42]. Отдельную группу составляют мутации в генах, изменяющих функцию ионных каналов, метаболизм Ca²⁺ [16, 26, 27]. Относительно недавно была описана наследственная аритмогенная правожелудочковая дисплазия/кардиомиопатия, характеризующаяся фиброзно-жировым замещением миокарда правого желудочка, выраженной его дилатацией и снижением фракции выброса при относительной сохранности левого желудочка, жизнеугрожающими желудочковыми тахикардиями, вызываемыми физическими и эмоциональными нагрузками. Заболевание чаще всего обнаруживается в популяции северо-восточной Ита-

лии с частотой 1:1000 населения, в остальных европейских регионах его частота составляет 1:10000. Описаны 8 локусов аутосомно-доминантной формы заболевания (табл. 4).

В последнее время накапливается все большее количество данных, говорящих об отсутствии жестких границ между различными группам кардиомиопатий. Установлено, что мутации в генах сердечного тропонина Т (TNNT2) и титина (TTN) могут приводить к развитию как ГКМП, так и ДКМП. Различные повреждения в гене тропонина I (TNNI3) также описаны при рестриктивных и гипертрофических кардиомиопатиях. Существование более 20 локусов, ответственных за ДКМП, существенно затрудняет проведение молекулярной диагностики и требует тщательного анализа клинической картины в каждом случае заболевания.

В настоящее время большое внимание уделяется наследственным заболеваниям, не сопровождающимся выраженными структурными изменениями миокарда, и проявляющимся преимущественно или исключительно электрофизиологическими нарушениями в кардиомиоците. Для этой группы состояний характерным является высокий риск внезапной смерти вследствие развития жизнеугрожающих нарушений ритма и/или проводимости. В основе этих заболеваний лежат мутации генов, кодирующих белки ионных каналов, экспрессирующихся в миокарде, а также их модуляторов. Это стало основанием для объединения этих заболеваний в группу «каналопатий». К первичным каналопатиям относят синдромы удлиненного интервала QT (LQTS), укороченного интервала QT (SQTS), синдромы Бругада и Лева-Ленегра, семейные формы синдрома Вольфа-Паркинсона-Уайта, идиопатическая и катехоламинергическая желудочковые тахикардии, семейные формы фибрилляции предсердий и синдрома слабости синусового узла, синдром детской внезапной смерти. Нормальные амплитуда и продолжительность сердечного потенциала действия обеспечиваются тонко сбалансированным взаимодействием многих ионных каналов и регуляторов их активности, каждый из которых кодируется отдельным геном. Поэтому количество белков и кодирующих их генов, способных привести к нарушениям электрогенеза, потенциально оценивается несколькими десятками. Известны около 15, по-видимому, ключевых генов, мутации в которых приводят к развитию типичных клинических проявлений этих заболеваний. Разные мутации в пределах одного гена по-разному изменяют электрофизиологические свойства считываемого белка, что приводит к появлению нескольких аллельных форм заболевания. Аллельные серии заболеваний описаны для большинства генов, ответственных за первичные нарушения сердечного ритма (табл. 5).

С другой стороны, один и тот же электрофизиологический эффект может быть результатом мутаций в разных генах. Например, ключевой признак синдрома удлиненного интервала QT - увеличение продолжительности QTc ≥ 460 мс - может явиться результатом мутации в любом из 7 генов, ответственных за это заболевание (табл. 6).

В небольшом количестве исследований описаны мутации в генах при рестриктивной кардиомиопатии (РКМП). Это в основном гены, кодирующие белки сократительных элементов кардиомиоцита, что характерно и для ГКМП и ДКМП. Так согласно [78, 79], для РКМП характерны мутации в генах, связанных с обменом Ca^{2+} , выявлены они у больных с плохим прогнозом и выраженной диастолической дисфункцией. С другой стороны, различия между РКМП и ДКМП обусловлены тем, например, что у больных РКМП мутации в гене TNN13 обнаружены у носителей гетерозигот, в то время при ДКМП они выявлены у носителей гомозигот [53, 54].

Несмотря на то, что большинство описанных заболеваний обнаруживаются в популяции редко, суммарная частота наследственно обусловленных сердечно-сосудистых заболеваний достаточно высока. Поэтому изучение молекулярно-генетических основ сердечно-сосудистых заболеваний является одной из приоритетных задач современной медицины. Из опыта крупнейших лабораторий мира, даже при полном скрининге всех известных генов, приводящих к развитию наследственных нарушений ритма и проводимости, приблизительно в 30-40% не удается установить первичный генетический дефект. Это связано с тем, что картированы и идентифицированы еще не все гены, приводящие к нарушению электрогенеза кардиомиоцита. Процент выявляемости мутаций в группе пациентов с первичными кардиопатиями также не превышает 50%. Идентификация новых генов на материале больших семей может позволить выявить новые молекулярно-генетические варианты заболеваний. Эти данные значительно расширяют наши представления о молекулярных основах и патогенезе кардиомиопатий, нарушений сердечного ритма и проводимости, а также могут лечь в основу этиологического подхода к лечению.

В последние десятилетия молекулярно-генетические методы все шире входят в клиническую практику. Проводятся крупные многоцентровые исследования, создаются международные регистры больных с наследственными сердечно-сосудистыми заболеваниями, содержащие результаты клинических и генетических исследований, отдаленных результатов терапии. Комплексный анализ сопоставления генетических и клинических данных позволяет считать, что существует прямая связь между первичным генетическим дефектом, особенностями клинической картины и прогнозом практически для всех групп заболеваний. ДНК-диагностика направлена на регистрацию непосредственной причины заболевания в виде изменения нуклеотидной последовательности ДНК. Выявление мутации в конкретном гене напрямую свидетельствует о наличии заболевания, независимо от степени выраженности клинических симптомов, и даже при их отсутствии. По данным Priory et al., около 30% больных с синдромом удлиненного интервала QT имеют скрытое течение заболевания, при которых отсутствуют характерные изменения на ЭКГ, но больные имеют, тем не менее, высокий риск внезапной смерти во время первого в жизни синкопального эпизода. Поэтому пресимптома-

Генетическая диагностика в этой группе больных позволяет сформировать оптимальную тактику наблюдения для каждого пациента, с учетом генетических, анамнестических и электрокардиографических данных. В зависимости от пораженного гена, по-разному оценивается влияние пола и возраста на риск КВС. Так, например, у пациентов с мутациями в гене SCN5A (LQT3) наблюдается наибольший процент летальных исходов во время острых кардиогенных эпизодов. В недавнем исследовании Prigou была проанализирована суммарная вероятность острых кардиогенных эпизодов (синкопе, остановка сердца, КВС) в зависимости от пораженного гена, пола и продолжительности QTc и предложена стратификация риска развития первого эпизода желудочковой тахикардии, основывающаяся на генетических данных. Генетические факторы, которые влияют на риск, являются более сложными, чем простое разделение больных LQTS на подгруппы LQT1, LQT2, LQT3 и т. д. Хотя пораженный ген и оказывает ключевое влияние на клинический фенотип, различные мутации в пределах одного и того же гена могут детерминировать различные по тяжести проявления заболевания. Описаны мутации, ассоциированные как с относительно благоприятным течением заболевания, так и с очень тяжелым прогнозом. Данные об отдельных мутациях, являющихся причиной заболевания, могут иметь важное прогностическое значение. В отсутствии адекватной терапии 10-летняя выживаемость после первого синкопального эпизода при синдроме удлиненного интервала QT составляет менее 50%. Современные подходы к оценке риска внезапной смерти у таких пациентов и выбору тактики лечения в значительной степени должны базироваться на информации о молекулярно-генетической природе заболевания.

Наиболее значимым практическим результатом всестороннего изучения клеточных, молекулярных и электрофизиологических основ синдрома удлиненного интервала QT явилась разработка терапевтических подходов, специфичных в отношении пораженного гена. То, что на уровне фенотипа реализуется как единый признак, в действительности может иметь различные генетические и электрофизиологические основания. Генетическая гетерогенность заболеваний является как основой для разработки патогенетической геноспецифической терапии, так и фактором, затрудняющим эту терапию у конкретного пациента. Единственным абсолютно достоверным методом установления молекулярно-генетического варианта заболевания является проведение ДНК-диагностики.

Для больных с мутациями в генах, кодирующих большие и малые субъединицы калиевых каналов (KCNQ1, KCNH2, KCNE1, KCNE2) наиболее эффективной является терапия бета-блокаторами. Однако если причиной синдрома являются мутации в гене SCN5A, приводящие к увеличению входящего натриевого тока (LQT3), то препараты этой группы могут являться пусковыми факторами для развития полиморфной желудочковой тахикардии. Нормализуют процессы реполяризации при этом типе заболевания антиаритмические препараты IV класса (мексилетин, лидокаин, флекаинид). Описан эффект снижения продолительно-

сти интервала QT у пациентов с LQT2 при комбинированной терапии бета-блокаторами и длительным приемом препаратов, увеличивающих концентрацию K⁺ в плазме.

Большое значение имеет ДНК-диагностика для консультирования больных с первичными кардиопатиями. Описаны мутации, детерминирующие как относительно благоприятное, так и злокачественное течение кардиомиопатии. В работе McKenna (1993) было показано, что около половины больных с миссенс-мутацией R453C в гене MYHCB (ГКМП) погибли внезапно в возрасте до 40 лет. Мутации R403Q, R719W/Q при ГКМП также связаны с высоким риском внезапной смерти. В то же время анализ клинических данных показывает, что мутации V606M, F513C, E542Q и 791insG ассоциированы с благоприятным прогнозом и близким к нормальному качеством жизни. Кроме того, прогностическое значение имеет локализация мутаций в гене. Значимым независимым предиктором низкой выживаемости является локализация мутаций в консервативных участках актин-связывающего сайта и стержневой части b-миозина. Мутации в гене TNNT2 приводят к высокому риску внезапной смерти при минимальной выраженности собственно гипертрофических процессов, что делает ДНК-диагностику в этой группе пациентов и их кровных родственников особенно актуальной. Пресимптоматическая диагностика заболевания в семьях, отягощенных по дилатационной кардиомиопатии, позволяет начинать лечение в ранние сроки. Если заболевание в конкретной семье ассоциировано с тяжелым течением и быстрым прогрессированием сердечной недостаточности, возможно рассмотрение вопроса о последующей трансплантации сердца и как можно более раннем поиске подходящего донора.

При ДКМП, вызванной мутациями в гене ламина (LMNA), наибольшую опасность для больных представляют нарушения ритма и проводимости. Поэтому в случае выявления мутаций в гене ламина целесообразно рассматривать больных как кандидатов для имплантации электрокардиостимулятора или кардиовертера-дефибриллятора. Однако прямая ДНК-диагностика кардиомиопатий достаточно сложна и не является рутинной процедурой. Это связано с большим числом заинтересованных локусов, значительным размером генов и отсутствием мажорных мутаций.

В семьях с большими родословными, включающими 6-10 пораженных и несколько здоровых кровных родственников, возможно установление хромосомного локуса, сцепленного с заболеванием, с последующим поиском мутаций в одном гене. Исследования, направленные на выявление и анализ корреляций генотип-фенотип проводятся для всех наследственных форм кардиомиопатий. На сегодняшний день важной задачей является дальнейшее накопление и сопоставление клинических и молекулярно-генетических данных.

Таким образом, влияние генетических факторов на развитие и течение заболевания, выбор оптимальной тактики лечения, эффекты от проводимой терапии весьма многообразно.

Дальнейшее развитие и совершенствование диагностических подходов и медицинской помощи больным невозможно без комплексного учета этих факторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бражник В.А., Затейщиков Д.А., Сидоренко Б.А. Наследственные факторы и гипер-трофия левого желудочка. Кардиология. 2003. №1. 78-88.
2. Габрусенко С.А., Селезнев Д.М., Бочков В.Н. и др. генетические аспекты гипертро-фической кардиомиопатии. Практикующий врач. №18 (2, 2000).
3. Джаиани Н.А. Детерминанты течения сердечной недостаточности: клинико-генетические сопоставления. Дисс...к.м.н. М. 2001. 112с.
4. Карпов Р.С., Пузырев К.В., Павлюкова Е.Н. и др. Молекулярно-генетический анализ гипертрофии миокарда левого желудочка. Кардиология. 2001. №6. 25-30.
5. Киселев И.О. Анализ влияния ДНК-полиморфизмов генов PАС на показатели структурно-функционального состояния миокарда у больных ГКМП. Дисс...к.м.н.С.Пб. 2000.126 с.
6. Киселев И.О., Федоров В.В., Шляхто Е.В. Молекулярно-генетические механизмы развития гипертрофической кардиомиопатии. Артериальная гипертензия. 2000. Том 6. №1. 44-51.
7. Костарева А.А., Гудкова А.Я., Семернин Е.Н. и др. Молекулярно-генетические аспекты и особенности клинического течения некоторых форм гипертрофической кардио-миопатии. Вестник аритмологии.2003. №32. 57-61.
8. Пузырев В.П. Состояние и перспективы геномных исследований в генетической кардиологии. Вестник РАМН. 2000. №7. 28-33.
9. Пузырев К.В. Клинико-генетические исследования факторов предрасположенности к эссенциальной гипертензии и идиопатической кардиомиопатии. Дисс...к.м.н. Томск. 1999. 159 с.
10. Рязанов А.С. Клинико-генетические аспекты развития гипертрофии левого желудочка. Российский кардиологический журнал. 2003. №2.
11. Степанов В.А., Пузырев К.В., Спиридонова М.Г. и др. Полиморфизм генов ангиотензинпревращающего фермента и эндотелиальной синтазы окиси азота у лиц с артериальной гипертензией, гипертрофией левого желудочка и гипертрофической кардиомиопатией. Генетика. 1998. 34; 1578-1581.
12. Терещенко С.Н., Демидова И.В., Кобалава Ж.Д. Структурно-функциональное состояние левого желудочка и эффективность ингибитора АПФ периндоприла у больных с постинфарктной сердечной недостаточностью в зависимости от полиморфизма гена ангиотензинпревращающего фермента. Кардиология .2000. №1. 34-37.
13. Туракулов Р.И. Микросателлитные маркеры в изучении наследственных заболеваний и геномной дактилоскопии. Автореф. Дисс...к.м.н. М.1998. 1-25 с.
14. Чистяков Д.А., Кобалава Ж.Д., Терещенко С.Н. и др. Полиморфизм гена сосудистого рецептора ангиотензина II и сердечно-сосудистые заболевания. Терапевтический архив. 2000. №4. 27-30.
15. Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006; **6**: 185– 216.
16. Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, Kathmann EC, O’Coilain F, Gao F, et al. ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *NatGenet* 2004; **36**: 382 – 387.
17. Burton D., Abdularazzak H., Knott A. Two mutations in troponin I that cause hypertrophic cardiomyopathy have contrasting effect on cardiac muscle contractility. *Biochemical J.*,2002, vol 362, 443-451.
18. Butler R. The DD-ACE genotype and cardiovascular disease. *Pharmacogenomics*. 2000 May;1(2):153-67.
19. Carey RM, Wang Z-Q, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*. 2000; 35: 155–163.

20. Carrier L., Bonne G., Bahrend E. et al. Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ. Res.* 1997;80: 427-434.
21. Chen A.H., Zhang W.X., Li Z.L. et al. Association between aldosterone synthase gene polymorphism and hypertrophic cardiomyopathy. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2002 Aug;22(8):704-706.
22. Cohen N, Muntoni F. Multiple pathogenetic mechanisms in X linked dilated cardiomyopathy. *Heart* 2004; **90**: 835 – 841.
23. Covolo L., Gelatti U., Metra M. et.al. Angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and heart failure: a case-control study. *Biomarkers.* 2003 Sep-Oct;8(5):429-36.
24. De Gasparo M., Catt K.J., Inagami T. et al. International Union of Pharmacology, 23-th. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol Rev.* 2000; 52:3: 415-472.
25. Deinum J, van Gool JM, Kofflard MJ. et al. Angiotensin II type 2 receptors and cardiac hypertrophy in women with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension.* 2001 Dec 1; 38(6):1278-81.
26. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, et al. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med* 1999; **341**: 1715– 1724.
27. Fatkin D., Graham R.M. Molecular Mechanism of Inherited Cardiomyopathies. *Physiology Review.* 2002. vol. 82. p. 945-980.
28. Fernandez-Llama P., Poch E., Oriola J., et al. Angiotensinogen gene M 235 T and T 174 M Polymorphism in Essential Hypertension. *Am. J. Hypertens.*, 1998, v.11, 439-444.
29. Finsterer J, Stöllberger C. The heart in human dystrophinopathies. *Cardiology* 2003; **99**: 1 – 19.
30. Franz W.-M., Muller O.J., Katus H.A. Cardiomyopathies: from genetics to the prospect of treatment. // *Lancet.* 2001 Vol 358. Nov (10). 1627-1637.
31. Fung D.C. et al. An online locus-specific mutation database for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Hum. Mutat.* 1999. vol.14 (4) 326-332.
32. Furrukh S., Malik M.D., Carl J. et al. Renin-angiotensin system: genes to bedside. *Am Heart J.* 1997.134: 5: 514-527.
33. Goldbergova M., Spinarova L., Spinar J. et al. Association of two angiotensinogen gene polymorphisms, M235T and G(-6)A, with chronic heart failure. *Int J Cardiol.* 2003 Jun;89(2-3):267-72.
34. Hengstenberg C., Holmer S.R., Mayer B. et al. Evaluation of the aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism in patients with myocardial infarction. *Hypertension.* 2000. 35: 704-709.
35. Hindorff LA, Heckbert SR, Tracy R. et al. Angiotensin II type 1 receptor polymorphisms in the cardiovascular health study: relation to blood pressure, ethnicity, and cardiovascular events. *Am J Hypertens.* 2002 Dec; 15(12): 1050-1056.
36. Hoffman B., Schmidt-Traub H., Perrot A. et al. First mutation in cardiac troponin C. L29Q in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Hum. Mutat.* 17:524, 2001.
37. Ibichini F., Steffenino G., Dellavalle A., et.al. Plasma activity and insertion/deletion polymorphism of angiotensin-I converting enzyme. A major risk factor and a marker of risk for coronary stent restenosis. *Circulation.* 1998. 97. 147-154.
38. Ishanov A., Okamoto H., Watanabe M. et al. An angiotensin II type I receptor gene polymorphism in patients with cardiac hypertrophy. *Jpn Heart J.* 1998. 39: 87-96.
39. Ishanov A., Okamoto H., Yoneya K. et al. Angiotensinogen gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Hert J* 1997: 133: 184-189.
40. Kabaeva Z.T., Perrot A., Wolter B., et.al. Systematic analysis of the regulatory and essential myosin light chain genes: genetic variants and mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *European Journal of Human Genetics.* 2002. 10. 741-748.
41. Katsuya T., Horiuchi M., Minami S. et al. Genomic organization and polymorphism of human angiotensin II type 2 receptor: no evidence for its gene mutation in two families of human premature ovarian failure syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 127: 221–228.

42. Kimura A., Molecular etiology and pathogenesis of hereditary cardiomyopathy. *Circulation journal* 2008; Suppl. A; 38-48.
43. Kupari M., Hautanen A., Lankinen L. et al. Association between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism and left ventricular size, mass, and function/ *Circulation*. 1998; 97: 569-575.
44. Lechin M., Quiones M.A., Omran A., et.al. Angiotensin I converting enzyme genotypes and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1995. 92:7: 1808-1812.
45. Lopez-Haldon J., Garcia-Lozano J.R., Martinez Martinez A. et al. The effect of polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen genes on the phenotypic expression of Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy *Med Clin (Barc)*. 1999 Jul 10; 113(5):161-3.
46. Marian AJ. Modifier genes for hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol*. 2002 May; 17(3):242-52.
47. Marian AJ. Pathogenesis of diverse clinical and pathological phenotypes in hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. 2000; 355: 58–60.
48. Marian A.J., Roberts R. The Molecular Genetic Basis for Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Molecular and Cellular Cardiology* 2001. vol. 33, p. 655-670.
49. Maron B.J. Hypertrophic cardiomyopathy. *JAMA*. 2002. 287. 1308-1320.
50. Maron B.J., Gardin J.M., Flack J.M., et.al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults: echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. *Circulation*.1995.92. p.785-789.
51. Maron B.J., Olivotto I., Spirito P., et.al. Epidemiology of hypertrophic cardiomyopathy-related death: revisited in a large non-referral-based patient population. *Circulation*.2000. 102. 858-864.
52. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res*. 1998; 83: 1182–1192.
53. Mogensen J, Kubo T, Duque M, Uribe W, Shaw A, Murphy R, et al. Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutations. *J Clin Invest* 2003; **111**: 209 –216.
54. Murphy RT, Mogensen J, Shaw A, Kubo T, Hughes S, McKenna WJ. Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2004; **363**: 371–372.
55. Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 1998; **280**: 750– 752.
56. Olson T.M., Doan T.P., Kishimoto N.Y. et al. Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2000, 32: 1687-1694.
57. Otlepp J.R., Vosberg H.P., Reith S. et al. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system associated with expression of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: a study of five polymorphic genes in a family with a disease causing mutation in the myosin binding protein C gene. *Heart*. 2002 Mar; 87(3): 270-5.
58. Osterop A.P., Kofflard M.J., Sandkuijl L.A. et al. AT receptor A/C¹¹⁶⁶ polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension*. 1998. 32: 825-830.
59. Ozono R, Matsumoto T, Shingu T. et al. Expression and localization of angiotensin subtype receptor proteins in the hypertensive rat heart. *Am J Physiol*. 2000; 278: R781–R789.
60. Pinto JR, Parvatiyar MS, Jones MA, Liang J, Potter JD. A troponin T mutation that causes infantile restrictive cardiomyopathy increases Ca²⁺ sensitivity of force development and impairs the inhibitory properties of troponin. *J Biol Chem* 2008; **283**: 2156– 2166.
61. Poetter K., Jiang H., Hassanzaden S. et al. Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat.Genet*. 1996, 13: 63-69.

62. Richard P., Charron P., Carrier L. Hypertrophic cardiomyopathy. Distribution of disease genes, spectrum of mutations and implications for a molecular diagnosis strategy. // *Circulation*. 2003. vol. 107. p. 2227-2232.
63. Saton M., Takahashi M., Sakamoto T. et al. structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999. 262: 411-417.
64. Schunkert H., Hengstenberg C., Holmer S.R. et al. Lack of association between a polymorphism of aldosterone synthase gene and left ventricular structure. *Circulation*. 1999; 99: 2255-2260.
65. Seidman C.E., Seidman J.G. Molecular genetic studies of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Basic. Res. Cardiol*. 1998, 93, Suppl.3:13-16.
66. Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: From mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 2001; **104**: 557–567.
67. Spirito P, Bellone P, Harris KM. et.al Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2000; 342: 1778–1785.
68. Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra AP, Soubrier F, Vlietinck R, Fa-gard R. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens*. 1997; 15:1579–1592.
69. Tiret L., Bonnardeaux A., Poirier O. et al. synergistic effect on angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor gene polymorphism on risk of myocardial infarction. *Lancet*. 1994. 344. 910-913.
70. Thierfelder L., Watkins H., MacRae C. et al. Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: A disease of sarcomere. *Cell*. 1994. Vol. 77. P. 701-712.
71. Towbin JA, Bowles NE. Genetic abnormalities responsible for dilated cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep* 2000; **2**: 475– 480.
72. Towbin JA, Bowles NE. The failing heart. *Nature* 2002; **415**: 227 –233.
73. Tsutumi Y, Matsubara H, Ohkubo N. et al. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res*. 1998; 83: 1035–1046.
74. Turner A.J., Hooper N.M. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 2002. 23: 177-183.
75. Varnava A., Elliot P., Baboonian C. Histopathological features of Sudden Death in Cardiac troponin T disease. *Circulation*. 2001. vol 104. 1380-1384.
76. Wharton J, Morgan K, Rutherford RAD. et al. Differential distribution of AT₂ receptors in the normal and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998; 284: 323–336.
77. Winegrad S., Cardiac myosin binding protein C. *Circulat. Res*. 1999.84; 1117-1126.
78. Yamada Y., Ichihara S., Fujimura T. et al. Lack of association polymorphism of the angiotensin converting enzyme and angiotensinogen genes with nonfamilial hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Am J Hepertens* 1997; 10:8:921-928.
79. Yumoto F, Lu QW, Morimoto S, Tanaka H, Kono N, Nagata K, et al. Drastic Ca²⁺ sensitization of myofilament associated with a small structural change in troponin I in inherited re-strictive cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **338**: 1519– 1526.

Таблица 1

Примеры наследственных моногенных заболеваний сердечно-сосудистой системы

Заболевание	ТН	Ген/локус
Семейная гиперхолестеринемия	А/Д, А/Р	LDLR (19p13.2), ARH (1p36-p35), USF1 (1q22-q23)
Псевдогипоальдостеронизм	А/Д, А/Р	WNK1 (17q21), WNK4 (12p13.3), PHA2A (1q31-q42)

Синдром удлиненного интервала QT	А/Д, А/Р	KCNQ1 (11p15.5), KCNH2 (7q3), SCN5A (3p21-24), ANKB (4q25-27), KCNE1 (21q22), KCNE2 (21q22), KCNJ2 (17q23)
Синдром укороченного интервала QT	А/Д	KCNQ1 (11p15.5), KCNH2 (7q3)
Синдром Бругада	А/Д	SCN5A (3p21-24), 3p22-25
Аритмогенная правожелудочковая дисплазия/кардиомиопатия	А/Д, А/Р	14q23-q24, hRyR2 (1q42-q43), 14q12-q22, 2q32.1-q32.3, 3p23, 10p12-p14, DSP (6p24)
Катехоламинергическая желудочковая тахикардия	А/Д, А/Р	hRyR2 (1q42-q43), CASQ2 (1p13-21)-
Семейные формы ФП	А/Д	KCNQ1 (11p15.5)
Семейные формы CCCУ	А/Д	SCN5A (3p21-24)
Синдром Вольфа-Паркинсона-Уайта	А/Д	PRAKG2 (7q3)
Гипертрофическая кардиомиопатия	А/Д	MYH7 (14q12), TNNT2 (1q32), TPM1 (15q22.1), MYBPC3 (11p11.2), PRKAG2 (7q36), TNNI3 (19q13.4), MYL3 (3p), TTN (2q24.3)
Дилатационная кардиомиопатия	А/Д, А/Р, Х/Р	Более 20 локусов

здесь и далее ТН - тип наследования, А/Д -аутосомно-доминантный, А/Р - аутосомно-рецессивный, Х/Р - Х-сцепленный рецессивный, ФП -фибрилляция предсердий, CCCУ - синдром слабости синусового узла

Таблица 2

Гены, ответственные за развитие гипертрофической кардиомиопатии

ГКМП	Локус	Ген	Белок
ГКМП 1	14q12	MYH7	Тяжелая цепь б-миозина
ГКМП 2	1q32	TNNT2	Сердечный тропонин Т
ГКМП 3	15q22.1	TPM1	а-тропомиозин
ГКМП 4	11p11.2	MYBPC3	Миозин-связанный С-белок
ГКМП 5	15q11	ACTC	Сердечный а-актин
ГКМП 6 с WPW	7q36	PRKAG2	д2-регулярная субъединица АМФ - активир. протеинкиназы
ГКМП 7	19p13.2	TNNI3	Тропонин I
ГКМП 8	3p21.3	MYL3	Легкая цепь основного миозина
ГКМП 9	12q23-q24.3	MYL2	Легкая цепь регуляторного миозина
ГКМП10	2q24.1	TTN	Титин
ГКМП 11	14q1	MYH6	Легкая цепь а-миозина
ГКМП 12	3p21.3-14.3	TNNC1	Сердечный тропонин С
ГКМП 13	Мутации митохондриальной ДНК		

Таблица 3

Гены, ответственные за развитие дилатационной кардиомиопатии

Ген/локус	Белок	Тип наследования
1q21.2	Ламин А/С	А/Д
1q32	Сердечный тропонин Т	А/Д
2q11-22	Неизвестен	А/Д
2q24.3	Титин	А/Р
2q35	Десмин	А/Д
3p22-25	Неизвестен	А/Д
4q35	Актинин- ассоциированный LIM-белок	А/Д
5q33	d-саркогликан	А/Д
6q12-16	Неизвестен	А/Д
6q22.1	Фосфоламбан	А/Д
6q23-24	Неизвестен	А/Д
9q13-22	Неизвестен	А/Д
10q22	Метавинкулин	А/Д
11p11.2	Миозин-связанный С-белок	А/Д
14q12	Тяжелая цепь b-миозина	А/Д
12p12.1	АТФ-связывающий комплекс, семейство 3, белок 31	А/Д
15q14	Актин	А/Д
15q22.1	а-тропомиозин	А/Д
17q12-21.33	Телетонин	А/Д
Xp21	Дистрофии	X/Р
Xq28	Эмерин	X/Р
Xq28	Тафаззин	X/Р

Таблица 4

Гены/локусы, ответственные за развитие аритмогенной дисплазии правого желудочка (ARVD)

Форма	Локус	Белок/ген
ARVD1	14q23-q24	Истмин-подобный белок, тип 1 (TAIL1)
ARVD2	1q42-q43	Рианодиновый рецептор (RYR2)
ARVD3	14q12-q22	Неизвестен
ARVD4	2q32.1-q32.3	Неизвестен
ARVD5	3p23	Неизвестен
ARVD6	10p12-p14	Неизвестен
ARVD7	6p24	Десмоплакин (DSP)

Таблица 5

Примеры генов, ответственных за разные клинические формы

Ген	Заболевания, вызываемые мутациями в гене
KCNQ1	Синдром удлинённого интервала QT, тип 1 (LQT1), синдром укороченного интервала QT, тип 1 (SQT1), семейная фибрилляция предсердий.
KCNH2	Синдром удлинённого интервала QT, тип 2 (LQT2); синдром укороченного интервала QT, тип 2 (SQT2); синдром удлинённого интервала QT, вызванного приемом лекарственных препаратов.
SCN5A	Синдром удлинённого интервала QT, тип 3 (LQT3); синдром Бругада, синдром Лева-Ленегра, идиопатическая желудочковая тахикардия, синдром детской внезапной смерти, дилатационная кардиомиопатия с нарушением проводимости.
RYR2	Катехоламинергическая и идиопатическая желудочковые тахикардии, аритмогенная правожелудочковая дисплазия, тип 2.

Таблица 6

Гены, ответственные за синдром удлинённого интервала QT

Ген	Локализация	Ген	Белковый продукт
LQT1	11p15.5	KCNQ1	а-субъединица калиевого канала
LQT2	7q35-36	KCNH2	а-субъединица калиевого канала
LQT3	3p21-24	SCN5A	Натриевый канал
LQT4	4q25-27	AnkB	Анкирин В
LQT5	21q22.1-22	KCNE1	б-субъединица калиевого канала
LQT6	21q22.1-22	KCNE2	б-субъединица калиевого канала
LQT7	17q23.1-q24.2	KCNJ2	а-субъединица калиевого канала

**ВЛИЯЕТ ЛИ АСТN3 R577X ПОЛИМОРФИЗМ НА ВЫСОКИЕ
СПОРТИВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ?**

*Пушкарёв В.П., Леконцев Е.В., Куликов Л.М., Пушкарев Е.Д.,
Рахманина Л.В., Вишнев В.Ю., Дятлов Д.А.*

НИИ олимпийского спорта, ФГОУ ВПО «Уральский государственный университет
физической культуры»

454091 Челябинск, ул. Орджоникидзе, д. 1
Тел.: 351-2630613, e-mail: vpp2000@rambler.ru

РЕЗЮМЕ: Одним из полиморфизмов, представляющих интерес для спортивной генетики является R577X АСТN3, который вызывает прекращение синтеза α-актинин-3 в быстрых мышечных волокнах, что приводит к нарушению стабильности сократительного аппарата бы-

стрых мышечных волокон, а также регуляции дифференциации миофибрилл и сокращения. Показано влияние этого полиморфизма на спортивную успешность в видах спорта связанных как со скоростно-силовыми качествами, так и с выносливостью. Сравнивались аллельные и генотипические частоты полиморфизма R577X ACTN3 между смешанной группой высококвалифицированных спортсменов (n=138) и контролем (n=144). Показано преобладание R-аллеля и генотипов с этим аллелем (RR и RX) среди спортсменов. Различия между частотами генотипа XX в обеих группах статистически значимы (20,8% в контроле против 10,9% в группе спортсменов, $p = 0.024$). Тестирование R577X ACTN3 полиморфизма может быть полезным для оценки генетической предрасположенности к спортивным нагрузкам и для спортивного отбора.

Ключевые слова: α -актинин-3, R577X ACTN3 полиморфизм, спортивная успешность

SUMMARY: The α -actinin-3 (ACTN3) gene encodes a Z-disc structural protein which is found only in fast-twitch myofibers. ACTN3 R577X polymorphism results in loss of α -actinin-3 and has been suggested to influence skeletal muscle function. This study tests 138 Russian national and world-class strength/speed and endurance athletes and 144 sedentary controls. ACTN3 XX genotype was under-represented in athletes compared to controls (10,9% vs 20,8%, $p = 0.024$). The loss of α -actinin-3 in fast-twitch myofibers resulted from ACTN3 XX genotype seems to be restriction factor for high athletic achievements in strength/speed and endurance sports.

Key words: α -actinin-3, ACTN3 R577X polymorphism, sport achievements

Молекулярно-генетическая составляющая спортивной успешности является предметом интенсивных исследований последних десяти лет [3, 4]. О росте интереса к таким исследованиям свидетельствует значительное увеличение числа генов-кандидатов (до 239), представленных в последней версии генетической карты физической активности (The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update) по сравнению с ее предыдущим выпуском, вышедшим в 2005 году [4].

С момента открытия в 1999 году группой австралийских исследователей под руководством К. North полиморфизма R577X гена ACTN3, который приводит к прекращению синтеза α -актинин-3 в быстрых мышечных волокнах [7, 9], проводятся интенсивные ассоциативные исследования этого полиморфизма с качественными и количественными параметрами скелетной мускулатуры. В скелетной мышце α -актинин-2 и -3 являются главными структурными компонентами Z-линий саркомеров, где они выполняют роль якоря для актин-содержащих тонких волокон и стабилизируют сократительный аппарат мышечного волокна. Кроме того, α -актинины играют роль в организации тонких волокон и взаимодействии между цитоскелетом саркомера и мышечной мембраной, а также в регуляции дифференциации миофибрилл и/или сокращения [8, 10, 15]. Показано, что R577X ACTN3 полиморфизм важен в видах спорта связанных как со скоростно-силовыми качествами, так и с выносливостью, а также в игровых (футбол) и сложно координаторных видах спорта (художественная гимнастика) [1, 2, 5, 6, 11-14, 16]. Научная группа под руководством А. Lucia включила R577X ACTN3 полиморфизм в полигенные профили для оценки предрасположенности как к скоростно-силовым качествам [12], так и к выносливости [11]. С другой стороны, связь данного

полиморфизма со скоростно-силовыми показателями у тренированных людей, а также его влияние на состав мышечных волокон не всегда подтверждается [6, 8]. Целью данного исследования было оценить влияние полиморфизма R577X ACTN3 на высокие достижения в видах спорта связанных как со скоростно-силовыми качествами, так и с выносливостью, с помощью сравнения распределения аллельных и генотипических частот смешанной группы высококвалифицированных спортсменов и контроля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В генотипировании приняли участие 138 высококвалифицированных спортсменов, имеющих разряды: кандидат в мастера спорта – 33,3%, мастер спорта – 47,8%, мастера спорта международного класса – 14,5%, заслуженный мастер спорта – 4,4%. Возраст: $26,5 \pm 0,9$ лет. По видам спорта спортсмены были распределены следующим образом: единоборства – 26,1%, игровые виды спорта - 25,4, циклические виды спорта – 41,3, другие – 7,2%. В качестве контрольной группы были 144 здоровых, неродственных европеоидных жителей Челябинской области, не занимающихся спортом. Возраст: $23,5 \pm 0,6$. От всех было получено информированное согласие на участие в тестировании. Образцы буккального эпителия брали стерильными аппликаторами фирмы Whatman (США). Геномную ДНК экстрагировали с помощью Diatom™ DNA Prep 200 набора реагентов (Лаборатория Изоген, Россия). R577X ACTN3 полиморфизм (rs1815739), типировали классическим методом амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим ПДРФ-анализом [7]. Последовательности праймеров: прямой - 5'- CTGTTGCCTGTGGTAAGTGGG - 3', обратный - 5'- TGGTCACAGTATGCAGGAGGG - 3'. ПЦР проводили в амплификаторах iQ5 (Bio-Rad, США) и GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США). Праймеры синтезировались фирмой Евроген (Россия). ПЦР-фрагменты обрабатывали рестриктазой DdeI в соответствии с рекомендациями производителя (Fermentas, Литва). Продукты рестрикции разделяли с помощью 8% нативного полиакриламидного гель-электрофореза с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией на трансиллюминаторе фирмы UVP (США).

Равновесие Харди-Вайнберга (РХВ) для генотипических частот R577X ACTN3 полиморфизма в контрольной группе и группе высококвалифицированных спортсменов тестировали с помощью точного теста Фишера с использованием программы GDA1 v.1.0 (<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>). Сравнение генотипических и аллельных частот R577X полиморфизм гена ACTN3 проводили с помощью пакета STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученное распределение аллельных и генотипических частот R577X полиморфизм гена ACTN3 в контрольной группе и группе высококвалифицированных спортсменов представлено на Рис. 1. Статистически значимого отклонения генотипических частот от РХВ в обеих группах не наблюдалось ($P > 0,05$). Аллельные и генотипические частоты R577X

ACTN3 полиморфизма в контрольной группе хорошо согласуются с частотами, полученными для российской и других европеоидных популяций [2, 5, 6, 11, 16]. При сравнении аллельных и генотипических частот между контрольной группой и группой спортсменов обращает на себя внимание преобладание R-аллеля и генотипов с этим аллелем (RR и RX) в последней группе. Различия между частотами генотипа XX в обеих группах статистически значимы (20,8% в контроле против 10,9% в группе спортсменов, $p = 0.024$). Корреляционный анализ между генотипом R577X ACTN3 полиморфизма и разрядом генотипированных спортсменов не выявил статистически значимой связи, которая была показана другими авторами [5]. Наиболее вероятным объяснением этому является то, что большинство спортсменов, участвовавших в данном исследовании, являются действующими и не достигли пика своего индивидуального мастерства.

Таким образом, результаты данного исследования подтверждают, что полное отсутствие белка α -актинин-3 в быстрых мышечных волокнах является одним из факторов ограничивающих достижение высоких спортивных результатов в различных видах спорта, требующих как скоростно-силовых качеств, так и выносливости. Следовательно, тестирование R577X ACTN3 полиморфизма является важным фактором при оценке генетической предрасположенности спортсменов к выполнению больших физических нагрузок и служит надежным критерием при спортивном отборе.

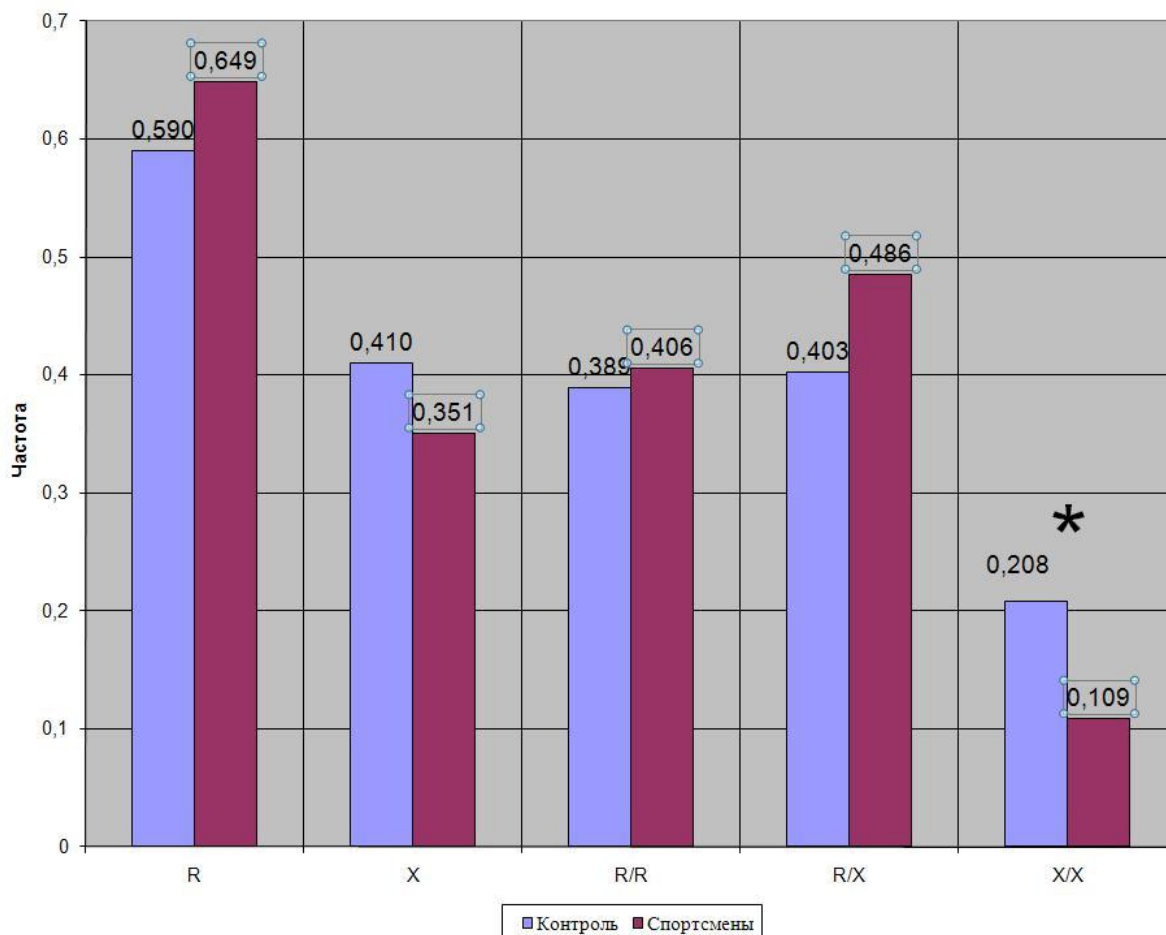
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rogozkin V.A., Astratenkova I.V., Druzhevskaya A.M., Fedotovskaya O.N. Генетические маркеры предрасположенности к скоростно-силовым видам спорта // Теория и практика физической культуры. – №1. – 2005. – С.2-4.
2. Ahmetov I.I., Druzhevskaya A.M., Astratenkova I.V. et al. The ACTN3 R577X polymorphism in Russian endurance athletes // Br. J. Sports Med. – 2008. - Published Online First: 21 August 2008.
3. Ahmetov I.I., Rogozkin V.A. Genes, athlete status and training – an overview // Med. Sport. Sci. Basel, Karger. – 2009. – V. 54. – P. 43-71.
4. Bray M.S., Hagberg J.M., Pérusse L. et al. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update. // Med. Sci. Sports Exerc. – 2009. – V. 41, N1. – P. 35-73.
5. Druzhevskaya A.M., Ahmetov I.I., Astratenkova I.V., Rogozkin V.A. Association of the ACTN3 R577X polymorphism with power athlete status in Russians // Eur. J. Appl. Physiol. – 2008. – V. 103, N6. – P. 631-634.
6. Massidda M., Vona G., Calò C.M. Association between the ACTN3 R577X polymorphism and artistic gymnastic performance in Italy // Genet. Test. Mol. Biomarkers. – 2009. – V.13, N3. – P. 377-380.
7. McCauley T., Mastana S.S., Hossack J. et al. Human angiotensin-converting enzyme I/D and α -actinin3 R577X genotypes and muscle functional and contractile properties // Exp. Physiol. – 2009. - V. 94, N1. – P. 81-89
8. Mills M., Yang N., Weinberger R.P. et al. Differential expression of the actin-binding proteins, α -actinin-3 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy // Hum. Mol. Genet. – 2001. – V. 10, N13. – P. 1335-1346.

9. Norman B., Esbjörnsson M., Rundqvist H. et al. Strength, power, fiber types, and mRNA expression in trained men and women with different ACTN3 R577X genotypes // J. Appl. Physiol. – 2009. – V. 106. – P. 959-965.
10. North K. Why is α -actinin-3 deficiency so common in the general population? The evolution of the athletic performance // Twin Res. Hum. Genet. – 2008. – V. 11, N4. – P. 384-394.
11. Roth S.M., Walsh S., Liu D., Metter E.J. et al. The ACTN3 R577X nonsense allele is under-represented in elite-level strength athletes // Eur. J. Hum. Genet. – 2008. – V. 16, N3. – P. 391-394.
12. Ruiz J.R., Gómez-Gallego F., Santiago C. et al. Is there an optimum endurance polygenic profile? // J Physiol. – 2009. – P. 1527-34.
13. Ruiz J.R., Arteta D., Buxens A. et al. Can we identify a power-oriented polygenic profile? // J. Appl. Physiol. – 2010. – V. 108, N3. – P. 561-566.
14. Santiago C, González-Freire M, Serratoso L, et al. ACTN3 genotype in professional soccer players. // Br. J. Sports Med. - 2008. – V. 42, N1. – P. 71-73.
15. Vincent B., De Bock K., Ramaekers M. et al. ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution // Physiol. Genomics. – 2007. – V.32. – P. 58-63.
16. Yang N., MacArthur D.G., Gulbin J.P. et al. ACTN3 Genotype is associated with human elite athletic performance // Am. J. Hum. Genet. – 2003. – V. 71. – P. 627-631.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ

Аллельные и генотипические частоты R577X полиморфизма ACTN3 гена в контрольной группе (n=144) и группе спортсменов (n=138). (* - p=0.024)



НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОМА ПРИ СИНДРОМЕ МИКРОДЕЛЕЦИИ

**Савина Н.В.¹, Смаль М.П.¹, Куэжир Т.Д.¹, Хурс О.М.², Егорова Т.М.²,
Политыко А.Д.², Гончарова Р.И.¹**

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
220072 Республика Беларусь, Минск, Академическая
27, E-mail: R.Goncharova@igc.bas-net.by

² Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»
220053 Республика Беларусь, Минск, Орловская, 66
E-mail: polityko@yahoo.com

РЕЗЮМЕ: Исследовано состояние генома у 9 пациентов с синдромом Вильямса методами цитогенетического анализа, FISH и гель-электрофореза одиночных клеток (метод ДНК-комет). Частота и спектр aberrаций хромосом находились в пределах вариабельности значений, типичных для белорусской популяции. У всех пациентов идентифицирована микроделеция 7q11.23. С помощью метода ДНК-комет выявлены признаки дестабилизации генома, обусловленные, по-видимому, понижением эффективности репарации ДНК на начальных этапах.

Ключевые слова: синдром Вильямса, aberrации хромосом, микроделеция, повреждения ДНК, репарация ДНК, лимфоциты.

SUMMARY: Genomic integrity in nine patients with Williams syndrome (WS) was studied using cytogenetic analysis, FISH and single cell gel electrophoresis (the comet assay). The frequencies and spectrum of chromosome aberrations were in the range of variability of values typical of the Belarusian population. The microdeletion 7q11.23 was identified in all patients. Using the comet assay, some features of genome destabilization were revealed in association with decreased DNA repair efficiency at the initial stages.

Key words: Williams syndrome (WS), chromosome aberrations, microdeletion, DNA damage, DNA repair, lymphocytes.

К мультисистемным генетическим заболеваниям относится группа хромосомных болезней, включающая синдромы микроделений. Причиной возникновения этих заболеваний являются локус-специфические делеции генома размером от 1 до 5 Mb [Yeshaya et al., 2009], которые приводят к утрате группы генов в пределах одного сегмента хромосомы. Размеры таких перестроек не позволяют обнаружить их при стандартном цитогенетическом анализе с использованием дифференциальной GTG-окраски хромосом. Выявление микроделений осуществляют с помощью молекулярно-цитогенетических методов, в том числе флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и ряда новейших технологий с использованием микрочипов [Wilson et al., 2009; Stankiewicz, Lupski, 2010]. Характерно, что делетированная область содержит сопредельные, но функционально не связанные гены, что и обуславливает широкий спектр фенотипических признаков при этих синдромах.

Одним из наиболее частых синдромов микроделеций является синдром Вилльямса (СВ), впервые описанный независимо друг от друга кардиологами J.S. Williams и A.J. Beuren в 1961–1962 гг. Заболевание характеризуется комплексом пороков развития, включая специфические черепно-лицевые дизморфии («лицо эльфа»), врожденный порок сердца, неонатальную гиперкальциемию, задержку физического, моторного и психоречевого развития, поведенческие особенности. Оно возникает в результате *de novo* микроделеции 7q11.23 размером 1.5–1.8 Mb и встречается с частотой 1 на 7 500–20 000 новорожденных [Tassabehji, 2003; Martens et al., 2008; Schubert, 2009]. Следует отметить, что указанная критическая для СВ область 7-й хромосомы содержит около 30 генов, однако наиболее характерные фенотипические признаки ассоциированы с утратой гена *ELN*, кодирующего белок тропоэластин [Nickerson et al., 1995].

Исследования, проведенные на базе Республиканского научно-практического центра «Мать и дитя» на выборке из 24 пациентов с установленным диагнозом СВ, показали вариабельность фенотипических признаков СВ [Хурс и др., 2009]. Выявлена более тяжелая степень пороков сердечно-сосудистой системы у пациентов мужского пола. Идентифицированная микроделеция у всех пациентов имела размер порядка 1,55Mb, что соответствовало европейским данным, включала ген *ELN* и как минимум участок критической области между генами *FZD9* и *CYLN2*.

Целью данной работы была оценка состояния генома у пациентов с СВ с помощью цитогенетических методов, FISH и разрабатываемой нами технологии с привлечением метода ДНК комет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемая группа сформирована из числа пациентов ГУ РНПЦ «Мать и дитя» с клинически предполагаемым диагнозом СВ. Возраст пациентов от 1 года 4 месяцев до 23 лет; соотношение полов мужской/женский – 6:3. В качестве контроля исследована группа здоровых доноров-волонтеров. Обследование проводили в соответствии с международными требованиями о добровольном согласии и соблюдении конфиденциальности личной информации.

Объект исследования – лимфоциты периферической венозной крови.

Цитогенетическая диагностика включала стандартное кариотипирование с помощью GTG-метода дифференциального окрашивания метафазных хромосом. Кроме того, проводили анализ частоты и спектра aberrаций хромосом, которые регистрировали в соответствии с принципами Международной системы номенклатуры хромосом человека [Shaffer, Tommerup, 2005]. Для выявления типичного генетического дефекта – микроделеции в критической области длинного плеча хромосомы 7 - выполняли *FISH-диагностика* на препаратах метафазных хромосом по стандартному протоколу [Rautenstrauss, Liehr, 2001] с использованием коммерческих локус-специфических ДНК-проб: LSI Williams-Beuren Region Probe (FZD9, WBSCR10, TBL2; LIMKI, WBSCR2, D7S613, WBSCR1, RFC2; CYLN2 Direct Red/7q22 LSI control Green) (Q-biogene), а также Williams Region Probe (LSI ELN, LIMKI, D7S613 Spectrum Orange/7q31 LSI D7S486, D7S522 Spectrum Green) (Vysis).

Метод ДНК комет (*щелочной гель-электрофорез единичных клеток*) применяли для анализа частоты эндогенных и экзогенных повреждений ДНК, а также кинетики репарации ДНК после окислительного стресса в соответствии с известными рекомендациями [Tice et al., 2000; Collins, 2004]. Для этого использованы лимфоциты сразу после их выделения из периферической венозной крови центрифугированием в градиенте Histopaque-1077 (ICN). Клеточную суспензию обрабатывали пероксидом водорода (H_2O_2 , 100 мкМ) при 4°C в течение 1 минуты, после чего клетки отмывали от мутагена охлажденным буферным раствором и затем инкубировали при 37°C в течение 3-х часов. Для оценки кинетики элиминации повреждений ДНК и эффективности репарации ДНК образцы отбирали на 0, 15, 30, 60, 120 и 180-й минуте после обработки лимфоцитов H_2O_2 . Повреждения ДНК определяли визуально по длине «хвоста кометы» при флуоресцентном микроскопировании препаратов, а уровень поврежденности ДНК рассчитывали по известной формуле и выражали в условных единицах (arbitrary units, a.u.) [Anderson et al., 1994; Collins et al., 1994]. Эффективность репарации ДНК (процент элиминированных повреждений ДНК) вычисляли по разности между показателями уровня повреждений ДНК (a.u.) на 0-й минуте и в последующих точках анализа относительно 0-й точки.

Статистический анализ и графическое представление результатов выполнены с помощью программного обеспечения Microsoft Office (Excel-2000). При сравнении частотных показателей по точному критерию Фишера и проведении регрессионного анализа использовали пакет прикладных программ для статистической обработки данных АВ-STAT, разработанных в.н.с. Института генетики и цитологии Анощенко Б.Ю.; показатели, полученные с помощью метода ДНК-комет, сравнивали по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У всех пациентов выявлен нормальный кариотип. Данные цитогенетического обследования пациентов с клинически предполагаемым диагнозом СВ сравнивали с результатами аналогичного исследования в контрольной группе здоровых доноров-волонтеров (Таблица 1).

В группе пациентов средняя частота aberrаций хромосом незначительно превышала этот показатель в контрольной группе, но индивидуальные частоты находились в пределах вариабельности, характерной для здоровых представителей белорусской популяции [Егорова, Политыко, 1999; Гончарова и др., 2008 а]. Спектр aberrаций хромосом в группе больных детей не отличалось от обычного (сдвиг в пользу aberrаций хроматидного типа). Молекулярно-цитогенетическая диагностика методом FISH выявила микроделецию 7q11.23 у всех 9-ти пациентов, что позволило подтвердить клинический диагноз.

Параллельно на тех же образцах крови проводили анализ состояния генома с помощью метода ДНК комет. При этом был использован оригинальный экспериментальный дизайн, позволяющий выявлять определенные признаки дестабилизации генома [Гончарова и др., 2008 б]. Уровень эндогенных повреждений ДНК оценивали на 180-й мин инкубации интактных клеток; уровень H_2O_2 -индуцированных повреждений ДНК определяли на 0-й мин после обработки клеточной суспензии мутагеном. Кинетику элиминации индуцированных повреждений ДНК и эффективность репарации ДНК анализировали при отборе проб сразу и

через 15, 30, 60, 120 и 180 мин после окислительного стресса. Данные этого анализа представлены в таблице 2 и на рисунке (а, б).

Видно, что частота эндогенных и экзогенных повреждений ДНК у пациентов с СВ существенно превышает соответствующие значения в контроле (таблица 2). Кинетика (рис. а) и эффективность репарации ДНК (рис. б) у пациентов, за исключением конечной точки наблюдений, также достоверно отличается от контроля. Следует отметить, что кинетика элиминации индуцированных повреждений ДНК в течение 3-часовой инкубации клеток после окислительного стресса с высокой точностью описывается уравнением степенной зависимости ($R=0.98$ в обоих случаях). В логарифмических координатах (см. вставку на рис. а) соответствующие прямые имеют разные углы наклона, о чем свидетельствует также сравнение коэффициентов линейной регрессии (-0.204 для группы пациентов с СВ и -0.356 для контрольной группы). Статистически достоверные различия (при $P<0.05$) указывают на существенное замедление скорости репарации ДНК при СВ по сравнению с этим процессом в лимфоцитах здоровых доноров.

Результаты, полученные с помощью метода ДНК комет, выявляют нестабильность генома на уровне ДНК, то есть в какой-то мере противоречат данным анализа частоты аберраций хромосом и общепринятому мнению, что хромосомная нестабильность не характерна для этого синдрома. Тем не менее, эти результаты находят адекватное объяснение в свете последних данных литературы. Синдром Вильямса развивается на фоне локальной геномной нестабильности, затрагивающей определенный район 7-й хромосомы, которая (благодаря мутационному механизму или неравному кроссинговеру и внутривитрихромосомной рекомбинации в процессе мейоза) проявляется в утрате хромосомного материала, содержащего ряд сцепленных генов [Tassabehji, 2003; Bayés et al., 2003]. Еще в 1998 г. было показано, что в этой области локализован ген *WBSCR9* [Peoples et al., 1998; Lu et al., 1998], ответственный за специфический транскрипционный фактор, названный Williams syndrome transcription factor (WSTF). Но только недавно обнаружено, что WSTF является ключевым элементом двух независимых ремоделирующих хроматин комплексов (WINAC и WICH), поддерживающих архитектуру нуклеосом в процессе транскрипции, репликации и репарации ДНК. Оказалось, что комплекс WINAC осуществляет транскрипционную регуляцию развития тканей сердечно-сосудистой системы, тогда как WICH преимущественно задействован в репарации ДНК [Yoshimura et al., 2009; Oya et al., 2009]. Участие WSTF через WICH в репарации ДНК доказано экспериментально на эмбриональных фибробластах мышей, дефектных по этому фактору [Yoshimura et al., 2009]. Таким образом, повышенная чувствительность ДНК к повреждающим факторам эндогенного и экзогенного происхождения в лимфоцитах пациентов с СВ, по-видимому, вызвана замедлением и понижением эффективности репарации ДНК на начальных ее этапах, а компенсация репарационного процесса за счет подключения и активации других сигнальных путей может в конечном итоге свести формирование аберраций хромосом до «нормального» уровня.

ВЫВОДЫ

В рамках данного исследования с помощью нового подхода, основанного на применении метода ДНК комет, удалось выявить признаки дестабилизации генома у 9-ти пациен-

тов с подтвержденным диагнозом синдрома Вильямса. Установлены повышенный, по сравнению с контролем, уровень эндогенных повреждений ДНК и увеличенная чувствительность ДНК к окислительному стрессу, которые, вероятно, вызваны некоторым замедлением и снижением эффективности репарации ДНК на ее начальных этапах. Эти данные, с одной стороны, проливают свет на новые механизмы, вовлеченные в патогенез синдрома Вильямса, а с другой, показывают перспективность описанной технологии для выявления нестабильности генома при этом заболевании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гончарова Р.И., Савина Н.В., Смаль М.П., Кужир Т.Д., Политыко А.Д., Егорова Т.М., Хурс О.М. Анализ уровня аберраций хромосом, эндогенных повреждений ДНК и чувствительности генома к окислительному стрессу в лимфоцитах человека // Вести НАН Беларуси, сер. мед. наук. – 2008 а. – № 3. – С.77–85.

Гончарова Р.И., Кужир Т.Д., Савина Н.В., Смаль М.П. Индуцированная геномная нестабильность как фактор заболеваемости. Оценка целостности генома человека методом ДНК-комет // Сборник научных трудов «Молекулярная и прикладная генетика», 2008 б. – Т.7. – С. 86–93.

Егорова Т.М., Политыко А.Д. Динамика частоты аберраций хромосом у жителей г. Минска // Генетика и селекция на рубеже XXI века. Материалы конференции – Минск, 1999. – С. 193–195.

Хурс О.М., Политыко А.Д., Румянцева Н.В., Исакович Л.В., Кулак В.Д., Егорова Т.М., Наумчик И.В. Синдром Вильямса в Беларуси: молекулярно-цитогенетическое исследование и характеристика вариабельности фенотипических признаков // Сб. науч. трудов «Молекулярная и прикладная генетика», 2009. – Т.10. – С. 170–176.

Anderson D., Yu T.W., Phillips B.J., Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay // *Mutat. Res.* – 1994. – Vol. 307(1). – P.261–271.

Bayés M., Magano L.F., Rivera N., Flores R., Pérez Jurado L.A. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions // *Am. J. Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 73, № 1. – P. 131–151.

Collins A.R., Fleming I.M., Gedik C.M. In vitro repair of oxidative and ultraviolet-induced DNA damage in supercoiled nucleoid DNA by human cell extract // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – Vol. 1219(3). – P.724–727.

Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations // *Mol. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 26(3). – P.249–261.

Lu X., Meng X., Morris C.A., Keating M.T. A novel human gene, *WSTF*, is deleted in Williams syndrome // *Genomics.* – 1998. – Vol. 54(2). – P.241–249.

Martens M.A., Wilson S.J., Reutens D.C. Williams syndrome: a critical review of the cognitive, behavioral, and neuroanatomical phenotype // *J. Child Psychol. Psychiatry.* – 2008. – Vol. 49, № 6. – P. 576–608.

Nickerson E., Greenberg F., Keating M.T., McCaskill C., Shaffer L.G. Deletions of the elastin gene at 7q11.23 occur in approximately 90% of patients with Williams syndrome // *Am. J. Hum. Genet.* – 1995. – Vol. 56, № 5. – P. 1156–1161.

Oya H., Yokoyama A., Yamaoka I., Fujiki R., Yonezawa M., Youn M.Y., Takada I., Kato S., Kitagawa H. Phosphorylation of WSTF by MAPK induces a switching between two distinct chromatin remodeling complexes. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284(47). – P.32472–32482.

Peoples R.J., Cisco M.J., Kaplan P., Francke U. Identification of the *WBSCR9* gene, encoding a novel transcriptional regulator, in the Williams-Beuren syndrome deletion at 7q11.23 // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1998. – Vol. 82(3–4). – P.238–246.

Rautenstrauss B., Liehr T. FISH Technology // Springer Lab. Manual, 2001. – 494 p.

Shaffer L.G., Tommerup N. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2005): Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Switzerland: S. Karger. – 2005. – 132 p.

Stankiewicz P., Lupski J.R. Structural variation in the human genome and its role in disease // Annu. Rev. Med. – 2010. – Vol. 61:437–455.

Schubert C. The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome // Cell. Mol. Life Sci. 2009 – Vol. 66(7). – P.1178–1197.

Tassabehji M. Williams-Beuren syndrome: a challenge for genotype-phenotype correlations // Hum. Mol. Genet. – 2003. – Vol. 12. – P. 229–237.

Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing // Environ. Mol. Mutagen. – 2000. – Vol. 35(3). – P.206–221.

Wilson R.D., Blight C., Langlois S. Diagnosing chromosomal abnormalities from "big" to "small" with molecular cytogenetic technology // J. Obstet. Gynaecol. Can. 2009 Vol. 31(5):414–421.

Yeshaya J., Amir I., Rimon A., Freedman J., Shohat M., Avivi L. Microdeletion syndromes disclose replication timing alterations of genes unrelated to the missing DNA // Mol. Cytogenet. – 2009. – 2:11 (<http://www.molecularcytogenetics.org/content/2/1/11>).

Yoshimura K., Kitagawa H., Fujiki R., Tanabe M., Takezawa S., Takada I., Yamaoka I., Yonezawa M., Kondo T., Furutani Y., Yagi H., Yoshinaga S., Masuda T., Fukuda T., Yamamoto Y., Ebihara K., Li D.Y., Matsuoka R., Takeuchi J.K., Matsumoto T., Kato S. Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit, Williams syndrome transcription factor (WSTF). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106(23). – P.9280–9285.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ

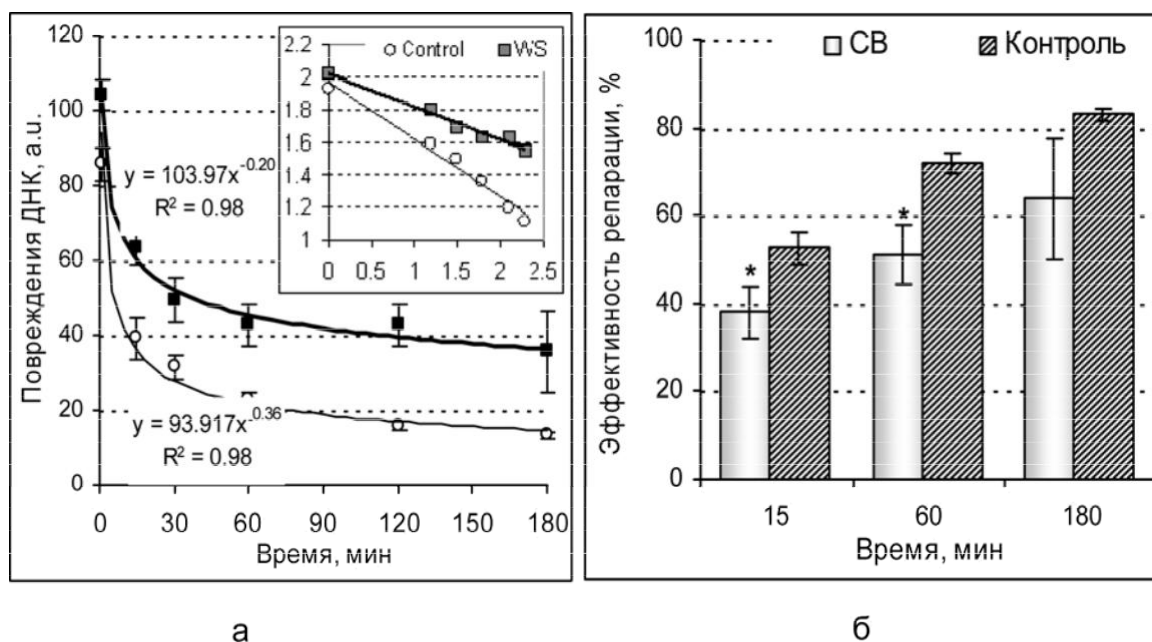


Рисунок. Кинетика (а) и эффективность (б) репарации ДНК у пациентов с СВ (WS) по сравнению с контролем (control)

а) Достоверные различия между точками при $P=0.004$, $P=0.004$, $P=0.029$, $P=0.003$ и $P=0.006$ соответственно 0, 15, 30, 60, и 120 мин наблюдений; б) достоверные различия при $P<0.05$ отмечены звездочкой

Таблица 1. Частота и спектр спонтанных aberrаций хромосом у пациентов с СВ

Номер / код	Количество метафаз	Частота, %		Типы aberrаций, %	
		Аберрантных клеток	aberrаций хромосом	хромосомный	хроматидный
Контроль	2000	2.50±0.35	2.50±0.35	0.75±0.19	1.75±0.29
1/495	200	3	3	0.5	2.5
2/564	100	2	2	0	2
3/565	100	3	3	0	3
4/592	100	3	3	1	2
5/601	100	6*	6*	2	4
6/611	100	5	5	0	5
7/644	100	4	4	1	3
8/673	100	4	4	1	3
9/677	100	5	5	2	3
Total	1000	3.50±0.58*	3.50±0.58*	0.80±0.28	3.0±0.54

* Показатели статистически отличаются от контроля при $P < 0.05$ по точному критерию Фишера

Таблица 2. Уровни эндогенных и экзогенных повреждений ДНК в лимфоцитах пациентов с СВ по сравнению с данными, полученными в контрольной группе здоровых доноров

Группы	Количество обследованных	Эндогенные повреждения ДНК, а.у.	Повреждения ДНК, индуцированные H_2O_2 , а.у.	
		180 min	0 min	180 min
Контроль	37	9.13±0.79	85.63±4.38	13.32±1.07
СВ	9	22.86±5.28*	103.83±4.12*	35.75±10.96

* Существенные различия между группой СВ и контролем при $P < 0.05$ по t-критерию Стьюдента.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ ЛЮДЕЙ К РАДИАЦИОННЫМ И ХИМИЧЕСКИМ ЭФФЕКТАМ: АНАЛИЗ СОБСТВЕННЫХ ДАННЫХ И ДАННЫХ

ЛИТЕРАТУРЫ Тельнов В.И.

Южно-Уральский институт биофизики
г. Озерск, Озерское шоссе, 19
Тел. (35-130) 7-58-52, e-mail: tvi@subi.su

РЕЗЮМЕ: На основе собственных данных и данных литературы представлены результаты молекулярно-эпидемиологического анализа риска неблагоприятных последствий облучения и курения у профессиональных работников и населения. Рассматривается радиационный и химический риск у людей с чувствительными генотипами, в том числе после радиохимиотерапии, его особенности в зависимости от интенсивности действующего фактора. Особое внимание обращено на характер взаимодействия генетических и средовых факторов. Показано, что особенностью совместного действия генетических факторов, с одной стороны, и радиационных или (и) химических факторов, с другой стороны, является их взаимодействие, как правило, превышающее мультипликативное.

Ключевые слова: детерминированные (неопухолевые) и стохастические (опухолевые) эффекты, радиационное и химическое воздействие, генетический полиморфизм, генетические маркеры, взаимодействие генетических и средовых факторов, относительный риск.

Key words: deterministic (non-tumor) and stochastic (tumor) effects, radiation and chemical impact, genetic polymorphism, genetic markers, interaction of genetic and environmental factors, relative risk.

Известно, что при воздействии неблагоприятных факторов внешней среды не у всех индивидов, подвергшихся такому воздействию, развиваются нарушения или заболевания. Это обстоятельство в общем плане является отражением неодинаковых индивидуальных особенностей индивидов. Значительный вклад в индивидуальные особенности организма вносят генетические факторы, определяющие генетическую предрасположенность к развитию неблагоприятных последствий воздействия факторов внешней среды [3, 4].

Особое внимание в этом отношении привлекают наследственные факторы, имеющие стабильные характеристики. К их числу прежде всего относятся генетические полиморфные системы, которые остаются неизменными на протяжении всей жизни. Как известно, около 30% генов в геноме человека являются полиморфными, то есть представлены двумя и более аллелями [1]. Многочисленные исследования свидетельствуют о важной роли генетической предрасположенности в развитии широкого спектра патологии и неблагоприятных эффектов под влиянием факторов различной природы [2, 29]. Данное направление исследований в широком смысле относится к экологической генетике человека. Проблема генетической гетерогенности населения и её использование для оценки радиационного и химического риска в последнее время стала предметом изучения ряда исследований [14]. Однако обобщающие данные по этой проблеме у человека весьма ограничены. Целью настоящей работы явилось обобщение собственных результатов и мета-анализ данных литературы. Мета-анализ широко используется во многих областях современной медицины, так как предусматривает оценку данных литературы с единых методологических позиций [17].

Для проведения работы были использованы данные молекулярно-генетического обследования – определения ряда генетических маркеров - генотипов гаптоглобина, группоспецифического компонента и групп крови АВО у 985 работников ПО «Маяк», а также результаты обследования лиц, подвергшихся радиационному воздействию при радиационных инцидентах, в том числе аварии на Чернобыльской АЭС, опубликованные в литературе в

последнее время. Кроме того, на данных основе литературы были оценены риски стохастических эффектов при радиохимиотерапии и курении. Характеристика исследованных генетических полиморфных систем представлена в таблице 1.

Для количественной оценки степени выраженности радиационных и химических эффектов у людей с разными генотипами рассчитывали относительный риск (ОР) [5]. Также оценивали взаимодействие генетических и неблагоприятных факторов в развитии эффектов [20]. При этом выделяли два основных вида взаимодействия: аддитивное и мультипликативное, то есть суммирование и произведение относительных рисков факторов соответственно.

Детерминированные (неопухолевые) эффекты. Достоверно повышенный риск детерминированных эффектов облучения острой и хронической лучевой болезни, лучевого дерматоза, раннего церебрального атеросклероза, хронического гастрита, хронического гепатита и цирроза печени, увеличения доли лиц с генотипом гаптоглобина 2-2 среди потомков родителей с преконцепционной суммарной дозой внешнего гамма-облучения более 2,0 Гр установлен для носителей радиочувствительных генотипов. Полученные данные свидетельствуют о том (таблица 2), что у облученных людей с радиочувствительными генотипами: относительный риск изученных радиационных эффектов колеблется в пределах от 1,5 до 6,7 (среднее значение составило 3,3). Следует отметить, что в случаях повышенного риска раннего церебрального атеросклероза и хронического гастрита у носителей генотипов Нр 2-1 и 2-2 частота данных генетических маркеров достигает 86,6%, т. е. по существу соответствует уровню популяции. В целом полученные результаты свидетельствуют о достаточно высоком риске радиационных эффектов у людей с радиочувствительными генотипами, что в конечном счете проявляется на популяционном уровне.

Анализ роли исследованных генотипов в развитии детерминированных радиационных эффектов показал, что в рамках отдельной генетической системы можно выделить лишь относительно наиболее радиочувствительные генотипы, поскольку каждый из них в разной степени может обуславливать генетическую предрасположенность к различным радиационным эффектам.

Результаты оценки взаимодействия факторов радиационной и генетической природы свидетельствуют о том, что ведущим видом их взаимодействия является мультипликативное. Существенное значение в реализации генетической предрасположенности к радиационным эффектам у людей имеет и то обстоятельство, что последняя наиболее выражена при действии *минимальных эффективных* доз облучения. Основанием для такого вывода являются полученные данные о наибольших значениях относительного риска хронической лучевой болезни для генетической системы Нр (радиочувствительный генотип Нр 2-2) при относительно меньших дозах облучения (таблица 3).

Стохастические (опухолевые) эффекты. Достоверно повышенный риск стохастических эффектов облучения – злокачественных новообразований – установлен у носителей радиочувствительных генотипов для ряда генетических полиморфных систем. Полученные данные свидетельствуют о том (таблица 4), что у облученных людей с радиочувствительными генотипами ОР стохастических эффектов колеблется в пределах от 1,25 до 3,5 (среднее значение составило 1,6). В целом полученные результаты свидетельствуют о достаточно высоком риске стохастических эффектов у людей с радиочувствительными генотипами, что в конечном счете, как и в случае детерминированных эффектов, проявляется на популяционном уровне.

Важное значение генетическая предрасположенность имеет и в случае развития стохастических эффектов у людей после радиохимиотерапии по медицинским показаниям. Как видно из таблицы 5, среди людей с радиочувствительными генотипами, получивших радиохимиотерапию по поводу злокачественных новообразований, в дальнейшем наблюдается повышенный риск лейкоза, рецидивов опухолевых заболеваний и повышенной радиочувствительности.

Результаты оценки взаимодействия факторов радиационной и генетической природы при развитии стохастических эффектов свидетельствуют о том, что ведущим видом их взаимодействия, также как и в случае детерминированных эффектов, является мультипликативное.

Таким образом, результаты оценки совместного действия генетических и радиационных факторов, как в случаях детерминированных, так и в случаях стохастических эффектов, свидетельствуют о том, что в подавляющем большинстве случаев генетические факторы, то есть радиочувствительные генотипы, при отсутствии радиационного воздействия или, более того, при относительно меньших дозах облучения (ОРг), не проявляют своего неблагоприятного действия. При этом относительный риск радиационного воздействия (ОРр) или относительно большей дозы облучения по сравнению с меньшей дозой был достоверно повышен по сравнению с отсутствием облучения или меньшей дозой облучения.

Тот факт, что относительный риск совместного действия генетического и радиационного факторов (ОРгр) во всех случаях был достоверно повышенным, очевидно указывает на то, что генетическая предрасположенность к радиационным эффектам в значительной степени определяется ведущим значением в их развитии радиационного воздействия. Следовательно, генетическая предрасположенность людей к неблагоприятным последствиям радиационного воздействия имеет определенные относительные ограничения, но тем не менее оказывает существенное влияние на их развитие.

Гены, курение и рак легкого. Выше при анализе хронической лучевой болезни отмечалось, что генотипические различия относительных рисков данной профессиональной па-

тологии были максимальны при относительно меньшем радиационном воздействии (см. таблицу 3). В связи с этим был проведен анализ относительного риска рака легкого у людей с чувствительными генотипами относительно резистентных генотипов при разной интенсивности курения (таблица 6).

Как известно, курение является ведущей причиной развития рака легкого у современных людей. При этом вклад курения в развитие рака легкого является основным даже у облученных людей. Результаты анализа подтверждают, что при меньшей интенсивности действующего фактора, в частности курения, наблюдается наибольший относительный риск рака легкого у людей с чувствительными генотипами относительно резистентных. При этом в целом относительный риск рака легкого повышается с увеличением интенсивности курения.

Таким образом, генотипические различия людей в реакциях на воздействие неблагоприятных факторов не имеют абсолютного значения. Вследствие этого данные механизмы максимальны при малых эффективных воздействиях, уменьшаются при относительно больших и не имеют существенного значения при значительных.

Заключение. Результаты оценки генетической предрасположенности к эффектам облучения на основе оценки относительного риска у людей свидетельствуют о достаточно высоком риске радиационных эффектов у лиц с радиочувствительными генотипами, что в конечном счете проявляется на популяционном уровне. Анализ роли генетических маркеров в развитии радиационных эффектов показал, что в пределах той или иной генетической системы можно выделить отдельные относительно наиболее радиочувствительные маркеры, поскольку каждый из них в разной степени может обуславливать генетическую предрасположенность к различным радиационным эффектам. Особенностью совместного действия генетических и радиационных факторов является их взаимодействие, превышающее мультипликативный эффект. Существенное значение в реализации генетической предрасположенности к радиационным эффектам у людей имеет и то обстоятельство, что последняя наиболее выражена при действии минимальных эффективных доз облучения. Это заключение справедливо и для действия нерадиационных факторов, в частности курения. Очевидно, в общем плане можно думать о том, что генетические механизмы, определяющие различия людей в реакциях на воздействие неблагоприятных факторов, не имеют абсолютного значения. Вследствие этого данные механизмы максимальны при малых эффективных воздействиях, уменьшаются при относительно больших и не имеют существенного значения при значительных.

Таким образом, генетико-эпидемиологический подход к оценке риска неблагоприятных последствий радиационного и химического воздействия позволяет выявлять генетические маркеры предрасположенности людей к повышенному риску, оценивать совместный

вклад генетической компоненты и неблагоприятных воздействий в реализацию радиационных и химических эффектов, проводить сравнение отдельных генетических маркеров для развития этих эффектов у людей, а также оценивать степень выраженности отдельных эффектов при данных условиях облучения с учетом генетической предрасположенности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях: Учебное пособие. 3-е изд.- М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. 431с.
2. Зарецкая Ю.М. Клиническая иммуногенетика. М.: Медицина, 1984. 206 с.
3. Спицын В.А., Новорадовский А.Г. Перспективы развития экологической генетики человека // Антропология медицине / Под ред.Т.И. Алексеевой.- М.: Изд.-во МГУ, 1989. С.37-52.
4. Спицын В.А., Макаров С.В., Пай Г.В., Бычковская Л.С. // Медицинская генетика.- 2006. Т.4. №10. С.446-453.
5. Флейс Дж. Статистические методы для изучения таблиц долей и пропорций.- М.: Финансы и статистика, 1989. 319 с.
6. Чумак А.А., Базыка Д.А., Беляева Н.В. и др. // Международный журнал радиационной медицины. 2000. Т.1. №5. С.65-82.
7. Allan J.M., Wild Ch.P., Rollinson S. et al. // PNAS. 2001. V.98. №20. H.11592-11597.
8. Angele S., Romestaing P., Moullan N. et al. // Cancer research. 2003. V.60. P. 8717-8725 .
9. Beckman L., Beckman G., Cedergren B. et al. // Hum. Hered. 1985. V. 35. № 1. P. 89-94.
10. Beckman L., Nordenson I. // Hum. Hered. 1988. V. 38. № 1. P. 56-58.
11. Bonner M.R., Bennett W.P., Xiong W. et al. // Int. J. Cancer, 2006, v. 119, P.1462-1467
12. Duell E.J., Millikan R.C., Pittman J.S. et al. // Cancer Epidemiol, Biomarkers, Prev. 2001. V. 10. №3. P.217-222.
13. Fan R., Wu M.-T., Miller D. et al. // Cancer Epidemiol, Biomarkers, Prev. 2000. V.9. P.1037-1042.
14. Genetic susceptibility to cancer ICRP Publication 79 // Annals of the ICRP. 1998. V.28. Issues 1-2. P.1-157.
15. Han J., Colditz G.A., Liu J.S., Hunter D..J. // Cancer Epidemiol, Biomarkers, Prev. 2005. V. 14. №6. P. 1539-1544.
16. Hu L.L., Wain J.C., Miller D.P. et al. // Cancer Epidemiol, Biomarkers, Prev. 2001. V.10. P.303-309 .
17. Hu Z., Wei Q., Wang X., Shen H. // Lung Cancer. 2004. V.46. №1. P.1-10.
18. Hung R.J., Boffetta P., Canzian F. et al. // Cancer Res. 2006. V.66. №16. P.8280-8286.
19. Ito H., Matsuo K., Hamajima N. et al. // Carcinogenesis. 2004. V.25. №8. P.1395-1401.
20. Khoury M.J. Flanders W.D. // Am. J. Epidemiol. 1996.V.144. №3. P.207-213.
21. Li G., Wang Li-E., Chamberlain R.M. et al. // Cancer Research. 2001. V.61. P.7825-7829.
22. Marin M.S., Lopez-Cima M.F., Garcio-Castro L. Et al. // Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev. 2004. V.13. №11. P.1788-1793.
23. Millikan R.C., Player J.S., de Cotret A.R. et al. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2005. V. 14. №10. P. 2326-2334.
24. Nakachi K., Imai K., Hayashi Sh., Kawajiri K. // Cancer Research. 1993. V.53. P.2994-2999.
25. Naoe T., Takeyama K., Yokozawa T. et al. // Clin. Cancer Research. 2000. V.6. P.4091-4095.
26. Perera F.P., Mooney La V.F. Stampfer M. et al. // Carcinogenesis. 2002. V.23. №10. P. 1641-1646.
27. RN Zarate R., Arias F., Banderes E. et al. // World J. Gasroenterol. 2006. V.12. №37. P. 6032-6036.
28. Sadetzki S., Flint-Richter P., Starinsky S. et al. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2005. V.14. № 4. P.969-976.
29. Schwain B.K., Talukder G., Sharma A. // Med. Biol. 1980. V. 58. № 5. P. 246-263.
30. Seedhouse C., Bainton R., Lewis M. et al. // Clin. Cancer Reaarch. 2004. V.10. P.2675-2680.
31. Song N., Tan W., Xing D., Lin D. // Carcinogenesis. 2001. V.22. №1. P.11-16.

32. Sugimura H., Wakay K., Genka K. et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1998. V.7. P. 413-417.
33. To-Figueras J., Gene M., Gomez-Catalan J. et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1996. V.5. №5. P.337-342.
34. Zhaug X., Miao X., Liang G. et al. // *Cancer Research.* 2005. V.65. №3. P.722-726.
35. Zhou W., Liu G., Miller D.P. et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2003. V.12. P.359-365.
36. Zhu Y., Spitz M.R., Lei L. et al. // *Cancer Research.* 2004. V.64. P.6863-6866.
37. Wu X., Shi H., Jiang H. et al. // *Carcinogenesis.* 1998. V.19. №1. P.93-98.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ:

Таблица 1 – Характеристика генетических полиморфных систем

ABO	Группы крови ABO
ATM	Гены репарации ДНК
C3	C3-компонент комплемента
CCND1	Ген, регулятор клеточного цикла
CDKN2A	Ген, регулятор клеточного цикла
CYP1A1	Цитохром p4501A1
DSB гены	Гены, репарирующие двойные разрывы ДНК
E-kadherin	Ген, регулирующий клеточный цикл
Gc	Группоспецифический компонент
GSTP1	Ген детоксикации ксенобиотиков
GSTT1	Ген детоксикации ксенобиотиков
HLA	Система тканевой совместимости человека - Human Leukocyte Antigen
HLA-A	Антигены гистосовместимости сублокуса HLA-A
HLA-Bw	Антигены гистосовместимости сублокуса HLA-B
HLA-DR	Антигены гистосовместимости сублокуса HLA-DR
Hr	Гаптоглобин
Ki-ras	Ген, регулирующий клеточный цикл
NF2	Ген, связанный с развитием нейрофиброматоза
NQO1	Ген детоксикации ксенобиотиков
RAD51	Ген, участвующий в репарации ДНК
TfC	Трансферрин С
TP53	Ген, регулятор клеточного цикла
XPD	Ген репарации нуклеотидов ДНК
XRCC 1-5	Гены репарации ДНК

Таблица 2 – Относительный риск детерминированных радиационных эффектов у облученных людей с радиочувствительными генотипами

Эффекты	Дозы внешнего гамма-облучения (Гр) или инкорпорация плутония-239 (кБк)	Генетические системы (I) и радиочувствительные генотипы (II)		ОР
		I	II	
Хроническая лучевая болезнь	0,7-4,0 Гр	Нр:	Нр 2-2	2,0
Ранний церебральный атеросклероз	>4,0 Гр	Нр:	Нр 2-1, Нр 2-2	2,7
		ABO:	B(III), AB(IV)	4,2
Хронический гастрит	>4,0 Гр	Нр:	Нр 2-1, Нр 2-2	2,4
		ABO:	0(I), A(II)	2,7
Хронический гепатит или (и) цирроз печени	>3,7 кБк	Нр:	Нр 1-1, Нр 2-2	2,9
Лучевой дерматоз [9]	1 Гр	TfC:	C2-1, C2-2	4,1
		C3:	FS	2,6
Острая лучевая болезнь [6]	> 1 Гр острого облучения	HLA:	A10, A28	2,8
			Bw: 16,35, 38	4,1
		DR 3	3,7	
		Нр:	Нр 2-2	6,7
В среднем по всем генетическим системам:				3,4

Таблица 3 – Относительный риск хронической лучевой болезни у людей с генотипом гаптоглобина 2-2 в зависимости от дозы облучения

Генотипы Нр	Суммарные дозы внешнего гамма-облучения, Гр		
	0,7-1,0	1,01-4,0	>4,0
Нр 2-2 против Нр 1-1 и Нр 2-1	2,7	1,9	1,0

Таблица 4 – Относительный риск стохастических эффектов у облученных людей с чувствительными генотипами

Стохастические эффекты	Характеристика облучения	Генетические системы: радиочувствительные генотипы против (vs) радиорезистентных	ОР
1. Международное европейское исследование рака легкого [18]	Рентгенография грудной клетки (1-40 процедур)	CCND1 (G870A): AA vs GA, GG	1,2
		Trp53 интрон 3: A2A2 vs A1A1, A1A2	2,1
		CDKN2A (A148T): AA	1,2*
2. Рак легкого [11]	Радон > 121 Бк, м ³	GSTM1, (0) vs (+)	3,5
3. Менингиома [28]	Лучевая терапия: 1-6 Гр на область го-	NF2 (Rs731647): TT vs AT, AA	1,8*

	ловы	Ki-ras (Rs9966): CT vs CC, TT	1,5*
		E-kadherin (Rs2010724): AG vs AA, GG	1,4*
4. Рак молочной железы [23]	>5 маммографий	DSB genes: 2-4 варианта vs 0-1 варианта	1,25*
5. Рак молочной железы [12]	Рентгенологи, вспомогательный персонал	XRCC1 (codon 399): Arg/Arg vs Arg/Gln, Gln/Gln	1,4*
6. Меланома [15]	Интенсивное УФО-облучение:	XPD (Lys757Gln): Lys/Lys vs Lys/Gln, Gln/Gln	1,8
		XPD (Asp312Asn): Asp/Asp vs Asp/Asn, Asn/Asn	1,5*
		В среднем	1,6

Таблица 5 – Относительный риск стохастических эффектов у людей с чувствительными генотипами после предшествующей радиохимиотерапии (PXT)

Генетические системы: радиочувствительный генотип против (vs) радиорезистентных	ОР спонтанного лейкоза	ОР PXT-индуцированного лейкоза
XRCC1 (codon 399): Arg/Arg vs Arg/Gln, Gln/Gln [30]	1,4	2,5
RAD51: g/c, c/c vs g/g [30]	1,7	2,6
GSTT1: 0-вариант vs (+)-варианта [7]	1,5	1,7
GSTP1: Ile/Val, Val/Val vs Ile/Ile [7]	1,0	1,6
NQO1: Ser/Ser vs Pro/Pro, Pro/Ser [25]	1,5	2,7
Все:	1,4	2,2
ОР рецидива рака желудка		
XPD: Lys/Lys vs Lys/Gln, Gln/Gln [27]		6,0
ОР радиочувствительности		
ATM variants G5557A: AA vs AG, GG [8]		5,5

Таблица 6 – Относительный риск рака легкого у людей с чувствительными генотипами относительно резистентных при разной интенсивности курения

Генетические Системы	Чувствительные генотипы против (vs) резистентных ге- нотипов	Интенсивность курения		Литера- тура
		Меньше	Больше	
		Относительный риск		
1. p4501A1	C vs A и B	7,6	1,2	[24]
2. GST1	(0) vs (+)	2,5	1,3	“-
3. CYP1A1	Val/Val vs других	7,4	1,2	“-
4. ADPRT	Ala/Ala vs других	1,3	2,0	[34]

5. ADPRT	AB,BB vs AA	7,1	1,7	[37]
6. XRCC1 (codon 399)	Gln/Gln vs других	1,5	0,7	[35]
7. GSTM1	0//+	1,8	1,4	[33]
8. CYP1A1	Val/Val vs других	7,2	2,2	[32]
9. APE1 (Asp148Glu)	Glu/Glu vs других	2,7	1,2	[19]
10. XRCC1 (codon 399)	Gln/Gln vs других	1,9	1,8	-“-
11. CYP1A1 m1	w1/m1/+m1/m1 vs w1/w1	1,6	1,7	[31]
12. CYP2E1	c1/c2+c2/c2 vs c1/c1	4,1	3,7	-“-
13. p53	Arg/Pro+Pro/Pro vs Arg/Ar	1,4	1,2	[13]
14. GSTM1	(0) vs (+)	2,3	1,1	-“-
15. GSTP1	Ile/Val, Val/Val vs Ile/Ile	1,9	1,4	[26]
16. XPC-PAT	+/+ vs -/-, -/+	2,4	1,0	[22]
17. NQO1	TT vs TC, CC	2,0	0,8	[16]
18. mmp-1	2G/2G vs 1G/1G, 1G/2G	1,6	2,1	[36]
19. p73 (G4C14-to-A4T14)	GC/GC, AT/AT vs AT/GC	1,6	1,3	[21]
Все:		3,1	1,5	

ИННОВАЦИОННЫЕ МЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ОРГАНИЗАЦИИ ЛАБОРАТОРИИ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Тоцкая Е.Г., Поспелова Т.И.

АНО «Региональный Центр Высоких Медицинских технологий»
630008 Новосибирск, ул. Кирова, 113
Тел. (383) 271-12- 03, gema@hmt.ru

РЕЗЮМЕ: В статье отражены актуальные вопросы комплексной диагностики онкологических, онкогематологических заболеваний с использованием возможностей современных молекулярно-биологических, генетических методов и привлечением инновационных медико-организационных технологий.

Ключевые слова: комплексная диагностика, онкология, медико-организационные инновации

SUMMARY: The paper reflects up-to-date issues of complex diagnosis of oncological and onco-haematological diseases using facilities of modern molecular biological and genetic techniques, with application of innovational organizational technologies.

Key words: complex diagnosis, oncological diseases, innovational organizational technologies

Рост онкологической заболеваемости во всем мире и в Российской Федерации обусловил необходимость поиска внутриклеточных мишеней для лечения рака, появление новых молекулярно-биологических технологий воздействия на злокачественные опухоли, динамичное развитие фармацевтического рынка таргетных противоопухолевых препаратов (по данным Европейского общества гематологов ЕНА, Копенгаген, 2008). Основанием для их назначения является определение наличия доступной молекулярно-генетической мишени.

Точная диагностика новообразования на молекулярном и генетическом уровне – условие успеха таргетной противоопухолевой терапии [2, 5].

Молекулярные диагностические технологии – важнейший путь инновационного развития онкологии и онкогематологии. Они являются наиболее наукоемкими и востребованными в медицине, к их внедрению проявляют интерес крупные фармацевтические компании, производители лекарственных средств направленного действия [6, 7]. Целью поддержки ведущими фармацевтическими компаниями качественных диагностических технологий является раннее выявление максимального числа пациентов с показаниями к назначению препаратов. Организация крупных высокотехнологичных лабораторий, построенных на принципах междисциплинарных взаимодействий, обслуживающих сеть лечебных учреждений, а также обеспечение многоуровневого референса, являются залогом качественной диагностики. Подобные проекты соответствуют общемировым тенденциям [1].

Расчет потребности в медицинских услугах по высокотехнологичной морфологической и молекулярно-биологической диагностике в городах Сибирского федерального округа (25 млн. жителей), основанный на данных первичной заболеваемости (250 - 300 больных на 100 тыс. населения в год – опухоли, 1,0-1,5 тыс. человек на 100 тыс. населения в год - предопухолевые состояния, 4-5,5 тыс. на 100 тыс. населения в год - реактивные изменения), показал, что в данных услугах нуждаются порядка 1,5-2 млн. человек ежегодно. По данным статистики, за год в ЛПУ Новосибирска проводят около 200 тысяч операционных и пункционных биопсий. Доминируют низкотехнологичные методы исследования этого материала, при этом в 10-25% случаев остается неизвестным или сомнительным вариант опухолевого процесса. В настоящее время в регионе нет ни одной лаборатории, владеющей всем комплексом технологий морфологической и молекулярной диагностики опухолей. Основной причиной такой ситуации является многолетняя традиция остаточного принципа финансирования и недостаток квалифицированных кадров в диагностическом звене. Отсутствие комплексного этапного подхода к диагностике онкологических, гематологических, онкогематологических заболеваний, персональной ответственности за качество и достоверность результатов обследований, взаимосвязи и взаимодействия клинического и диагностического этапов в ведении данной группы пациентов (разрозненность специалистов различных уровней и направлений в решении проблем пациентов по диагностике и контролю качества лечения значимой патологии) – актуальные медико-социальные проблемы сегодняшнего дня [1, 3, 4].

Вышеозначенные предпосылки явились стимулом к мобилизации усилий по созданию на медицинском рынке Сибирского Федерального Округа структуры, выполняющей морфологические, молекулярно-биологические диагностические и научные исследования, оказывающей консультативно-методические услуги. В качестве способа решения проблемы была

предложена реализация проекта создания региональной лаборатории морфологической и молекулярно-биологической диагностики опухолевых заболеваний и патологии крови с использованием инновационных медико-организационных подходов. Основным принципом организации лаборатории стало объединение методов морфологического, генетического и молекулярно-биологического исследований в единую технологическую линейку в рамках единой лаборатории с комиссионным принципом подготовки заключения о диагнозе. Модель организации предусматривает использование технологий от базовых через специальные к эксклюзивным и высокотехнологичным. Для решения задач клиники интегрируются ведущие специалисты различных профилей, реализуя междисциплинарный подход. В 2009 году сформировался необходимый комплекс условий для организации в Новосибирске высокотехнологичной региональной референс-лаборатории морфологической и молекулярно-биологической диагностики опухолей, предопухолевых заболеваний и патологии крови.

На предпроектном этапе, предшествующем открытию лаборатории, обследованы более 3,5 тыс. человек (опыт производства и реализации услуг по иммуноморфологической диагностике с 2000 года), создан коллектив эксклюзивных специалистов, сформирована сеть ЛПУ-партнеров в городе, Новосибирской области и Сибирском Федеральном Округе, налажены устойчивые связи с корпоративными клиентами (фармацевтические компании – производители препаратов направленного действия), получено дорогостоящее оборудование и реактивы. Была сформирована концепция развития и найдена модель лаборатории с учетом опыта ведущих зарубежных клиник, в частности «Зеркальная» лаборатория, ее аналог – лаборатория диагностики опухолей клиники Барселонского университета. Центр обеспечен методической поддержкой ведущих гематологических и онкологических центров Москвы, Санкт-Петербурга, кафедр Новосибирского и Барнаульского медицинских университетов, главных специалистов Департаментов здравоохранения городского и областного уровней, финансовой поддержкой государственных структур, государственных внебюджетных фондов.

Анализ состояния рынка медицинских услуг в СФО позволяет с высокой долей уверенности прогнозировать высокую востребованность диагностических услуг по высокотехнологичной морфологической и молекулярно-биологической диагностике и окупаемость проекта с коммерческой точки зрения. Динамика развития современных лечебных подходов в клинической практике и научных исследований в области таргетной терапии злокачественных новообразований гарантирует устойчивый рост спроса на данные услуги в перспективе.

Важным аспектом в представленной инновационной модели высокотехнологичной диагностической медицинской помощи является возможность включения образовательной и научной составляющей при поэтапной реализации проекта, создание на базе лабораторий центров профессионального обучения и стажировки медицинских кадров, разработка инно-

вационных научных идей. Предложенная модель предлагает новый способ комплексного решения задач, характерных для учреждений различного профиля и уровня (лечебных, научных, образовательных) в рамках одной структуры. Формируется качественно новый подход к организации работы сотрудников – через создание эффективно работающих коллективов врачей и исследователей, формирование точек «инновационного роста» в здравоохранении и медицинской науке (наличие устойчивых мотивационных модулей сотрудников, успешная деятельность которых должна сформировать научно-практические школы с принципиально новой методологией). Маневренность и устойчивость на рынке обеспечивается многоканальностью финансирования: средства государственного бюджета, государственных внебюджетных фондов, частных инвесторов.

Создание инновационного высокотехнологичного учреждения здравоохранения, устойчиво функционирующего на рынке медицинских услуг, позволит комплексно в короткие сроки, с высоким качеством решать проблемы диагностики серьезной патологии (гематологические, онкогематологические, онкологические заболевания) при соблюдении принципов социальной справедливости (усредненная цена исследований для различного объема и степени сложности применяемых медицинских технологий), биоэтических и правовых норм на пространстве взаимодействия пациента с системой оказания медицинской помощи (доступность высокотехнологичных методов диагностики для широких масс населения, реализация права выбора поставщика медицинской услуги), предоставит возможность участия государственных структур в решении проблем социально незащищенных слоев населения через системы ОМС и ДЛО. Реализация проекта обеспечит решение актуальных для Российского здравоохранения задач внедрения и реализации принципов доказательной медицины в практику, будет способствовать внедрению принципов менеджмента качества в здравоохранении, обеспечит продвижение инновационных медицинских и организационных технологий в отечественном здравоохранении, что соответствует «Концепции развития здравоохранения и медицинской науки Российской Федерации до 2020 года».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева И.Л., Абрамова И.Ю. К вопросу организации центров современных медицинских технологий в субъектах федерации / Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – № 4. – С. 217-219.
2. Антонов В.Г. Патогенез онкологических заболеваний: иммунные и биохимические феномены и механизмы. Внеклеточные и клеточные механизмы общей иммунодепрессии и иммунорезистентности / В.Г. Антонов, В.К. Козлов / Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 8-19.
3. Концепция развития здравоохранения и медицинской науки РФ до 2020 года.
4. Кочемасов В.В., Саутина В.О. Организация и координация научных исследований на современном этапе // Трансфузиология. – 2007. – Т.8. – № 1-2. – С. 26.
5. Fujii T., Yokoyama G., Takahashi H. et al. // Breast Cancer. – 2008. – Vol. 15, № 1. – P. 73-78
6. Rizzo et al. // Blood. – 2008a. – Vol.111. – P. 25-41.
7. Rizzo et al. // J. Clin. Oncol. – 2008b. – Vol.26. – P. 132-149.

НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ФАКТОРЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ НАРУШЕНИЯ РЕ-ПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ СУПРУЖЕСКОЙ ПАРЫ

Фетисова И.Н.

ФГУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»
153045 Иваново, ул. Победы, д.20
Тел.: (4932) 33-62-63; e-mail: ivgenlab@gmail.com

РЕЗЮМЕ: Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей полиморфизма генов главного комплекса гистосовместимости HLA II класса (*DRB1*, *DQA1*, *DQB1*); фолатного обмена (гены 5,10-метилентетрагидрофолат-редуктазы *MTHFR* и метионин-синтазы-редуктазы *MTRR*) и системы детоксикации (гены семейства глутатион-S-трансфераз *M1*, *T1* и *P1*) в семьях с нормальной репродуктивной функцией, в супружеских парах с первичным бесплодием и первичной привычной потерей беременности ранних сроков. Проведенное исследование позволило определить маркеры предрасположенности к первичному бесплодию и первичной привычной потере беременности ранних сроков в генах системы HLA II класса, фолатного цикла и семейства глутатион-S-трансфераз. Установлена ассоциация между наличием в генотипе женщины низкофункциональных аллелей в генах *MTHFR* и *MTRR*, аллелей *DQA1* 0401, *DQB1* 0401, гаплотипа *DQA1-DQB1* 0401-0401 и развитием первичной привычной потери беременности ранних сроков. Показано, что присутствие в генотипе мужчины низкофункциональных аллелей в генах семейства глутатион-S-трансфераз (*M1*, *T1*, *P1*) является фактором риска снижения фертильности и развития первичного бесплодия в супружеской паре.

Ключевые слова: первичное бесплодие, привычная потеря беременности, наследственная предрасположенность, гены системы детоксикации, гены фолатного обмена, главный комплекс гистосовместимости, полиморфизм

SUMMARY: The aim of this study was investigation of polymorphisms of HLA II class genes (*DRB1*, *DQA1*, *DQB1*), genes of folate metabolism (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*), and detoxication genes (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) in couples with normal reproduction, primary infertility and recurrent pregnancy loss. We revealed genetic markers of predisposition for different types of reproductive disorders. Low-functional alleles in *MTHFR* and *MTRR*, *DQA1* 0401, *DQB1* 0401 and haplotype *DQA1-DQB1* 0401-0401 in women's genotype were associated with early pregnancy loss. Presence of low-functional alleles in *GSTs* in men's genotype was considered as risk factors for subfertility and primary infertility in couple.

Key-words: primary infertility, recurrent pregnancy loss, hereditary predisposition, genes of detoxication, genes of folate metabolism, major histocompatibility complex

Исследование роли генетических факторов при различных формах нарушения репродуктивной функции (НРФ) в супружеской паре является одним из наиболее перспективных направлений современной генетики и приоритетной областью здравоохранения. В настоящее время бесплодие и невынашивание беременности рассматривают как мультифакторные заболевания, являющиеся результатом совместного действия множества генетических и средовых факторов, относительная роль которых различна в каждом конкретном случае [3, 15]. Развитие современных методов исследования позволило существенно расширить представление о наследственном генезе нарушения фертильности [4, 5, 7, 11, 16, 17, 30]. Генетический компонент этиологии и патогенеза нарушения репродукции включает в себя не только эффект генных и хромосомных

мутаций, связанных с изменением непосредственно наследственного материала, но и генетические факторы предрасположенности, которые при взаимодействии со средовыми обуславливают развитие целого ряда состояний, в частности, эндокринопатии, тромбофилии, иммунопатологию, пороки развития половой сферы, генитальный инфантилизм и др. Таким образом, генетический механизм возникновения мультифакторных заболеваний, в частности различных форм нарушения репродукции, является наиболее сложным, так как в основе его лежат различные комбинации аллельных вариантов многих генов, получившие название генных сетей [3]. Определение генной сети мультифакторного заболевания, идентификация в ней центральных генов и генов-модификаторов, анализ ассоциации их полиморфизмов с определенным заболеванием, разработка на этой основе комплекса профилактических мероприятий для пациента является важной задачей современной медицинской науки.

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей полиморфизма генов главного комплекса гистосовместимости HLA II класса (*DRB1*, *DQA1*, *DQB1*); фолатного обмена (гены 5,10-метилентетрагидрофолат-редуктазы *MTHFR* и метионин-синтазы-редуктазы *MTRR*) и системы детоксикации (гены семейства глутатион-S-трансфераз *M1*, *T1* и *P1*) в семьях с нормальной репродуктивной функцией, в супружеских парах с первичным бесплодием (St I) и первичной привычной потерей беременности ранних сроков (ППБ).

Основную группу составили 235 супружеских пар с нарушенной репродукцией: 155 семей с первичным бесплодием (при исключении первичной аменореи и трубного бесплодия у женщины) и 80 семей с первичной привычной потерей беременности ранних сроков, под которой подразумевалось самопроизвольное прерывание двух и более беременностей до 12 недель при отсутствии в анамнезе указаний на роды, медицинские аборт, внематочную беременность. Контрольную группу составили 57 супружеских пар, имеющих одного и более здорового ребенка при указании на нормально протекавшие у женщины беременность и роды. У всех обследованных были исключены численные и структурные аномалии кариотипа.

У женщин из семей с первичным бесплодием не были отмечены достоверные отличия от контроля в характере распределения аллелей и генотипов в генах семейства глутатион-S-трансфераз. Однако у пациенток с первичным бесплодием достоверно чаще, чем у здоровых женщин, наблюдались следующие сочетания: генотипа *GSTT1* 0/0 и отсутствия делеции в гене *GSTM1* (11,0 и 1,8% соответственно, $p = 0,04$, OR = 4,6 (1,1—20,0)), генотипов *GSTT1* 0/0 и *GSTP1* A/B (15,0 и 3,8% соответственно, $p = 0,047$, OR = 3,7 (1,0—13,0)), а также генотипа *GSTT1* 0/0, *GSTP1* A/- и отсутствия делеции в гене *GSTM1* (8,8 и 0,0% соответственно, $p = 0,042$, OR = 10,7 (1,3—89,3)). В генах фолатного цикла у женщин с первичным бесплодием, по сравнению с контролем, отмечалось некоторое увеличение частоты аллеля *MTHFR* 677T, однако разница не была статистически значимой (28,1 и 18,3% соответственно, $p = 0,056$). У пациенток с St I, по сравнению со здоровыми женщинами, было выявлено достоверное увели-

чение частоты одновременного носительства низкофункциональных аллелей 677T и 66G в генах *MTHFR* и *MTRR* (43,3 и 26,0% соответственно, $p = 0,038$, OR = 2,1 (1,0—4,3)). Анализ особенностей генов HLA II класса не выявил статистически значимые отличия от контрольной группы.

У мужчин в парах с первичным бесплодием, по сравнению с контролем, было отмечено достоверное увеличение частоты «нулевого» варианта в гене *GSTM1* (54,1 и 32,1% соответственно, $p = 0,01$, OR = 2,5 (1,2—4,9)), а также сочетания генотипов *GSTM1* 0/0 и *GSTP1* В/- (27,8 и 7,4% соответственно, $p = 0,005$, OR = 4,4 (1,6—12,0)). Анализ полиморфизма генов фолатного цикла и генов HLA II класса у мужчин из бесплодных пар не выявил отличий от группы репродуктивно здоровых мужчин.

У женщин с первичной привычной потерей беременности ранних сроков, по сравнению с контролем, было отмечено достоверное увеличение частоты сочетания генотипов *GSTM1* 0/0 и *GSTP1* С/- (8,5 и 0,0% соответственно, $p = 0,047$, OR = 10,9 (1,2—95,8)). Анализ полиморфизма генов фолатного цикла и генов HLA II класса у женщин с первичной ППБ ранних сроков показал значительные отличия от контрольной группы. Так, у пациенток с ППБ, по сравнению со здоровыми женщинами, имело место статистически значимое увеличение частоты низкофункционального аллеля 677T в гене *MTHFR* (34,5 и 18,3% соответственно, $p = 0,007$, OR = 2,3 (1,3—4,3)), генотипов 677С/Т + 677Т/Т в гене *MTHFR* (58,6 и 34,6% соответственно, $p = 0,012$, OR = 2,6 (1,2—5,6)), а также одновременного носительства аллелей *MTHFR* 677Т и *MTRR* 66G (46,6 и 26,0% соответственно, $p = 0,027$, OR = 2,4 (1,1—5,3)). Достоверно чаще, по сравнению с контролем, были отмечены аллели *DQA1* 0401 (7,3 и 1,0% соответственно, $p = 0,045$, OR = 5,9 (1,3—27,2)) и *DQB1* 0401 (7,3 и 1,0% соответственно, $p = 0,045$, OR = 5,9 (1,3—27,2)). У женщин с привычной потерей беременности, по сравнению с группой здоровых женщин, достоверно чаще выявлялся гаплотип *DQA1-DQB1* 0401-0401 (7,3 и 1,0% соответственно, $p = 0,045$, OR = 5,9 (1,3—27,2)).

У мужчин из семей с ППБ анализ полиморфизма генов семейства глутатион-S-трансфераз, фолатного цикла и системы HLA II класса выявил крайне немногочисленные отличия от контрольной группы. Так, достоверное увеличение частоты было отмечено только для генотипа В/С в гене *GSTP1* (8,9 и 0,0% соответственно, $p = 0,038$, OR = 12,0 (1,4—104,5)). Особенности полиморфизма генов фолатного цикла и системы HLA II класса установлены не были.

В последние годы в литературе появились сообщения о негативной роли повышенного числа совпадений по локусам системы HLA у супругов в реализации репродуктивной функции в паре. По данным ряда авторов, увеличение количества совпадений обуславливает повышенный риск самопроизвольного прерывания беременности [4, 14]. Система генов главного комплекса гистосовместимости (у человека это лейкоцитарные антигены — Human Leukocyte Antygens — HLA) осуществляет генетический контроль развития специфического иммунного

ответа и участвует в поддержании иммунного гомеостаза организма [1]. Полигенность и полиморфизм генов комплекса HLA обуславливает широкое разнообразие индивидуумов по антигенам МНС. Уникальность белков комплекса гистосовместимости в определенной мере играет роль при формировании различной степени чувствительности организма к этиологическим факторам многих видов патологии. Широко дискутируется проблема аллоиммунных отношений при беременности с учетом совместимости супругов и, соответственно, матери и плода по антигенам системы HLA [8, 10].

В настоящем исследовании был проведен анализ количества и качества совпадений аллелей в локусах *DRB1*, *DQA1* и *DQB1* в супружеских парах с первичным бесплодием ($n = 39$), первичной привычной потерей беременности ранних сроков ($n = 41$) и в репродуктивно здоровых семьях ($n = 52$) в популяции Ивановской области. В исследуемых группах семей с St I и ППБ достоверных отличия от контрольной группы по числу пар, где супруги имели идентичные аллели в одном, двух или трех локусах, выявлены не были. Так, совпадение по одному аллелю у супругов с St I, ППБ и в контроле имело место соответственно в 23,1, 31,7 и 30,8% семей; по двум — в 23,1, 17,4 и 15,4% семей; по трем — в 28,2, 24,4 и 28,8% семей. При анализе попарного совпадения указанных локусов в исследуемых группах также отсутствовали статистически значимые отличия от здоровой выборки. Совпадение супругов по локусу *DRB1* было выявлено в 13 парах с St I (33,3%) и 20 парах здоровой выборки (38,5%); анализ аллельных вариантов этих совпадений показал, что аллель *DRB1* 07 имеют оба супруга 30,8% семей с бесплодием и только 5,0% пар контроля ($p = 0,066$). В группе с ППБ отличия от контроля по количеству пар, имеющих совпадение в локусе *DRB1* (39,0 и 38,5% соответственно), а также в аллельных вариантах этих совпадений не выявлены. Совпадение супругов по локусу *DQA1* было определено в 27 парах с St I (60,0%), 22 парах с ППБ (53,7%) и 33 парах контроля (63,5%). При этом среди бесплодных семей в большинстве случаев (40,7%) оба супруга имели аллель *DQA1* 0102, в то время как в репродуктивно здоровой выборке идентичность по данному аллелю определялась лишь у 18,2% пар ($p = 0,054$). В семьях с ППБ значимые отличия от контроля по аллельным вариантам совпадений в локусе *DQA1* выявлены не были. Количество пар, в которых супруги совпадали по локусу *DQB1*, во всех группах было сходным (54,5, 46,3, 46,2% при St I, ППБ и в контроле соответственно). Не выявлено также отличий по видам совпадающих аллелей

в данном локусе у супругов разных групп. Таким образом, в настоящем исследовании показано, что совпадение супругов по аллелям HLA II класса не является фактором риска нарушения репродуктивной функции в супружеской паре.

Полученные нами данные свидетельствуют о возможной ассоциации между выявленными особенностями полиморфизма генов системы детоксикации, фолатного цикла, комплекса HLA II класса и нарушением репродукции в супружеской паре. Согласно результатам настоящего исследования, у супругов с нарушенной репродуктивной функцией наблюдается увеличение

частоты низкофункциональных аллелей в генах семейства глутатион-S-трансфераз, которое максимально выражено у мужчин в бесплодных браках. Как известно, ферменты семейства глутатион-S-трансфераз участвуют во втором этапе процесса детоксикации ксенобиотиков [3]. Дефект ферментативных систем, участвующих в инактивации токсических метаболитов, вероятно, негативно сказывается на процессах гаметогенеза, что приобретает особое значение в условиях современного экологического неблагополучия. Вместе с тем, нельзя исключить нарушение процесса плацентации вследствие снижения детоксикационной функции плаценты при наличии у женщины мутантных аллелей в генах метаболизма.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что присутствие низкофункциональных аллелей в генах фолатного цикла, возможно, является фактором риска самопроизвольного прерывания беременности. Причем можно предположить наиболее неблагоприятное влияние на репродукцию именно женского организма для полиморфизма 677Т в гене *MTHFR*. Согласно нашим данным, у женщин с первичным бесплодием наблюдается лишь некоторое увеличение частоты аллеля *MTHFR* 677Т, в то время как у пациенток с ППБ, по сравнению с контролем, разница в частотах аллеля *MTHFR* 677Т является статистически значимой. Как известно, 5,10-метилентетрагидрофолат-редуктаза является ключевым ферментом в процессе синтеза метионина из гомоцистеина [6]. Гомо- и гетерозиготное носительство аллеля 677Т обуславливает снижение активности энзима и, соответственно, приводит к развитию гипергомоцистеинемии. Повышение уровня содержания гомоцистеина является фактором риска развития тромбофилических осложнений, вероятность которых еще более повышается в период беременности вследствие перестройки свертывающей, противосвертывающей и фибринолитической систем организма [2, 12, 13, 28]. Тромбофилический и атерогенный эффекты гипергомоцистеинемии проявляются в нарушении плацентации и прерывании беременности [4, 20, 22, 23]. Возможно, в ряде случаев этот патогенетический механизм имеет место при нарушении имплантации и очень ранней гибели плодного яйца, которая остается недиагностированной и проходит под маской бесплодия. Однако можно предположить, что среди массы факторов, обуславливающих женское бесплодие, наследственные тромбофилии хотя и играют определенную роль, но уступают по значимости другим факторам; в то время как среди причин прерывания беременности они имеют более важное значение.

Для выяснения роли полиморфизма генов фолатного цикла в развитии гипергомоцистеинемии нами было проведено определение базового уровня общего гомоцистеина (ГЦ) в плазме крови у 29 женщин с ППБ вне состояния беременности. Выявлена тенденция увеличения показателя среднего уровня содержания ГЦ в плазме крови у пациенток с ППБ в зависимости от «дозы» аллеля 677Т в гене *MTHFR*. Отсутствие статистической достоверности, возможно, обусловлено небольшими размерами выборки. Тем не менее, можно отметить, что самый высокий уровень гомоцистеина в сыворотке крови (45,47 и 29,08 мкмоль/л при норме до 15,00 мкмоль/л)

наблюдался у женщин с генотипом *MTHFR* 677 T/T, причем в одном случае он сочетался с генотипом 1298A/A в гене *MTHFR* и 66A/A в гене *MTRR*, в другом — с генотипом 1298A/A в гене *MTHFR* и 66A/G в гене *MTRR*. Вероятно, умеренная гипергомоцистеинемия связана именно с гомозиготным вариантом полиморфизма гена *MTHFR* C677T. Можно предположить, что аллель 677T в гене *MTHFR* играет бóльшую роль при синдроме потери плода, чем аллели *MTHFR* 1298C и *MTRR* 66G, именно вследствие того, что влияет на уровень содержания ГЦ в плазме крови и обуславливает развитие тромбофилических осложнений. Результаты настоящего исследования согласуются с мнением ряда авторов. Так, по данным Калашниковой и Кокаровцевой [9], у женщин с привычным невынашиванием беременности выявляется прямая корреляция значений гомоцистеина с «дозой» аллеля 677T в гене *MTHFR*, хотя авторы не выявили достоверных отличий в частотах гомо- и гетерозиготных генотипов в гене *MTHFR* у здоровых женщин и пациенток с привычным невынашиванием беременности.

Вместе с тем, негативного влияния на мужскую фертильность, низкофункциональные аллели в генах фолатного цикла, вероятно, не оказывают. В доступной нам литературе мы обнаружили лишь два исследования посвященные анализу полиморфных вариантов гена 5,10-метилентетрагидрофолат-редуктазы у мужчин с олиго- и азооспермией [26, 27], с противоположными выводами. Вероятно, наличие мутантных аллелей у отца имеет значение лишь при формировании генотипа плода. По данным ряда авторов, присутствие у плода неблагоприятных аллелей в генах фолатного цикла вследствие изменения профиля метилирования ДНК может оказывать негативное влияние на процесс деления и дифференцировки клеток развивающегося организма [18, 21, 24, 29]. Подтверждением этой гипотезы служит факт достоверного увеличения частоты носительства низкофункциональных аллелей в генах *MTHFR* и *MTRR* обоими супругами в парах с ППБ, что было продемонстрировано в нашем исследовании. Так, в группе семей с ППБ у 12% обследованных пар оба супруга имели сочетание *MTHFR* 677C/- + *MTRR* 66G/G при отсутствии таких семей в контрольной группе ($p = 0,028$, OR = 13,0 (1,6—108,0)); комбинация *MTHFR* 677C/T + *MTRR* 66G/- в группах с ППБ и в контроле была выявлена соответственно в 14,0 и 2,3% случаев ($p = 0,063$). Недостаточная активность ферментов фолатного обмена может быть причиной снижения метилирования не только в соматических клетках эмбриона, но и в половых клетках. Изменение профиля метилирования центромерных районов хромосом в процессе гаметогенеза, возможно, способствует нарушению расхождения гомологов в мейозе, формированию несбалансированных гамет и возникновению анеуплоидии у плода [19, 25]. Результатом хромосомного дисбаланса у плода является или самопроизвольное прерывание беременности, иногда на самых ранних стадиях эмбриогенеза, - что протекает под маской бесплодия, - или формирование пороков развития.

Таким образом, проведенное исследование позволило определить маркеры предрасположенности к первичному бесплодию и первичной привычной потере беременности ранних сро-

ков в генах системы HLA II класса, фолатного цикла и семейства глутатион-S-трансфераз. Установлена ассоциация между наличием в генотипе женщины низкофункциональных аллелей в генах *MTHFR* и *MTRR*, аллелей *DQA1* 0401, *DQB1* 0401, гаплотипа *DQA1-DQB1* 0401-0401 и развитием первичной привычной потери беременности ранних сроков. Показано, что присутствие в генотипе мужчины низкофункциональных аллелей в генах семейства глутатион-S-трансфераз (*M1*, *T1*, *P1*) является фактором риска снижения фертильности и развития первичного бесплодия в супружеской паре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акопян, А. В. Иммунологические и иммуногенетические аспекты периодической болезни [Текст] / А. В. Акопян, Л. П. Алексеев, Р.М. Хаитов // Иммунология. -1998 – N 1. - С.4 – 6
2. Баймурадова, С. М. АФС и генетические формы тромбофилии у беременных с гестозами [Текст] / С. М. Баймурадова, В.О. Бицадзе, Т. Е. Матвеева, О.С. Аляутдина, Л. И. Патрушев, А. Д. Макацария //Акушерство и гинекология. - 2004. - №2. – С. 21-27.
3. Баранов, В. С. Геном человека и гены «предрасположенности» (Введение в предиктивную медицину) [Текст]/ В. С. Баранов, Е. В. Баранова, Т. Э. Иващенко, М. В. Асеев. – СПб.: Интермедика, 2000. – 272 с.
4. Бескоровайная, Т. С. Влияние некоторых генетических факторов на нарушение репродукции у человека [Текст]/ Т. С. Бескоровайная: дисс. ... канд. мед. наук. - М., 2005. - 89с.
5. Беспалова, О. Н. Генетические факторы предрасположенности к привычному невынашиванию беременности ранних сроков [Текст]/ О. Н. Беспалова, О. Н. Аржанова, Т. Э. Иващенко и др. // Журн. акушерства и женских болезней. - 2001. - №2. - С.8-13.
6. Зайчик, А. Ш. , Основы патохимии [Текст]/ А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов: учебник для студентов медицинских вузов. – СПб.: ЭЛБИ – СПб., 2001. – 688 с.
7. Иващенко, Т. Э. Анализ полиморфных аллелей генов, кодирующих ферменты 1-й и 2-й фазы детоксикации, у больных эндометриозом [Текст]/ Т. Э. Иващенко, Н. Ю. Швед, Н. Л. Крамарева и др. // Генетика. - 2003. - Т.39, №4. - С.525-529.
8. Иммунологическая загадка беременности [Текст] /под ред. Н. Ю. Сотниковой. – Иваново: МИК, 2005. – 276 с.
9. Калашникова, Е. А. Ассоциация наследственных факторов тромбофилии с невынашиванием беременности у женщин в русской популяции [Текст]/ Е. А. Калашникова, С. Н. Кокаровцева // Медицинская генетика. – 2005. - №8. – С.386-391.
10. Коненков, В. И. Медицинская и экологическая иммуногенетика [Текст]/ В. И. Коненков. - Новосибирск, 1999. - 250 с.
11. Кузнецова, Т. В. Комплексный подход к цитогенетике эмбрионального развития человека [Текст]/ Т. В. Кузнецова: дис. ... д-ра мед. наук. - СПб., 2000.
12. Макацария, А. Д.– Тромбофилические состояния в акушерской практике [Текст]/ А. Д. Макацария, В. О. Бицадзе. – М.: Russo, 2001.
13. Мухин, Н. А. Гипергомоцистеинемия как фактор риска развития заболеваний сердечно-сосудистой системы [Текст]/ Н. А. Мухин, С. В. Моисеев, В. В. Фомин //Клиническая медицина. – 2001. - №6. - С.7-14.
14. Серова, Л. Д. Иммунологический HLA-статус у женщин с привычным невынашиванием и бесплодием неясного генеза [Текст] / Л. Д. Серова и др.: пособие для врачей. - М., 1997.
15. Сидельникова, В. М. Привычная потеря беременности [Текст]/ В. М. Сидельникова - М.: Триада-Х, 2002.- 304 с.

16. Carp H. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. [Text] /H. Carp, O. Salomon, D. Seidman, R. Dardik et al. // Hum. Reprod. – 2002. Vol.17(6). – P.1633-1637.
17. Coulam, C. Update on recurrent pregnancy loss [Text]/ C. Coulam // Am. J. Reprod. Immunol. - 2004. -Vol.51. - P.459-460.
18. Fell, D. Disruption of thymidylate synthesis and glycine-serine interconversion by L-methionine and L-homocystine in Raji cells [Text] / D.Fell, J.Selhub // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. –Vol.1033. - P.80-84.
19. Hobbs, C. A. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism as Maternal Risk Factors for Down Syndrome [Text] / C. A. Hobbs, S. L. Sherman, P. Yi et al. // Am. J. Hum. Genet. – 2000. – Vol.67. - P.623-630.
20. Hohlagschwandtner, M. Combined thrombophilic polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage [Text]/ M. Hohlagschwandtner, G. Unfried, G. Heinze et al. // Fertil. Steril. – 2003. – Vol.79(5). – P.1141-1148.
21. Isotalo, P. A. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations [Text] / P. A. Isotalo, G. A. Wells, J. G. Donnelly // Am. J. Hum. Genet. – 2000. – Vol.67 -P.986-990.
22. Kumar, K. S. Plasma homocysteine levels correlated to interactions between folate status and methylene tetrahydrofolate reductase gene mutation in women with unexplained recurrent pregnancy loss [Text] / K. S. Kumar, V. Govindaiah, S. E. Naushad et al.// J. Obstet. Gynaecol. – 2003. – Vol.23. – P.55-58.
23. Lissak, A. Polymorphism for mutation of cytosine to thymine at location 677 in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene is associated with recurrent early fetal loss [Text] / A. Lissak, A. Sharon, O. Fruchter et al. // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1999.- Vol.181. - P.126-130.
24. Motulsky, A. G. Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects, and folic acid. (Editorial) [Text] / A. G. Motulsky // Am. J. Hum. Genet. - 1996. – Vol.58. – P.17-20.
25. O'Leary, V. B. *MTRR* and *MTHFR* polymorphism: link to Down syndrome? [Text] / V. B. O'Leary, A. Parle-McDermott, A. M. Molloy et al. // Am. J. Med. Genet.- 2002 –Vol.107. - P.151-155.
26. Singh, K. Mutation C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with male infertility in an Indian population. [Text]/ K. Singh,S. K. Singh, R. Sah et.al.// Int. J. Androl. – 2005. – Vol.28, №2. –P.115-119.
27. Stuppia, L. The methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T polymorphism and male infertility in Italy. [Text]/ L. Stuppia, V. Gatta, O. Scarciolla et al.// Endocrinol. Invest. – 2003. – Vol.26, №7. – P.620-622.
28. Undas, A. Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C [Text] / A. Undas, E. B. Williams, S. Butenas et al. // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 4389-4397.
29. Zetterberg, H. No association between the *MTHFR* A1298C and transcobalamin C776G genetic polymorphisms and hyperhomocysteinemia in thrombotic disease [Text] / H. Zetterberg, A. Coppola, A. D'Angelo et al. // Thromb. Res. – 2002.- Vol.108. – P.127-131.
30. Zusterzeel, P. L. M. Polymorphisms in biotransformation enzymes and the risk for recurrent early pregnancy loss [Text] / P. L. M. Zusterzeel, W. L. D. M. Nelen, H. M. J. Roelofs et al. // Mol. Hum. Reprod. - 2000. - Vol.6, №5. - P.474-478.

СИНДРОМ СТАТИСТИЧЕСКОЙ СНИСХОДИТЕЛЬНОСТИ ИЛИ ЗНАЧЕНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ P-ЗНАЧЕНИЯ

Хромов-Борисов Н.Н.

Кафедра медицинской информатики

Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. акад.
И. П. Павлова 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8
Тел.: 8-952-204-89-49; e-mail: Nikita.KhromovBorisov@gmail.com

Единые требования

Редакции многих отечественных и зарубежных биомедицинских журналов при подготовке к публикации научных статей рекомендуют авторам руководствоваться «Едиными требованиями к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы». Требования разрабатывает Международный комитет редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors – ICMJE). Эти требования регулярно пересматриваются, и последняя их редакция датирована октябрём 2008 г. [1]. На русский переведена редакция 2005 г. [2].

В этих требованиях обязательным является раздел «Статистика», в котором сказано: *«Описывайте статистические методы настолько детально, чтобы осведомленный читатель, имеющий доступ к исходным данным, мог проверить сообщаемые Вами результаты. По возможности, подвергайте полученные данные количественной оценке и представляйте их с соответствующими показателями ошибок измерения и неопределенности или варьирования измерений (такими как доверительные интервалы). Не следует полагаться исключительно на проверку статистических гипотез, например, на использование P-значений, которые не содержат важную информацию о размере эффекта»* [2].

В отечественной литературе, пожалуй, наиболее подробно «Принципы описания статистики в биомедицинских публикациях» обсудил редактор известного сайта «Биометрика» В.П. Леоновым [3]. Полезные сведения содержатся также в ГОСТР 52379-2005: «Надлежащая клиническая практика» [4]. Обновленные требования появились недавно в журнале «Экология человека», в которых в частности появилось чрезвычайно важное предостережение: *«Всегда следует помнить, что выявление статистически значимых различий еще не означает наличия достоверных или клинически важных различий, а также причинно-следственных связей»* [5].

Несмотря на рекомендацию «не полагаться исключительно на использование P-значения», до сих пор во многих научных публикациях оно фигурирует как решающий показатель значимости наблюдаемых авторами эффектов, различий, корреляций и т.п.

P-значение

Напомним, как определяется и вычисляется P-значение. P-значение есть условная вероятность, а именно: Вероятность получить наблюдаемое значение $t_{\text{набл.}}$ статистики некоего критерия T и все остальные еще менее вероятные значения этой статистики (или значения, еще более отклоняющиеся от ожидаемых) ПРИ УСЛОВИИ, что верна нулевая гипотеза H_0 :

$$P_{\text{val}} = \Pr[|T| \geq |t_{\text{набл.}}| \mid H_0].$$

Тут следует обратить внимание на то, что «еще менее вероятные данные» **не** являются «данными», мы их не наблюдаем. Мы их додумываем из всех возможных в рамках выбранной нами (нулевой) модели.

Распространенной является интерпретация P -значения как меры (силы) доказательства, предоставляемого имеющимися данными, против нулевой гипотезы. Однако, строго говоря, оно не является мерой в математическом смысле (не обладает свойством аддитивности) и не удовлетворяет, как минимум, двум важнейшим принципам теории статистики – Принципу правдоподобия и P -постулату.

Принцип правдоподобия и P -постулат

В словесной формулировке Принцип правдоподобия есть положение о том, что анализ данных должен оперировать теми и только теми данными, которые реально получены в эксперименте. В математических терминах Принцип правдоподобия утверждает, что все выводы о неизвестном параметре μ содержатся в функции правдоподобия для μ , вычисляемой из полученных данных. Однако, для вычисления P -значения, как это следует из его определения, используются не только наблюдаемые в эксперименте данные, но и все другие, еще менее вероятные, которые в реальности не были наблюдаемы. Другими словами, вычисленные P -значения не основано на функции правдоподобия.

Кроме того, чтобы P -значение служило реальной и адекватной мерой статистического доказательства, оно должно удовлетворять простому правилу (постулату) согласно которому одинаковые P -значения должны предоставлять одинаковые доказательства против нулевой гипотезы. Это правило называют « P -постулатом» [6]. Однако, это минимальное требование не выполняется. Так, интуитивно можно понять, что $P = 0,01$ для эксперимента с 10 наблюдениями явно не будет иметь той же доказательной силы, что и $P = 0,01$ для эксперимента с 300 наблюдениями. Равным образом, $P = 0,001$, полученное в одном опыте, и $P = 0,01$ – в другом, не означает, что эффект, наблюдаемый в первом опыте, в 10 раз более убедителен, чем эффект во втором опыте. Таким образом, P -значение не является непосредственной мерой таких доказательств. Это прекрасно понимал Р.А. Фишер: «Критерий значимости [P -значение] не позволяет нам делать какие-либо выводы о проверяемой гипотезе в терминах математической вероятности» [7].

Распространенное заблуждение, или чем не является P -значение

Квинтэссенцию традиционных (частотных) заключений при проверке статистических гипотез принято интерпретировать так: *чем меньше P -значение, тем сильнее (весомее) доводы (свидетельства, доказательства) против нулевой гипотезы H_0 , которые предоставляют нам имеющиеся (наблюдаемые) данные; тем больше у нас оснований сомневаться в H_0* . Отсюда невольно (и вроде бы естественно) возникает соблазн интерпретировать P -значение как вероятность нулевой гипотезы. Так, например, в известной книге С.Гланца можно встретить утверждение: «Упрощая, можно сказать, что P — это вероятность справедливости нулевой гипотезы» [8, с. 119]. Это мнение глубоко ошибочно и чревато пагубными последствиями. К чести автора, в последующих (у нас не переведенных) изданиях этой его книги оно не упоминается.

P -значение не есть вероятность нулевой гипотезы!

Поскольку P -значение вычисляется в предположении, что верна нулевая гипотеза, то оно не может представлять вероятность (верности) нулевой гипотезы:

$$P[D|H_0] \neq P[H_0|D].$$

Здесь $D = |T| \geq |t_{\text{набл.}}|$ суть все значения статистики критерия T , которые равны наблюдаемому значению $|t_{\text{набл.}}|$ и превышают его.

Подробнее о том, чем не является P -значение, см. энциклопедическую статью [9] и недавнюю работу С. Гудмана, в которой перечислена «грязная дюжина» ошибочных интерпретаций P -значения [10].

Кроме того, чрезвычайно важно осознавать, что P -значение есть наблюдаемое значение соответствующей вероятностной переменной. Это означает, что всякий раз мы будем наблюдать одно из ее возможных значений и в разных опытах оно будет варьировать. Когда H_0 верна, то P_{val} имеет непрерывное равномерное распределение на отрезке $[0; 1]$. Это озна-

чает, что в любом одиночном эксперименте при справедливости гипотезы H_0 мы можем получить любое P -значение, как очень малое, близкое к нулю, так и очень большое, близкое к единице. Это и есть теоретическое обоснование известных утверждений, присутствующих во многих руководствах, о том, что на основании наблюдаемого P -значения нельзя принять нулевую гипотезу, когда $P_{val} > \alpha$, т.е. когда P -значение не преодолевает уровень α значимости, который выбирается заранее в качестве порогового (критического).

Выбор порога для P -значения, и возможен ли он? Гипноз цифр 0,05 и 95%

Когда наблюдаемое P -значение мало, появляется основание отвергнуть H_0 . Однако важно понимать, что такое решение является *внестатистическим*, ибо нет никаких *вероятностно-статистических* или иных теоретических соображений, какое значение P_{val} следует считать настолько малым, чтобы смело отвергнуть H_0 . Принимая такое решение, каждый раз мы осуществляем *акт интеллектуальной смелости*. На практике *решение отклонить или принять H_0 непременно зависит от обстоятельств*. Исследователь в каждой конкретной ситуации обязан сам делать этот выбор.

Наиболее часто в качестве критического порога используется уровень значимости $\alpha = 0,05$, и статистический анализ в конечном итоге сводится к сравнению наблюдаемого значения P_{val} с этим α и конечные результаты обычно представляются в виде неравенств: $P_{val} > 0,05$ или $P_{val} < 0,05$. К сожалению, такое представление результатов анализа до сих пор нередко встречается в публикациях, несмотря на то, что в руководствах давно рекомендуется представлять конкретно наблюдаемые значения P_{val} . Преодоление этого порогового уровня ($P_{val} < 0,05$) всего лишь в одной выборке часто считается достаточным для вывода о статистической значимости наблюдаемого эффекта. В последнем случае часто употребляется даже более сильное утверждение: «эффект достоверен».

Наряду с пороговым значением 0,05 для уровня значимости, повсеместно (за редчайшими исключениями) используется уровень (вероятность) доверия 0,95 и строятся 95%-ые интервалы доверия.

На выбор Фишером порогов для уровня значимости повлияли и психологические причины. М. Кендалл вспоминал, что Фишер составил таблицы критических значений (для уровней значимости 0,05; 0,02 и 0,01) из соображений компактности и удобства пользования, а также с целью избежать проблемы авторства с Карлом Пирсоном, с которым у него были принципиальные разногласия [11]. Кроме того, Фишер остановил свой выбор на этих критических значениях, основываясь на личном опыте работы с сельскохозяйственными растениями на Ротамстедской сельскохозяйственной станции. Фактически у него почти не было опыта работы в других областях экспериментальной науки, например, в медицине.

Пророк в своем отечестве

Тут уместно вспомнить мнение А.Н. Колмогорова, который более полувека тому назад отмечал: *«При практическом употреблении вычисленных значений вероятности мы неизбежно приходим к вопросу о том, какими (сколь малыми) значениями вероятностей мы можем пренебречь. На практике этот вопрос решается каждый раз по-разному, в зависимости от того, насколько велика необходимость быстрого перехода от накопления надежных данных к их действительному употреблению. В спокойной обстановке научных исследований принято пренебрегать лишь вероятностью в 0,003 (эта норма связана с так называемым правилом трех сигма). В математической статистике вероятность, которой решено пренебрегать в данном исследовании, называют уровнем значимости. Хотя в статистике обычно рекомендуют пользоваться уровнями значимости от 0,05 - при предвари-*

тельных ориентировочных исследованиях и до 0,001 - при окончательных серьезных выводах, часто достижима значительно большая значимость вероятностных выводов». «Если норма в 0,05 для серьезных научных исследований явно не достаточна, то вероятностью ошибки в 0,001 или 0,003 по большей части принято пренебрегать даже в столь академических и обстоятельных исследованиях, как обработка астрономических наблюдений» (вос-произведено в [12]).

В другом месте он повторял: «Вероятности, которыми принято пренебрегать в различных приложениях, различны. Иногда в научных исследованиях ограничиваются статистическими приемами, рассчитанными исходя из пренебрежения вероятностями в 0,05. Но это следует делать лишь в случаях, когда собирание более обширного материала затруднительно. Если норма в 0,05 для серьезных научных исследований явно недостаточна, то вероятностью в 0,001 или в 0,003 по большей части принято пренебрегать даже в столь академических и обстоятельных исследованиях, как обработка астрономических наблюдений. Впрочем, иногда научные выводы, основанные на применении вероятностных закономерностей, обладают и значительно большей достоверностью (т.е. построены на пренебрежении значительно меньшими вероятностями)» [13].

В наши дни Колмогорову ему вторят зарубежные авторы: «*P*-значение близкое к 0,05 не является сильным свидетельством (доказательством) против нулевой гипотезы. Сильными свидетельствами против H_0 следует признавать значения $P < 0,001$ » [14].

При бурлящей в настоящее время «золотой лихорадки» вокруг изучения генетических предрасположенностей к общим болезням, т.е. поиска связей («ассоциаций») между генетическим полиморфизмом и заболеваниями рекомендуется ориентироваться на еще более низкие пороговые значения уровня значимости: «Вместо повсеместно используемого порогового-го (критического) уровня значимости 0,05 в качестве такового мы должны использовать значение порядка 5×10^{-5} . При таком уровне значимости потребуется обследовать две груп-пы здоровых и больных по 5000 человек в каждой» [15].

Гибкие *P*-значения

Таким образом, явно не следует слепо применять инструментарий процедур проверки значимости нулевой гипотезы и основывать свои выводы исключительно на получаемых *P*-значениях. Осмысленные выводы должны основываться на разумном взвешивании *P*-значений и на использовании дополнительной информации о других не менее важных показателях, таких как мощность, размер эффекта, количество наблюдений, о результатах предшествующих работ, предсказаниях действующей теории и т.п. Сам Фишер подчеркивал, что «В действительности ни один исследователь не пользуется фиксированным уровнем значимости с которым из года в год и при любых обстоятельствах он отвергает нулевые гипотезы. Он больше доверяет своему уму и каждый конкретный случай рассматривает в свете совокупности имеющихся доказательств и своих идей и представлений» [16]. Такой подход иногда интерпретируют как призыв использовать «гибкие» *P*-значения.

Не «достоверный», но «статистически значимый»

Надо стараться избегать слова «достоверность», ибо в русском языке оно означает подлинный, несомненно верный, не вызывающий сомнения. В теории вероятностей достоверное событие – событие с вероятностью, равной 1. На основании статистического анализа одиночного исследования нельзя говорить о достоверности. Информация становится достоверной, только когда она подтверждается последующими тщательными перепроверками. Если вдуматься, нередко встречающееся в биомедицинской литературе словосочетание «статистическая достоверность» есть оксюморон – сочетание несочетаемого. Всестороннее обсуждение этого вопроса в работе Н.А. Зорина [17].

Доверяя, повторяй

Авторитетные профессиональные ученые как правило считают повторение исследования решающим (ключевым) аспектом научного метода. Один эксперимент, как бы хорошо он ни был спланирован, не может обеспечить неопровержимое доказательство правильности теории или эффективности вмешательства (воздействия). Получение совокупного знания подразумевает длинные серии испытаний для каждого конкретного исследовательского поиска. Чтобы установить совокупное научное знание, необходимо многократно повторять исследования.

Нет более фундаментального принципа прикладной статистики, чем следующий. Поскольку различных возможностей всегда очень много, то большинство наборов данных будут необычными в некотором неожиданном отношении (аспекте). Поэтому, чтобы проверить, являются ли наблюдаемые данные реальными, а не артефактными, необходимо получить дополнительные повторные и независимые наборы данных.

Возможно, кого-то это удивит, но руководства по статистическим методам сосредотачиваются в основном на том, как анализировать *одиночный* набор данных, пытаясь во что бы то ни стало ответить на сакраментальный вопрос: «Является ли результат значимым?», а не на том, как интерпретировать *много* наборов данных, как их обобщить и ответить на вопрос «Является ли результат фактом?».

В статистических руководствах и статьях преобладает «культ изолированного исследования». Часто считается, что если получен «статистически значимый» результат, то это исключает необходимость повторить исследование. Повторность часто рассматривается как нечто суетное и никчемное.

Воспроизводимость P-значений

В настоящее время доступна программа, которая наглядно демонстрирует необходимость многократных повторений опыта. С ее помощью можно смоделировать воспроизводимость P-значений и доверительных интервалов при различных объемах выборок для ситуации сравнения двух независимых выборок [18].

Один такой пример представлен на Рис. 1.

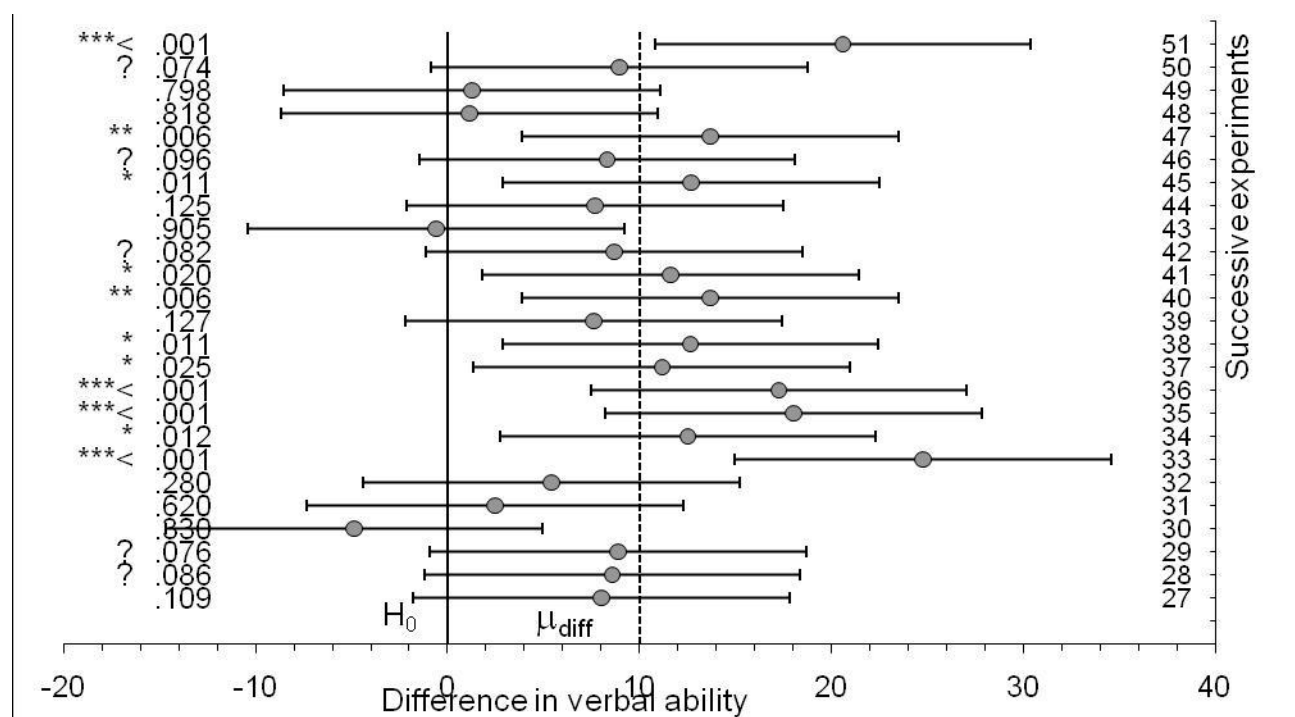


Рисунок 1. Иллюстрация воспроизводимости P -значений и доверительных интервалов для разности средних $\mu_{diff} = \mu_1 - \mu_2$ при повторных извлечениях пар независимых выборок из двух нормальных распределений с $\mu_{diff} = 10$. По оси абсцисс отложены значения μ_{diff} . Использована программа “ESCI PPS p intervals” (<http://www.latrobe.edu.au/psy/esci/>) [18].

В данном примере имитируется извлечение случайных пар независимых выборок из двух нормальных распределений, разность средних значений между которыми составляет $\mu_{diff} = \mu_1 - \mu_2 = 10$ единиц. Проверяется нулевая гипотеза об отсутствии различий между средними обоих распределений $H_0: \mu_{diff} = 0$ против альтернативной гипотезы $H_1: \mu_{diff} \neq 0$. Можно видеть, что из 25 значений P_{val} только 11 не превышают самое что ни на есть снисходительное пороговое значение уровня значимости $\alpha = 0,05$; они отмечены звездочками согласно шкале Мишлена.

На рис. 1 указаны также 95%-е доверительные интервалы (ДИ) для разности средних μ_{diff} . Как известно, ДИ для разности средних являются средством визуализировать процедуру проверки подобных нулевых гипотез: если $(1 - \alpha) \times 100\%$ -й ДИ накрывает проверяемое значение $\mu_{diff} = 0$, то тогда у нас нет оснований сомневаться в гипотезе $H_0: \mu_{diff} = 0$ и отвергать ее; когда ДИ не накрывает значение $\mu_{diff} = 0$, тогда у нас появляется основание сомневаться в нулевой гипотезе $H_0: \mu_{diff} = 0$ и мы можем взять на себя смелость отвергнуть ее. Таких интервалов на Рис. 1. также 11 и они, естественно, соответствуют тем парам выборок, для которых $P_{val} < 0,05$. Однако, в отличие от «безликих» P -значений, ДИ гораздо более информативны - они отражают размер эффекта. Чем дальше ДИ отстоит от проверяемого значения $\mu_{diff} = 0$, тем больше размер эффекта, каковым в данном случае является наблюдаемая разность между средними значениями $(\mu_{diff})_{набл.}$.

Калибровка p -значения

Как уже было сказано, P -значение не может быть вероятностью нулевой гипотезы $P(H_0)$. Но именно вероятность нулевой гипотезы, очевидно, должна интересовать исследователя более всего. К сожалению традиционная частотническая статистика не способна вычислять эту вероятность. Это может делать бейзовская статистика. Уже относительно давно статистики-бейзовцы предложили калибровать P -значения относительно вероятности $P(H_0)$. В простейшем варианте удастся оценить не $P(H_0)$, а лишь ее нижнюю границу (минимально достижимое значение) $\underline{P(H_0)}$ [19,20]. Результат представлен в Табл. 1. Тонкость заключается в том, что *a priori* нулевая и альтернативная гипотезы (в силу действия принципа недоста-точного основания Лапласа) предполагаются равновероятными: $P(H_0) = P(H_1) = 1/2$. Таблица 1. Цена P -значения [19]

P -значение	Нижняя граница для вероятности нулевой гипотезы $P(H_0)$	Верхняя граница для вероятности воспроизведения $P_{воспр.}$
0,05	>30%	<50%
0,01	>10%	<75%
0,001	>2%	<90%

Для наглядности значения в таблице округлены до первой значащей цифры. Более точно значения для $\underline{P(H_0)}$ (сверху вниз) равны 29%, 11% и 1,8%.

Можно видеть, что при $P_{val} = 0,05$ нижняя граница для вероятности нулевой гипотезы $\underline{P(H_0)} = 0,30$, т.е. в этом случае $P(H_0)$ не может быть больше 30%. Очевидно, что такая высокая вероятность не может служить стимулом для сомнения в гипотезе H_0 . Соответственно, прав Колмогоров и его последователи, говоря, что $P_{val} = 0,05$ вряд ли можно считать сколь-

ко-нибудь убедительным доводом против гипотезы H_0 . Практически столь же мало убедительным доводом против гипотезы H_0 является и $P_{val} = 0,01$. При нем минимальное значение для вероятности нулевой гипотезы может достигать 10%: $P(H_0) = 0,10$.

Наконец, при $P_{val} = 0,05$ вероятность $P(H_0)$ может достигать 2%. Такую вероятность уже наверняка можно признать малой настолько, чтобы зародилось сомнение в H_0 . При этом не надо только забывать, что $P(H_0)$ есть всего лишь минимально достижимое значение, и в реальных ситуациях значения $P(H_0)$ могут быть неопределенно больше указанных в таблице нижних границ.

В последнем столбце Табл. 1 приведены ориентировочные значения для верхней границы вероятности воспроизведения наблюдаемого результата в последующей повторности эксперимента. Можно видеть, что опять-таки только при $P=0,001$ вероятность того, что этот результат воспроизведется, может достигать приемлемо высокого значения 90%.

Заключение

Надо перестать судорожно цепляться за уровень значимости $\alpha = 0,05$ (и скорее всего и за $\alpha = 0,01$) и не критично объявлять случаи его преодоления ($P_{val} < 0,05$) статистически значимыми (или даже «достоверными») явлениями. Если мы сконцентрируемся на преодолении уровня $\alpha = 0,001$, т.е. будем считать статистически значимыми $P_{val} < 0,001$, то в итоге сможем сэкономить массу времени и средств.

Единственный способ излечиться от синдрома статистической снисходительности – это многократно повторять эксперименты и изучать воспроизводимость наблюдаемых эффектов, которые при $P_{val} < 0,05$ слишком часто могут оказаться ложными.

Литература

1. International committee of medical journal editors: Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication. (Updated October 2008) (<http://www.icmje.org/index.html>).
2. Международный комитет редакторов медицинских журналов: Единые требования к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы: правила написания и редактирования материалов // *Межд. журн. мед. практики*, 2005. - № 5. - С. 10–23. (<http://www.mediasphera.ru/mjimp/2005/5/10.pdf>).
3. Леонов В.П. Принципы описания статистики в биомедицинских публикациях. (http://www.biometrica.tomsk.ru/stat_princip.pdf)
4. ГОСТР 52379-2005. Надлежащая клиническая практика». Good Clinical Practice (GCP).
5. Новые единые требования к рукописям, представляемым в научно-практический журнал «Экология Человека» // *Экология человека*, 2008. - № 7. - С. 57-64.
6. Wagenmakers E.-J. A practical solution to the pervasive problems of p values // *Psychonomic Bulletin & Review*, 2007. - Vol. 14.- № 5. - P. 779-804.
7. Fisher R.A. The design of experiments. Edinburgh: Oliver & Boyd 1935.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 1998. — 459 с.
9. P-value. Wikipedia. <http://en.wikipedia.org/wiki/P-value>
10. Goodman S. A dirty dozen: Twelve P-value misconceptions // *Semin. Hematol.*, 2008. - Vol. 45. – P. 135-140.
11. Dallal G.E. The Little Handbook of Statistical Practice. Why $P=0.05$? <http://www.jerrydallal.com/LHSP/p05.htm>
12. Колмогоров А. Н. Вероятность / Вероятность и математическая статистика. Энциклопедия / Гл. ред. Ю. В. Прохоров. — М.: Изд-во «Большая Российская Энциклопедия», 1999. – 910 с.
13. Колмогоров А.Н. Теория вероятностей / Математика, её содержание, методы и значение, 1956. М.: Изд-во АН СССР. Т. 2. Гл. 11. С. 252-284.

14. Sterne J.A.C., Davey Smith G. Sifting the evidence – what’s wrong with significance tests? // *BMJ*, 2001. - Vol. 322. - P. 227-231.
15. Colhoun H. M., McKeigue P. M., Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet*, 2003. - Vol. 361. - № 9360. – P. 865-872.
16. Fisher R. A. *Statistical Methods and Scientific Inference*. Edinburgh: Oliver & Boyd. 1956.
12. Зорин Н.А. О неправильном употреблении термина «достоверность» в российских научных психиатрических и общемедицинских статьях. 2000.
<http://www.biometrica.tomsk.ru/let1.htm>
18. Cumming G. Replication and p intervals: p values predict the future only vaguely, but confidence intervals do much better // *Persp. Psychol. Scie.*, 2008. - Vol. 3. – P. 286-300.
Программа ESCI PPS p intervals <http://www.latrobe.edu.au/psy/esci/>
19. Vovk V. G. A logic of probability, with application to the foundations of statistics // *J. Roy. Stat. Soc. Ser. B*, 1993. - Vol. B55. - No. 2. - P. 317-351.
20. Sellke T., Bayarri M.J., Berger J.O. Calibration of p values for testing precise null hypotheses // *Am. Statist.*, 2001. - Vol. 55. - No. 1. – P. pp. 62-71.

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА, У БОЛЬНЫХ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПРИ НАЛИЧИИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ Шмелева В.М., Капустин С. И., Кленкова Н.А., Блинов М.Н., Папаян Л.П.

ФГУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии» ФМБА России
Санкт-Петербург, 2-я Советская ул, дом 16
Тел.: +79219873503, e-mail: veronikashmeleva@yandex.ru

РЕЗЮМЕ: Обследовано 238 больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей и 260 человек контрольной группы. Уровень гомоцистеина (ГЦ) определяли методом жидкостной хроматографии под высоким давлением. Молекулярно-генетические исследования проводились методом ПЦР. Определяли аллельный полиморфизм 16 генов: факторов I, II, V, XII свертывания крови, тканевого активатора плазминогена –t-РА, ингибитора активатора плазминогена типа I - PAI-1, гликопротеинов Ia, Ib α , IIIa, тромбоцитарного рецептора АДФ- P2Y₁₂, метилентетрагидрофолатредуктазы – МТГФР, аполипопротеина E - ApoE, эндотелиальной синтазы оксида азота - eNOS, ангиотензиногена - AGT, ангиотензин-превращающего фермента - ACE, рецептора ангиотензина II первого типа – ATGR1. Частота встречаемости отдельных генотипов значительно отличалась у больных с нормальным и повышенным уровнем ГЦ. Носительство аллеля “1691A” гена фактора V (мутации FV Leiden) в гетерозиготном состоянии в два раза чаще отмечено у больных с ГГЦ по сравнению с контролем и с пациентами с нормальным уровнем ГЦ (10% против 5%, p<0,05). Среди пациентов с ГГЦ в 6 раз чаще выявлялись носители гомозиготного генотипа “46TT” гена фактора XII (6 % против 0 %, p=0,2). При ГГЦ выявлено двукратное снижение частоты носительства генотипа D/D гена ACE в сравнении с больными без ГГЦ (14% против 29%, p<0,005). У больных с ГГЦ по сравнению с пациентами без ГГЦ отмечалась более высокая частота носительства генотипа C/C в гене eNOS (17% против 6%, p=0,05). Выявлена тенденция к более высокой частоте встречаемости генотипа “ApoE E4/E4” (2,5% против 0%, p=0,2) Статистически значимые различия выявлены по распределению полиморфизмов тромбоцитарных рецепторов. У больных с ГГЦ носительство T аллеля гена “GpIb α ” отмечалось в 4 раза чаще, чем при нормальном уровне ГЦ (21% против 5,2%, p<0,05). Носительство TT генотипа гена “GpIa” при ГГЦ выявлено в 17% случаев против 7,6% в отсутствии ГГЦ (p<0,05). У больных с ГГЦ частота гетерозигот “P2Y₁₂ H1/H2” была в 2 раза выше (p<0,05), а гомозигот – более чем в 3 раза выше по сравнению с больными без ГГЦ.

Общепризнано, что тромбоз является мультифакторным процессом, в патогенезе которого участвуют как наследственные, так и приобретенные факторы риска. Среди потенциальных индукторов атеротромбоза фигурируют полиморфизмы генов, ассоциированные с нарушением липидного обмена, эндотелиальной дисфункцией, предрасполагающие к формированию артериальной гипертензии, кодирующие компоненты тромбоцитарного и плазменного звеньев гемостаза [5, 10].

Ген *GpIba* кодирует α -субъединицу гликопротеина Ib, в комплексе с *GpV* и *GpIX* образующего тромбоцитарный рецептор *GpIb/IX/V*, основным лигандом которого является фактор Виллебранда. Указанный рецептор играет важнейшую роль в адгезии при высоком напряжении сдвига. В условиях низкого напряжения сдвига адгезию тромбоцитов опосредует взаимодействие рецептора *GpIa/IIa* с коллагеном [8]. Высказывается предположение о роли данных полиморфизмов в увеличении риска развития тромботических проявлений [13]. Идентифицировано пять полиморфизмов ДНК в гене *P2Y12*. Предположительно протромботическим является гаплотип H2 гена *P2Y12* [5]. Полиморфизм *PAI/A2* в гене *GpIIIa* ассоциирован с повышенной агрегационной способностью тромбоцитов [13]. Полиморфизм *G/A-455* в гене фактора I способствует повышению уровня фибриногена, а полиморфизм *4G/5G-675* в гене ингибитора активатора плазминогена 1 (*PAI-1*) частично определяет уровень *PAI-1* в плазме и может фенотипически проявляться угнетением фибринолитической активности крови. Однако, данные о влиянии полиморфизма указанных генов на риск развития тромбозов крайне противоречивы. Большинство крупных исследований, в том числе *ESTIM*, *US Physician Health Study*, *SMILE*, не выявили прямой зависимости между носительством рассматриваемых генетических детерминант и развитием тромботических осложнений [10]. Известно, что на фенотипическое проявление наследственных предпосылок тромбообразования существенное влияние оказывают факторы окружающей среды и взаимодействие с метаболическими показателями организма индивидуума. Принимая во внимание данные о таких патологических эффектах избытка гомоцистеина (ГЦ) как угнетение фибринолиза, активация тромбоцитарного звена гемостаза, усиление продукции провоспалительных цитокинов [6], можно предположить участие гипергомоцистеинемии (ГГЦ) в реализации протромботического потенциала отдельных генетических детерминант. Учитывая, что основной точкой приложения токсических эффектов ГЦ является эндотелий сосудов [2], особый интерес представляет распределение у больных с ГГЦ аллельных вариантов генов аполипопротеина E (*ApoE*), эндотелиальной синтазы оксида азота (*eNOS*), ангиотензиногена (*AGT*), ангиотензин превращающего фермента (*ACE*), рецептора ангиотензина II первого типа (*ATGR1*). По литературным данным полиморфизмы перечисленных выше генов в той или иной мере ассоциированы с эндотелиальной дисфункцией [13]. Вопросы взаимодействия повышенного

уровня ГЦ с наследственными факторами риска артериальных тромбозов на данный момент изучены недостаточно.

Целью настоящего исследования было изучение особенностей распределения аллельного полиморфизма генов, кодирующих компоненты системы гемостаза, у больных с атеросклеротическим поражением периферических сосудов при наличии гипергомоцистеинемии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 238 больных (198 мужчин и 40 женщин) облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (ОАНК) в возрасте от 43 до 76 лет. Средний возраст обследованных больных составил $58,6 \pm 9,0$ лет (пациентов мужского пола - $58,4 \pm 8,9$ года, женского пола - $61,6 \pm 6,7$ года). Контрольную группу составили 260 человек, сопоставимых по полу и возрасту, не имеющих в анамнезе сердечно-сосудистых заболеваний. Материалом для исследования являлась венозная кровь. Концентрацию ГЦ в плазме измеряли методом жидкостной хроматографии под высоким давлением с флуоресцентной детекцией [3]. Уровень ГЦ в плазме выше $13,5$ мкмоль/л (90% процентиль в контрольной группе) расценивали как гипергомоцистеинемию. Молекулярно-генетическое тестирование выполнялось методом ПЦР. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программ Statistica 6.0 и Stat Pad Prism (версия 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частота ГГЦ и средний уровень ГЦ у больных ОАНК статистически значимо превысили соответствующие показатели в контрольной группе (табл. 1). Генотипирование факторов I, II, V, XII свертывания крови, фермента MTHFR, ApoE, eNOS, AGT, ACE, ATGR1, t-PA, PAI-1, а также гликопротеинов Ia, Iba, IIIa и тромбоцитарного рецептора P2Y12, показало, что больные ОАНК в 100% случаев являлись носителями одного и более потенциально протромботического полиморфизма. Частота аллелей, усиливающих гемостатический потенциал, у больных ОАНК в целом практически не отличалась от таковой в контроле. В то же время при сравнении распределения полиморфных вариантов у больных с нормальным и повышенным уровнем ГЦ выявлены определенные закономерности.

Так, достаточно четкие и однонаправленные тенденции можно проследить в распределении полиморфизмов “GpIba 434C/T”, “P2Y12 H1/H2” и “GpIa807 C/T”, кодирующих компоненты тромбоцитарных рецепторов (табл.2). В подгруппе больных с повышенным уровнем ГЦ гомозиготное носительство T аллеля гена “GpIba ” отмечалось в 2 раза, а гетерозиготное – более чем в 3 раза чаще, чем при нормальном уровне ГЦ. Носительство генотипа TT гена “GpIa” при ГГЦ выявлено в 2,2 раза чаще. В группе больных с ГГЦ доля гетерозигот “P2Y12 H1/H2” в 2 раза превышала таковую у лиц с нормальным уровнем ГЦ, а гомозигот – более чем в 3 раза. Обнаружение указанных ассоциаций может свидетельствовать о патогенетической значимости в развитии атеротромбоза одновременного носительства генетиче-

ских дефектов, способных влиять на функциональную активность тромбоцитарного звена гемостаза, и ГГЦ.

Полиморфизм “807C/T” в гене GpIa ассоциирован с увеличением количества экспрессированных на мембране тромбоцитов молекул рецептора GpIa/IIa, основным лигандом которого является коллаген – компонент субэндотелиального матрикса. Взаимодействие GpIa/IIa с коллагеном в месте повреждения сосудистой стенки инициирует первичную адгезию тромбоцитов в условиях как низких, так и высоких скоростей сдвига кровяного потока [8]. Гипергомоцистеинемия является доказанной предпосылкой повреждения сосудистого эндотелия [6]. Сочетание ГГЦ и носительства аллеля “GpIa 807T” и/или “GpIbα 434T” может усиливать адгезию тромбоцитов с их последующей активацией, высвобождением содержимого гранул, обратимой и необратимой агрегацией. Аллель “H2” гена P2Y12, возможно, также потенцирует риск атеротромбоза при наличии ГГЦ. Роль рецептора P2Y12 в процессе активации тромбоцитов, их необратимой агрегации и стабилизации образовавшегося тромба доказана как экспериментальными данными, так и эффективным применением блокаторов P2Y12. Помимо снижения внутриклеточного содержания цикло-аденозин-монофосфата (цАМФ), передача сигнала через P2Y12 приводит к активации рецептора GpIIb/IIIa на тромбоцитарной мембране [4].

Определенную неравномерность распределения можно отметить и для некоторых полиморфизмов в генах, кодирующих коагуляционные факторы гемостаза и фибринолиз (табл. 3). Носительство аллеля “1691A” гена фактора V в гетерозиготном состоянии в два раза чаще отмечено у больных с ГГЦ по сравнению с контролем и с пациентами с нормальным уровнем ГЦ. Наличие статистической значимости полученных данных свидетельствует о синергичном влиянии ГГЦ и мутации FV Leiden не только на развитие венозного тромбоза, но и на индукцию атеротромботического процесса. Среди пациентов с ГГЦ в 6 раз чаще выявлялись носители гомозиготного генотипа “46TT” гена фактора XII (6 % против 0 %, $p=0,2$). Поскольку фактор XII является активатором плазминогена [9], снижение его уровня в плазме у гомозиготных носителей аллеля “FXII 46T” может сопровождаться снижением фибринолитической активности крови. Значимая роль FXII в развитии атеротромбоза может быть следствием не-достаточной эффективности t-РА-зависимого фибринолиза в отношении тромбов, богатых тромбоцитами.

Достаточно неожиданные результаты дало типирование генов ренин-ангиотензиновой системы (табл. 4). У больных с ОАНК в целом, а при ГГЦ – в большей степени, прослеживается тенденция к снижению частоты носительства генотипа C/C гена ATGR. При ГГЦ выявлено двукратное снижение частоты носительства генотипа D/D гена ACE в сравнении с контролем и больными без ГГЦ. Возможно, наблюдаемый феномен связан с неблагоприятной

прогностической ролью одновременного носительства этого полиморфизма и ГГЦ у пациентов с ОАНК.

Интересно, что среди пациентов с ГГЦ доля носителей генотипа ТТ гена МТГФР была практически идентична таковой в здоровой популяции и среди больных с нормальным уровнем ГЦ, а доля гетерозиготных носителей Т аллеля была недостоверно выше. Такой результат предполагает превалирование приобретенных форм ГГЦ у больных с ОАНК.

Тенденция к повышению частоты аллеля “АроЕ Е4” у пациентов с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей укладывается в существующие представления о патогенезе атеросклероза. Полиморфизм в гене АроЕ рассматривается в настоящее время как один из важнейших генетических факторов, определяющих особенности липидного спектра у индивида и влияющих на риск развития атеросклероза и тромбоза [11]. Изоформа “АроЕ Е4” является более чувствительной к окислению в сравнении с “АроЕ Е3” и “АроЕ Е2”, т.к. не содержит свободных сульфгидрильных групп, а окислительный потенциал избыточных количеств ГЦ хорошо доказан [7]. Кроме того, ускоренное формирование атеросклеротических повреждений при сочетании наследственных нарушений липидного обмена и метаболизма ГЦ показано на генетических моделях [6]. Следовательно, ассоциация между ГГЦ и носительством изоформы “АроЕ Е4”, выявленная у больных ОАНК, достаточно закономерна.

У больных с ГГЦ по сравнению с пациентами без ГГЦ отмечалась более высокая частота носительства генотипа С/С в гене eNOS (17% против 6%, $p=0,05$). Снижение активности eNOS у носителей варианта “-786С” может препятствовать защите сосудистой стенки от избытка ГЦ посредством формирования нитрозотиолов, а также действовать синергично с ГГЦ в развитии оксидантного стресса. Эндотелиальная синтаза оксида азота при определенных условиях участвует в продукции супероксида O_2^- [14]. Одной из причин данного феномена, известного как “разобщение реакции eNOS”, является дефицит тетрагидробиоптерина. Окисление активной формы тетрагидробиоптерина (BH_4) до дигидробиоптерина (BH_2) и других метаболитов семейства птеринов приводит к сдвигу функциональной активности eNOS в сторону продукции O_2^- [1].

Таким образом, носительство аллелей, усиливающих гемостатический потенциал, чаще отмечалось у больных с ГГЦ, чем у больных с нормальным уровнем ГЦ, что свидетельствует о влиянии избытка ГЦ на фенотипическое проявление проатерогенного и протромбогенного потенциала изученных генетических детерминант. Сочетание генетических вариантов, ассоциированных с риском развития эндотелиальной дисфункции и усиления адгезивно-агрегационных реакций кровяных пластинок с опосредованными ГГЦ механизмами повреждения сосудистой стенки (оксидантный стресс, активация металлопротеиназ и росто-

вых факторов, усиление процессов клеточной миграции и пролиферации.), может усиливать предрасположенность к развитию облитерирующего атеросклероза.

Выводы. Сочетание ГГЦ с генетическими факторами, предрасполагающими к развитию эндотелиальной дисфункции и активации тромбоцитарного звена гемостаза, способствует развитию атеротромбоза. Установление индивидуального профиля риска, подразумевающего не только выявление у пациента наследственных и приобретенных протромботических факторов, но и оценку их взаимодействия, способствует повышению эффективности профилактики тромбообразования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chalupsky K., Cai H. Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 9056-9061.
2. Chambers J.C., Ueland P.M., Obeid O.A. et al. Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: an effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine // *Circulation.* – 2000. – Vol. 102. – P. 2479–2483.
3. Fiskerstrand Y., Refsum H., Kvalheim G., Ueland P., Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability // *Clinical Chemistry.* – 1993. - Vol. 39. - P. 263-271.
4. Fontana P., Dupont A., Gandrille S. et al. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P₂Y₁₂ gene sequence variations in healthy subjects // *Circulation.* – 2003. – Vol. 108. – P. 989-995.
5. Kottke-Marchant K. Genetic polymorphisms associated with venous and arterial thrombosis // *Arch Pathol Lab Med.* – 2002. – Vol. 126. – P. 295-304.
6. Lentz SR. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis // *J Thromb Haemost.* - 2005. – Vol. 3. – P. 1646–1654.
7. Loscalo J. The oxidant stress of Hyperhomocysteinemia // *J.Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 98. – P. 5-7.
8. Nurden A.T. Polymorphisms of Human Platelet Membrane Glycoproteins: Structure and Clinical Significance // *Thromb Haemost.* – 1995. – Vol. 74 – P.345-351.
9. Schousboe I., Feddersen K., Rojkaer R. Factor XIIa is a kinetically favorable plasminogen activator // *Thromb. Haemost.* – 1999. – Vol. 82. – P. 1041-1046.
10. Simmonds R.E., Hermida J., Rezende S.M., Lane D.A. Hemostatic genetic risk factors in arterial thrombosis // *Thromb Haemost.* – 2001. – Vol. 86. – P. 374-385.
11. Smith J.D., Miyata M., Poulin S.E. et al. The relationship between apolipoprotein E and serum oxidation-related variables is apolipoprotein E phenotype dependent // *Int. J. Clin. Lab. Res.* – 1998. – Vol. 28. – P. 116-121.
12. Smith N., Bis J., Biagiotti S. et al. Variation in 24 hemostatic genes and associations with non-fatal myocardial infarction and ischemic stroke // *J Thromb Haemost.* – 2008. – Vol. 6. – P. 45 – 53.
13. Voetsch B., Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 216-229.
14. Xia, Y., Dawson, V. L., Dawson, T. et al. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – Vol. 93. – P. 6770–6774.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ:

Таблица 1.

Результаты диагностики уровня гомоцистеина в исследуемых группах

Показатель	Обследуемые группы	
	Контроль	ОАНК
Уровень ГЦ, мкмоль/л, M±SD	9,8±2,7	17,1±12,4*
ГЦ, (%)	8,6	55*

* - достоверное различие между группами, $p < 0,001$

Таблица 2.

Частота встречаемости полиморфизма генов (%), кодирующих компоненты тромбоцитарных рецепторов

Полиморфизм	Генотип	Контроль	Пациенты	
			с ГЦ	без ГЦ
GpIa 807 C/T	C/C	39,9	44	52,4
	C/T	43	39	40
	T/T	17,1	17**	7,6* **
GpIbα 434 C/T	C/C	83,6	81	94,8
	C/T	16	17**	5,2**
	T/T	0,4	2	0
GpIIIa 1565 T/C	T/T	67,1	76	71
	C/T	32	22,8	27
	C/C	0,9	1,2	2
P2Y12 H1/H2	H1/H1	72,6	61	83,4
	H1/H2	24	35,6**	16,6**
	H2/H2	3,4	3,4	0

Примечание. Здесь и далее

* - достоверное различие с контрольной группой, $p \leq 0,05$

** - достоверное различие между группами с нормальным и повышенным уровнем ГЦ, $p \leq 0,05$

Таблица 3.

Частота встречаемости полиморфизма генов (%), кодирующих компоненты плазменного звена гемостаза

Полиморфизм	Генотип	Контроль	Пациенты	
			с ГГЦ	без ГГЦ
Фактор I -455 G/A	G/G	55,7	68	53
	G/A	36,4	21	39
	A/A	7,9	11	8
Фактор II 20210 G/A	G/G	97,8	98	97
	G/A	2,2	2	3
	A/A	0	0	0
Фактор V 1691 G/A	G/G	95,6	90	95
	G/A	4,4	10* **	5**
	A/A	0	0	0
Фактор XII 46 C/T	C/C	45,8	53,4	66
	C/T	47,7	40,0	34
	T/T	6,5	6,6	0
PAI-1 -675 4G/5G	5G/5G	17,6	18	17
	4G/5G	46,9	36,5	39
	4G/4G	35,5	45,5	44
TRA 311 I/D	D/D	23,4	24	29
	I/D	47,4	48	47
	I/I	29,2	28	24

Таблица 4.

Частота встречаемости полиморфизма генов (%), кодирующих компоненты ренин-ангиотензиновой системы и функцию эндотелия

Полиморфизм	Генотип	Контроль	Пациенты	
			с ГГЦ	без ГГЦ
MTGFР 677 C/T	C/C	50,4	36,7	56,4
	C/T	39,5	53**	34**
	T/T	10,1	10,3	9,6
eNOS -786 T/C	T/T	38,6	43	45
	C/T	47	40	49
	C/C	14,4	17**	6**
AGT 704 T/C	T/T	27,6	23	26
	C/T	46,1	43	38
	C/C	26,3	33	32
ACE 287 I/D	I/I	25	40	28
	I/D	48,7	46	43

Полиморфизм	Генотип	Контроль	Пациенты	
	D/D	26,3	14**	29**
ATGR 1166 A/C	A/A	56,1	58,8	58
	A/C	36,9	40	40
	C/C	7	1,2	2
ApoE	E2E2	0,4	1,0	0
	E2E3	18	14	10
	E2E4	0,9	1,2	0
	E3E3	61	56,5	67
	E3E4	17,5	26	23
	E4E4	2,2	2,5	0