

Главный редактор
ГИНТЕР Е.К.
академик РАМН

Ответственный секретарь
редакции
ИЖЕВСКАЯ В.Л.
д.м.н.

Редакционная коллегия

БАРАНОВ В.С.
чл.-корр. РАМН
ДУРНЕВ А.Д.
чл.-корр. РАМН
ИЛЛАРИОШКИН С.Н.
д.м.н., профессор
КОЗЛОВА С.И.
д.м.н., профессор
ЛИМБОРСКАЯ С.А.
д.б.н., профессор
МИХАЙЛОВА Л.К.
д.м.н., профессор
НАЗАРЕНКО Л.П.
д.м.н., профессор
НОВИКОВ П.В.
д.м.н., профессор
ПУЗЫРЕВ В.П.
академик РАМН
РУБЦОВ Н.Б.
д.б.н., профессор
ХУСНУТДИНОВА Э.К.
д.б.н., профессор

Редакционный совет

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

Издатель:
ООО Издательство «Гениус Медиа»

Адреса редакции:

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

Внимание авторов и читателей:

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

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

Тираж 200 экз.

Медицинская ГЕНЕТИКА

Ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал

2013 г. Том 12. №10 (136)

СОДЕРЖАНИЕ

Материалы научной конференции

«Актуальные проблемы клинической генетики редких болезней»,
Москва, 5—6 декабря 2013 г.

Степанова А.А., Поляков А.В. Молекулярная диагностика и генетическая гетерогенность гиперфенилаланемий	3
Карева М.А., Блох С.П., Иванова О.Н., Петеркова В.А. Эпидемиология и генетика аденогенитального синдрома	7
Мешков А.Н. Регистр больных с семейной гиперхолестеринемией	12

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

Доминова И.Н., Парадник Д.Ю., Патрушев М.В., Тоцаков С.В. Современные методы неинвазивной пренатальной диагностики анеуплоидий	16
---	----

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мирошникова В.В., Пантелеева А.А., Демина Е.П., Курьянов П.С., Вавилов В.Н., Уразгильдеева С.А., Гуревич В.С., Сироткина О.С., Шварцман А.Л. Ассоциация полиморфных вариантов гена транспортера ABCG1 с концентрацией холестерина плазмы крови при атеросклерозе	23
Ахмадишина Л.З., Корытина Г.Ф., Кочетова О.В., Урманцев М.Ф., Измайлов А.А., Измайлова С.М., Павлов В.Н., Викторова Т.В. Поиск маркеров риска развития рака мочевого пузыря на основе изучения полиморфных вариантов генов системы <i>Ahr-CYP</i>	29
Ворожищева А.Ю., Трифонова Е.А., Бутко Ю.К., Сереброва В.Н., Максимова Н.Р., Павлова К.К., Габидулина Т.В., Степанов В.А. Роль генетической вариабельности локуса <i>ACVR2A</i> в формировании подверженности преэклампсии	35

Тексты материалов научной конференции «Актуальные проблемы клинической генетики редких болезней» приводятся в авторской редакции.

Конференция проводится при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект №13-04-06121 г.

Editor-in-Chief
GINTER E.K.

Secretary
IZHEVSKAYA V.L.

Editorial Board

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

Editorial Council

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

Publisher: Genius Media, LLC

Medical GENETICS

Monthly reviewed scientific and practical journal

2013. Volume 12. №10 (136)

Content

Scientific conference
«Actual problems of clinical genetics of the rare diseases»,
Moscow, 5—6 December 2013

- Stepanova A.A., Poliakov A.V.**
Molecular diagnostics and genetic heterogeneity
of hyperphenylalaninurias3
- Kareva M.A., Blokh S.P., Ivanova O.N., Peterkova V.A.**
Epidemiology and genetics of congenital adrenal hyperplasia7
- Meshkov A.N.**
Register of patients with familial hypercholesterolemia12

REVIEWS

- Dominova I.N., Paradnik D.Ju.,
Patrushev M.V., Toshchakov S.V.**
Modern methods of noninvasive prenatal diagnosis
of aneuploidies16

ARTICLES

- Miroshnikova V.V., Panteleeva A.A., Demina E.P.,
Kurjanov P.S., Vavilov V.N., Urazgildeeva S.A.,
Gurevich V.S., Sirotkina O.S., Schwarzman A.L.**
Association of ABCG1 transporter genetic variation
with plasma cholesterol concentration in atherosclerosis23
- Akhmadishina L.Z., Korytina G.F., Kochetova O.V.,
Urmantsev M.F., Izmailov A.A., Izmailova S.M.,
Pavlov V.N., Viktorova T.V.**
Bladder cancer markers searching based
on the *Ahr-CYP* system gene polymorphisms trial29
- Vorozhischeva A.Y., Trifonova E.A., Butko Y.K.,
Serebrova V.N., Maksimova N.R., Pavlova K.K.,
Gabidulina T.V., Stepanov V.A.**
Genetic variability of the *ACVR2A* locus in the structure
of hereditary predisposition to complications of pregnancy35

Молекулярная диагностика и генетическая гетерогенность гиперфенилаланиемий

Степанова А.А., Поляков А.В.

ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, 115478, Москва, ул. Москворечье, 1, e-mail: mgnc@med-gen.ru

Представлены результаты молекулярно-генетического исследования генов фенилаланингидроксилазы (*PAH*), пирuvoилтетрагидроптерин синтетазы (*PTS*), дигидроптеринредуктазы (*QDPR*) в группе российских больных. Всего было исследовано 1100 неродственных больных с направляющим диагнозом *фенилкетонурия*. Разработаны простые, быстрые и надёжные методы идентификации частых мутаций в генах *PAH* и *PTS*. Установлена информативность поиска частых мутаций в гене *PAH* — 81,1% и гене *PTS* — 70%. Определено, что при заболеваниях, сопровождающихся повышенным содержанием фенилаланина в крови, мутации в гене *PAH* встречаются в 95,6% и в гене *PTS* — не менее чем в 1,2% случаев. Разработан алгоритм молекулярно-генетической диагностики больных с различными причинами гиперфенилаланиемии.

Ключевые слова: гиперфенилаланинемия, фенилкетонурия, недостаточность тетрагидробиоптерина, ген *PAH*, ген *PTS*

Введение

Повышенные концентрации фенилаланина в крови могут наблюдаться при таких наследственных заболеваниях, как фенилкетонурия — аутосомно-рецессивное заболевание, вызываемое мутациями в гене фенилаланингидроксилазы (*PAH*), и гиперфенилаланиемии (ГФА) вследствие недостаточности тетрагидробиоптерина (ВН4) типа А, В, С и D — аутосомно-рецессивные заболевания, вызываемые мутациями в генах 6-пирувоилтетрагидроптерин синтетазы (*PTS*), GTP-циклогидролазы I (*GCH1*), дигидроптеринредуктазы (*QDPR*), птерин-4-карбиноламиндегидрогеназы I (*PCBD1*), соответственно.

Фенилкетонурия (ОМIM 261600) — наиболее частое аутосомно-рецессивное заболевание обмена аминокислот. Частота данного заболевания колеблется в различных странах и составляет от 1 на 2600 новорождённых в Турции до 1 на 200 тыс. новорождённых в Финляндии. Ген *PAH* был идентифицирован в 1985 г. на длинном плече хромосомы 12 в области q22-24.1 [9], протяжённостью около 90 т.п.н., включает 13 экзонов и кодирует белок фенилаланингидроксилазу, состоящий из 451 аминокислотного остатка.

Гиперфенилаланинемия, вследствие недостаточности тетрагидробиоптерина типа А (НРАВН4А) (ОМIM 261640) — редкое аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное недостаточностью фермента — 6-пирувоилтетрагидробиоптерин синтетазы (PTPS), участвующего во втором шаге синтеза тетрагидробиоптерина. Ген *PTS* расположен на длинном плече хромосомы 11 в районе q22.3-23.3 [8].

Ген протяжённостью около 8 т.п.н. содержит 6 экзонов. Среди гиперфенилаланиемий, обусловленных недостаточностью тетрагидробиоптерина, недостаточность PTPS — наиболее частое и наиболее клинически гетерогенное заболевание [5], — на сегодняшний день в гене описано 53 мутации [11].

Гиперфенилаланинемия вследствие недостаточности тетрагидробиоптерина типа В (НРАВН4В) (ОМIM 233910) — аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное недо-

статочностью GTP-циклогидролазы I (GTPCH), первого фермента в биосинтезе тетрагидробиоптерина, катализирующего превращение GTP в 7,8-дигидроптеринтрифосфат. Ген *GCH1* расположен на длинном плече хромосомы 14 в районе q22.1-22.2, содержит 6 экзонов и кодирует белок, содержащий 250 аминокислотных остатков [6]. На сегодняшний день в гене описаны 144 мутации, включая крупные делеции, захватывающие от одного экзона до целого гена [11], большинство из них приводит не к НРАВН4В, а к ДОФА-зависимой дистонии (ОМIM 128230).

Гиперфенилаланинемия вследствие недостаточности тетрагидробиоптерина типа С (НРАВН4С) (ОМIM 261630) — редкое аутосомно-рецессивное нарушение обмена веществ. Заболевание наблюдается при нарушении синтеза дигидроптеринредуктазы (DHPR) — фермента, участвующего в регенерации ВН4. Ген *QDPR* расположен на коротком плече хромосомы 4 в области p15.3, имеет протяжённость более 20 т.п.н., включает 7 экзонов [7]. На сегодняшний день в гене описано 38 мутаций, приводящих к гиперфенилаланиемии вследствие недостаточности ВН4 типа С [11].

Гиперфенилаланинемия вследствие недостаточности тетрагидробиоптерина типа D (НРАВН4D) (ОМIM 264070) — редкое аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное недостаточностью фермента, участвующего в регенерации ВН4 — птерин-4-карбиноламиндегидрогеназы. Ген *PCBD1* протяжённостью 11,9 т.п.н. содержит 4 экзона и расположен на длинном плече хромосомы 10 в районе q22 [10]. В гене описано 10 мутаций, приводящих к НРАВН4D [10].

С конца 80-х годов в России проводится скрининг новорождённых на фенилкетонурию. Однако повышение уровня фенилаланина (ФА) в пятнах крови наблюдается как при классической ФКУ, в лечении которой можно ограничиться назначением диеты с пониженным содержанием ФА, так и при всех типах гиперфенилаланиемий, для лечения которых помимо диеты (которая не эффективна для профилактики неврологических на-

рушений) необходимо назначение лечения для коррекции неврологической симптоматики, вызванной недостатком катехоламинов и серотонина.

При повышении ФА, выявленном на скрининге, для дифференцировки классической ФКУ от ГФА, вследствие недостаточности ВН4, необходимо провести определение птеринов в моче, нагрузочный тест с ВН4 и активности ДННР в пятнах крови [5].

Учитывая, что биохимической диагностики недостаточности ВН4 в настоящее время в России не существует, целью данного исследования было создание эффективного молекулярно-генетического алгоритма диагностики классической ФКУ и ГФА вследствие недостаточности ВН4.

Материалы и методы

Для анализа были получены образцы крови от больных ФКУ и их родственников из 1100 неродственных семей.

ДНК была выделена из лимфоцитов периферической крови и пятен крови на фильтрах посоедством набора реагентов D1Atom™ DNAPrep100 (Россия). Выделение ДНК проводили, согласно протоколу фирмы-производителя.

Для регистрации наиболее частых мутаций в генах *PAH* и *PTS* использовали метод, основанный на аллель-специфичном лигировании с последующей амплификацией.

Лигазная реакция проводилась в 5 мкл реакционной смеси, содержащей 1х реакционный буфер (20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 20 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,1% Igepal, 0,01 мМ гАТР, 1 мМ ДТТ), 24 специфичные пробы (по три на каждую мутацию) для регистрации мутаций в гене *PAH* или 9 специфичных проб для регистрации мутаций в гене *PTS*, 0,04 единицы активности термофильной ДНК-лигазы Pfu («Stratagene»), 0,1–1 мкг геномной ДНК, 20–30 мкл минерального масла, на программируемом термоциклере MC2 производства фирмы «ДНК-технология». Реакция лигирования проводилась в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 мин, затем лигирование при 59°C — 1 ч. После лигазной реакции проводилась полимеразная цепная реакция (ПЦР) на программируемом термоциклере MC2 производства фирмы «ДНК-технология» (Россия) с использованием ДНК-полимеразы Biotaq («БиоМастер»), в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1х реакционный буфер (67 мМ Tris-HCl, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Twin-20), 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 1,5 единицы термофильной ДНК-полимеразы, 20–30 мкл минерального масла. Реакция амплификации проводилась в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 мин, затем 32 цикла смены температур: 94°C — 2 с, температура отжига праймеров 66°C — 2 с, элонгация цепи 72°C — 2 с; заключительная элонгация 72°C — 7 мин. Для проведения ПЦР использовался режим точной регуляции. Электрофорез в полиакриламидном геле длиной 20 см, толщиной 1 мм про-

водили при комнатной температуре, напряжённости 5 В/см с использованием в качестве электрофорезного буфера 1хТВЕ в течение 3 ч. После электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл в 1хТВЕ) и визуализацией в проходящем УФ-свете при длине волны 312 нм.

Анализ всей кодирующей последовательности и областей экзон-интронных соединений генов *PAH*, *PTS* и *QDPR* проводили методом прямого автоматического секвенирования на приборе фирмы «Applied Biosystems» согласно протоколу фирмы-производителя.

Дизайн олигонуклеотидных проб для лигирования и праймеров для амплификации осуществлён в лаборатории ДНК-диагностики ФГБУ «МГНЦ РАМН», синтез — в ООО «Евроген» и ЗАО «Синтол», Москва.

Результаты

На первом этапе данной работы, исследуя группу из 302 неродственных больных ФКУ, были определены спектр наиболее частых мутаций в гене *PAH*: p.Arg408Trp (61,4%), p.Pro281Leu (4,97%), IVS10-11g>a (4,14%), p.Arg261Gln (3,31%), IVS12+1g>a (2,32%), p.Arg252Trp (1,82%), p.Arg158Gln (1,7%), IVS4+5g>t (1,5%) [1] и повторяющиеся мутации в гене *PTS*: p.Asn72Lys, p.Thr106Met и p.Ser32Gly [2].

На следующем этапе работы была создана новая диагностическая система поиска наиболее частых мутаций в гене *PAH* (рис. 1), основанная на методе аллель-специфичного лигирования с последующей амплификацией (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification — MLPA) [Web-site: MRC-Holland (www.mrc-holland.com)], в основе которого лежит свойство лигазы восстанавливать фосфодиэфирные связи в одноцепочечных разрывах двухцепочечных молекул ДНК [3]. Используя данную систему, у 1100 больных ФКУ был проведён поиск мутаций p.Arg408Trp, p.Pro281Leu, IVS10-11g>a, p.Arg261Gln, IVS12+1g>a, p.Arg252Trp, p.Arg158Gln, IVS4+5g>t в гене *PAH*. Суммарная аллельная частота исследуемых мутаций составила 81%. У 87 больных в исследуемой выборке не было обнаружено мутаций в гене *PAH* ни на одной хромосоме. Однако, исходя из среднего значения информативности исследования, по закону Харди—Вайнберга, мы не должны были обнаружить ни одной мутации у 39 больных, что достоверно отличается от полученных результатов (p<0,05). Таким образом, было высказано предположение о наличии в исследуемой выборке больных ГФА, молекулярно-генетическая причина заболевания находится не в гене *PAH*, а в генах тетрагидробиоптеринового обмена.

Для проверки данной гипотезы была создана диагностическая система поиска повторяющихся мутаций в гене *PTS* — p.Asn72Lys, p.Thr106Met и p.Ser32Gly (рис. 2). Данная система, основанная на методе аллель-специфичного лигирования с последующей амплификацией, является простым, быстрым, надёжным и дешёвым методом идентификации частых мутаций в гене *PTS* у больных с гиперфенилаланинемией.

У 87 больных, у которых не было обнаружено мутаций в гене *PAH* ни на одной из хромосом, был проведён поиск повторяющихся мутаций в гене *PTS*. Было обнаружено 9 больных с мутациями в гене *PTS* хотя бы на одной из хромосом. У больных с обнаруженной мутацией на одной хромосоме было проведено секвенирование всей кодирующей последовательности гена *PTS*. У пятерых больных была обнаружена вторая мутация. У троих больных второй мутации выявить не удалось, это можно объяснить тем, что в гене *PTS* описаны мутации, приводящие к нарушению сайта сплайсинга, находящиеся глубоко в интронах [4]. Таким образом, из выборки с направляющим диагнозом ФКУ мы выявили 9 больных с мутациями в гене *PTS*.

Также было проведено секвенирование всей кодирующей последовательности гена *PTS* и *QDPR* у пяти больных с направляющим диагнозом ГФА вследствие недостаточности ВН4 (таблица). У троих больных были выявлены различные мутации в компаунд-гетерозиготном состоянии с одной из мутаций, входящих в систему регистрации частых мутаций в гене *PTS*. У одного больного, родители которого состояли в близкородственном браке, выявлена мутация p.Val112Ala в гене *PTS* в гомозиготном состоянии.

В гене *QDPR* была обнаружена мутация p.Ala135Asp в гомозиготном состоянии у одного больного НРАВН4D, родители которого состояли в близкородственном браке.

Таким образом, нами подтверждён диагноз НРАВН4А у 13 больных, и НРАВН4D у одного больного.

Информативность системы регистрации частых мутаций в гене *PTS* составила 70%. Две мутации встретились с наивысшей аллельной частотой — 34% — мутация p.Thr106Met у восьми больных и 19% — мутация p.Asn72Lys у пятерых больных. Мутация p.Ser32Gly, встретившаяся дважды при секвенировании гена *PTS*, больше не была обнаружена ни у одного больного. Остальные мутации, обнаруженные при секвенировании гена *PTS*, встретились по одному разу. Следовательно, только мутации p.Thr106Met и p.Asn72Lys являются частыми у российских больных НРАВН4А.

Таким образом, нами определено, что у больных в РФ с повышенным содержанием ФА в крови причиной заболевания были мутации в гене *PAH* не менее чем в 95,6% случаев. Доля больных, причиной заболевания у которых являются повреждения в генах тетрагидриоптеринового обмена, — не более 4,4%; доля больных НРАВН4А — не менее 1,2%.

Таким образом, при повышенном содержании ФА в крови целесообразно проводить молекулярно-генетическое исследование по следующей схеме:

I. Поиск восьми наиболее частых мутаций в гене *PAH*.

А) При обнаружении обеих мутаций в гене *PAH* с помощью системы наиболее частых мутаций диагноз ФКУ подтверждается на молекулярно-генетическом уровне, семья является информативной, возможны проведение

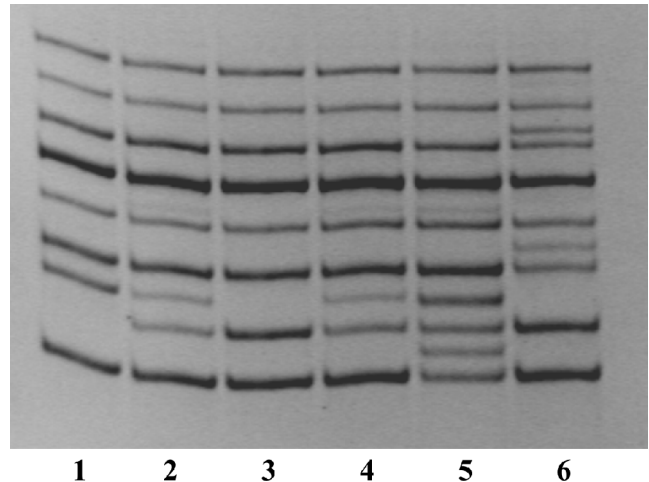


Рис. 1. Система регистрации наиболее частых мутаций в гене *PAH* методом MLPA-анализа:

дорожка 1 — p.Arg408Trp/p.Arg408Trp; дорожка 2 — p.Arg408Trp/N; дорожка 3 — N/N; дорожка 4 — p.Arg408Trp/N; дорожка 5 — p.Arg408Trp/IVS4+5g>t; дорожка 6 — p.Arg158Gln/ p.Arg252Trp

пренатальной диагностики и выявление гетерозиготных носителей в семье. При использовании данной системы, у 96% пробандов выявляется мутация хотя бы на одной из хромосом.

Б) При обнаружении одной мутации в гене *PAH* с помощью системы наиболее частых мутаций диагноз можно подтвердить по совокупности молекулярно-генетического и клинического обследования. Таким образом, возможны проведение пренатальной диагностики и выявление гетерозиготных носителей в этих семьях;

II. Секвенирование кодирующей последовательности гена *PAH*.

При отсутствии наиболее частых мутаций в гене *PAH* или при наличии одной мутации и неясной клинической симптоматике для подтверждения диагноза необходимо провести поиск мутаций во всей кодирующей последовательности гена *PAH*;

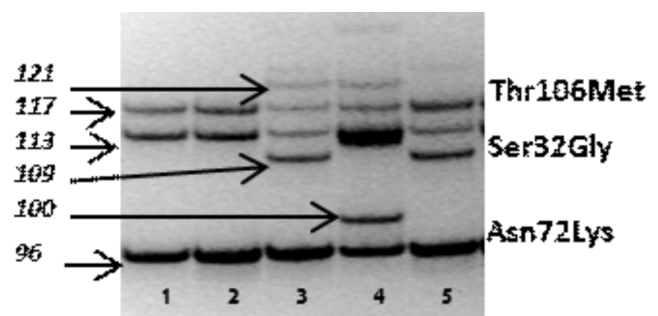


Рис. 2. Система регистрации наиболее частых мутаций в гене *PTS* методом MLPA-анализа:

дорожка 1 — N/N; дорожка 2 — N/N; дорожка 3 — p.Thr106Met/p.Ser32Gly; дорожка 4 — p.Asn72Lys/N; дорожка 5 — p.Ser32Gly/N

Мутации в генах тетрагидробиоптеринового обмена

Мутация	Ген	Кол-во хромосом	Экзон / Интрон
Arg9His	<i>PTS</i>	1	Экзон 1
Ser32Gly	<i>PTS</i>	2	Экзон 2
Val59Gly	<i>PTS</i>	1	Экзон 3
Asn72Lys	<i>PTS</i>	5	Экзон 4
IVS5-1g>a	<i>PTS</i>	1	Интрон 4
g.7068g>a	<i>PTS</i>	1	Экзон 6
Glu134Lys	<i>PTS</i>	1	Экзон 6
Val112Ala	<i>PTS</i>	2	Экзон 6
Thr106Met	<i>PTS</i>	8	Экзон 6
Ala135Asp	<i>QDPR</i>	2	Экзон 4

III. Поиск частых мутаций в гене *PTS*:

В случае обнаружения одной из частых мутаций в гене *PTS* диагноз можно подтвердить по совокупности молекулярно-генетического и клинического обследования;

IV. Секвенирование кодирующей последовательности гена *PTS* и других генов тетрагидробиоптеринового обмена (*QDPR-GCH1-PCBD*).

При отсутствии частых мутаций в гене *PTS* проводится поиск мутаций во всей кодирующей последовательности гена *PTS* и других генах тетрагидробиоптеринового обмена (*QDPR-GCH1-PCBD*).

Список литературы

1. Степанова А.А., Тверская С.М., Зинченко Р.А., Поляков А.В. Молекулярно-генетическое исследование гена фенилаланингидроксилазы в группе российских больных фенилкетонурией // Медицинская генетика. — 2006. — Т. 2. — С. 32—39.
2. Степанова А.А., Поляков А.В., Тверская С.М. Молекулярно-генетическое исследование генов тетрагидробиоптеринового обмена *QDPR* и *PTS* в группе российских больных фенилкетонурией // Медицинская генетика. — 2006. — Т. 9. — С. 3—8.
3. Степанова А.А., Соколова М.С., Тверская С.М., Поляков А.В. использование метода аллель специфичного лигирования с последующей амплификацией для регистрации наиболее частых мутаций в гене *PAH* // Медицинская генетика. — 2010. — Т. 11. — С. 22—26.

4. Brasil S., Viecelli H.M., Meili D., Rassi A., Desviat L.R., Perez B., Ugarte M., Thony B. Pseudoxon exclusion by antisense therapy in 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency // Hum. Mutat. — 2011. — Sep. — 32(9). — P. 1019—1027. doi: 10.1002/humu.21529. Epub 2011 Aug 4.

5. Dhondt J.L. Lessons from 30 years of selective screening for tetrahydrobiopterin deficiency // J. Inherit. Metab. Dis. — 2010. — Oct. — 33 (Suppl. 2). — S219-23. doi: 10.1007/s10545-010-9091-9. Epub 2010 May 11.

6. Gutlich M., Jaeger E., Rucknagel K. P., Werner T., Rodl W., Ziegler I., Bacher A. Human GTP cyclohydrolase I: only one out of three cDNA isoforms gives rise to the active enzyme // Biochem. J. — 1994. — Vol. 302. — P. 215—221.

7. Howells D.W., Forrest S.M., Dahl H.-H.M., Cotton R.G.H. Insertion of an extra codon for threonine is a cause of dihydropteridine reductase deficiency // Am. J. Hum. Genet. — 1990. — Vol. 47. — P. 279—285.

8. Kluge C., Brecevic L., Heizmann C.W., Blau N., Thony B. Chromosomal localization, genomic structure and characterization of the human gene and a retropseudogene for 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase // Europ. J. Biochem. — 1996. — Vol. 240. — P. 477—484.

9. Lidsky A.S., Law M.L., Morse H.G., Kao F.T., Rabin M., Ruddle F.H., Woo S.L. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome // Proc. Nat. Acad. Sci. — 1985. — Vol. 82. — P. 6221—6225.

10. Thony B., Leimbacher W., Burgisser D., Heizmann C.W. Human 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase: cDNA cloning and heterologous expression of the recombinant enzyme // Biochem. Biophys. Res. Comm. — 1992. — Vol. 189. — P. 1437—1443.

11. http: // www.biopku.org

Molecular diagnostics and genetic heterogeneity of hyperphenylalaninemia

Stepanova A.A., Polyakov A.V.

Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

We report the molecular genetic study of phenylalanine hydroxylase (*PAH*) gene, 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase (*PTS*) gene and quinoid dihydropteridine reductase (*QDPR*) gene in the group of Russia PKU-patients. A total of 1100 independent PKU-patients was investigated. Simple, fast and reliable methods for identification of frequent mutations in *PAH* and *PTS* genes were created. Informational content of search of frequent mutations is established (*PAH* gene — 81,1% and *PTS* gene — 70%). The contribution to the diseases, being accompanied by the elevated plasma phenylalanine was defined (*PAH* gene — 95,6% and *PTS* gene — not less than 1,2%). The algorithm of molecular-genetic diagnostic of patients with the various reasons of a hyperphenylalaninemia was developed.

Key words: hyperphenylalaninemia, phenylketonuria, tetrahydrobiopterin deficiency, *PAH* gene, *PTS* gene

Эпидемиология и генетика адреногенитального синдрома

Карева М.А., Блох С.П., Иванова О.Н., Петеркова В.А.

Институт детской эндокринологии ФГБУ Эндокринологический научный центр Минздрава России,
117036, Москва, ул. Дм.Ульянова, 11; e-mail: i_marusya@mail.ru

Адреногенитальный синдром (АГС) вследствие дефицита 21-гидроксилазы с 2006 г. введён в программу тотального неонатального скрининга. По результатам скрининга выявлена частота встречаемости данного заболевания, которая составила 1 случай на 9500 живых новорождённых. Проведено эпидемиологическое исследование спектра мутаций в четырёх регионах Российской Федерации в зависимости от этнической принадлежности. Выявлены различия в распространённости частых мутаций в гене *CYP21*: в русской группе пациентов вне зависимости от места проживания преобладают делеции гена *CYP21* и мутация во 2-м интроне, тогда как среди башкир, татар и аварцев доминирующей мутацией является R356W, у коми-пермяков и кумыков преобладает мутация I172N. Этнические особенности генетики АГС могут служить основой для дифференцированного подхода к проведению молекулярно-генетического исследования у пациентов, выявленных по данным неонатального скрининга в различных регионах РФ.

Ключевые слова: адреногенитальный синдром, эпидемиология, мутации, ген *CYP21*

Введение

Адреногенитальный синдром (врождённая дисфункция коры надпочечников) — это группа аутосомно-рецессивных болезней, обусловленных дефектами ферментов, участвующих в биосинтезе кортизола. Более чем 90% случаев приходится на дефицит фермента 21-гидроксилазы, вызванный мутациями в гене *CYP21*. Фермент 21-гидроксилаза переводит 17-гидроксипрогестерон в 11-дезоксикортизол и прогестерон в 11-дезоксикортикостерон, соответственно предшественники кортизола и альдостерона. Следовательно дефицит 21-гидроксилазы проявляется недостаточностью глюко- и минералокортикоидов. Вовремя не диагностированное заболевание и отсутствие терапии приводит к смерти пациентов в грудном возрасте от гиповолемии и электролитных изменений (гиперкалиемии, гипонатриемии) или от гипогликемии. Кроме того, в результате дефицита кортизола происходит гиперплазия надпочечников и вырабатывается избыточное количество предшественников ферментативного блока, которые метаболизируются в активные андрогены. Избыток андрогенов внутриутробно приводит к вирилизации плодов женского пола. После рождения прогрессирует вирилизация как у девочек, так и у мальчиков, что проявляется ускорением роста и костного возраста и преждевременным адренархе.

Различные мутации гена *CYP21* приводят к разной степени потере ферментативной активности 21-гидроксилазы, что определяет выраженность клинической картины заболевания. Исходя из этого, выделяют классическую форму с дебютом в перинатальном периоде и неклассическую форму с поздним началом, которая клинически проявляется в перипубертатном периоде. В свою очередь, среди классических форм выделяют более тяжёлую сольтеряющую форму, протекающую с яв-

ным дефицитом минералокортикоидов и простую вирильную форму, при которой не отмечается симптомов потери соли и электролитных нарушений.

Частота встречаемости классических форм дефицита 21-гидроксилазы в большинстве популяций составляет примерно 1 : 14 000 — 1 : 18 000 новорождённых. Адреногенитальный синдром (АГС) удовлетворяет условиям включения в программу неонатального скрининга, поскольку является распространённым, потенциально летальным заболеванием и может быть диагностирован простым гормональным анализом, исследованием уровня 17-гидроксипрогестерона (17ОНП) в крови. Своевременная диагностика и лечение могут предотвратить летальность и серьёзные осложнения заболевания.

С 1977 г., после развития методики определения 17-гидроксипрогестерона в капиллярной крови из пятки новорождённого на фильтровальной бумаге, стало возможным проведение неонатального скрининга на АГС. Первая экспериментальная программа неонатального скрининга была предпринята в штате Аляска, поскольку среди коренных жителей этого региона была отмечена чрезвычайно высокая частота данной патологии. Первый опыт подтвердил возможность и эффективность неонатального скрининга АГС [16, 17]. В течение последующих 8 лет неонатальный скрининг проводился в восьми странах (США, Франция, Италия, Новая Зеландия, Япония и Шотландия), приблизительно около 1 млн новорождённых было проверено и выявлено 77 случаев дефицита 21-гидроксилазы. Это позволило оценить распространённость классических форм 21-гидроксилазной недостаточности как 1 : 14 199 новорождённых [15]. К настоящему времени программы неонатального скрининга на АГС функционируют как минимум в 17 странах и ещё в 13 странах имеются экспериментальные и местные скрининговые программы.

В 2006 г. в рамках реализации Национального проекта «Здоровье» осуществлено внедрение программы неонатального скрининга АГС в России.

Материалы и методы

Нами была проанализирована частота встречаемости АГС на основании данных неонатального скрининга за 2012 г. и проведён анализ распространённости мутаций гена *CYP21* в этнических группах отдельных регионов Российской Федерации.

Мы выбрали несколько популяций из регионов России с высокой частотой встречаемости АГС, однородные по этническому составу: Дагестан, Удмуртия, Башкирия и Пермский край (табл. 2). Всего в группу вошли 207 пациентов из четырёх регионов РФ, разделённых на 6 этнических групп. Генетические исследования проводились по методике А. Wedell и Н. Luthman [23] с модификациями. Селективно амплифицировали фрагменты гена *CYP21*, используя праймеры, комплементарные участку 8 п.н. в экзоне 3. Полученные в результате амплификации специфические фрагменты ДНК использовали для генотипирования 12 точковых мутаций методом аллельспецифической ПЦР. Недостатком данной методики является невозможность различить гомозиготные и гемизиготные состояния, что снижает долю делеций и больших генных конверсий.

Результаты и обсуждение

Введение неонатального скрининга позволило определить частоту встречаемости классических форм адреногенитального синдрома. В среднем частота встречаемости АГС в России составляет 1 случай на 9500 новорождённых, что выше среднемировых показателей. По результатам неонатального скрининга почти 6,5 млн новорождённых, показано, что общая распространённость АГС в мире составляет от 1 : 13 000 до 1 : 15 000 [15, 16]. В отдельных странах частота данного заболевания ещё

ниже: 1 : 21 000 в Японии [14] и 1 : 23 000 в Новой Зеландии [3] и 1 : 28 000 в Китае (Тайвань) [9].

Интересно, что в Российской Федерации частота встречаемости сильно различается в разных регионах. Самая высокая частота определена в Северо-Кавказском федеральном округе — 1 случай на 5777 живых новорождённых, что, скорее всего, связано с высокой частотой близкородственных браков в данном регионе. По другим федеральным округам частота встречаемости АГС колеблется от 1 случая на 13 790 новорождённых в Северо-Западном Федеральном округе до 1 на 7571 в Уральском Федеральном округе (табл. 1).

Согласно данным литературы, в популяциях различается распространённость мутаций гена *CYP21* (табл. 2), что может объяснять и различия в частоте встречаемости АГС на территории России. На сегодняшний день описано более 110 мутаций в гене *CYP21*, но более 85% случаев приходится на 12 частых мутаций, являющихся результатом двух типов рекомбинаций между геном *CYP21* и псевдогеном *CYP21P*. На точковые мутации, большая часть которых образуется в результате микроконверсий, приходится 75—80% повреждений гена *CYP21*. На большие генные перестройки (делеции и конверсии) приходится 20—25% в большинстве популяций [26], значительно реже (менее 1%) они встречаются в некоторых латиноамериканских популяциях [21]. Редкие мутации, не являющиеся результатом генных конверсий, обнаруживаются в 5—10% поражённых аллелей. В основном они специфичны для каждой популяции.

Мутация I2splice — самая частая точковая мутация в гене *CYP21*. При обследовании клинически разнородных групп пациентов она встречается в 20—40% аллелей [25, 26], в частности при сольтеряющей и при простой вирильной форме заболевания, для неё в меньшей степени описана корреляция генотип—фенотип, в отличие от всех остальных мутаций.

При простой вирильной форме мутация I172N является самой частой и встречается в большинстве популя-

Таблица 1

Частота встречаемости АГС в регионах РФ по данным неонатального скрининга за 2012 г.

Округ	Количество новорождённых	Охват неонатальным скринингом (%)	Количество выявленных больных	Частота встречаемости (1 случай на количество новорождённых)
Северо-Западный	154869	77,8	10	1 : 13719
Центральный	414503	90	44	1 : 8831
Южный	161007	99	15	1 : 10635
Северо-Кавказский	133504	76,3	14	1 : 5777
Приволжский	365320	96	33	1 : 10699
Уральский	170873	92	22	1 : 7571
Сибирский	268773	97,8	27	1 : 9647
Дальневосточный	89875	91,8	9	1 : 9163
Всего	1725178	94,4	174	1 : 9414

ций в среднем в 30% аллелей [18, 19]. В индийской популяции мутация I172N — самая распространённая мутация в гене *CYP21* вообще, а при простой вирильной форме её находят в 71,4% аллелей [26]. При исследовании клинически разнородных групп пациентов данная мутация встречается в среднем в 15–20% аллелей, реже — в британской и итальянской популяциях (7 и 6% аллелей соответственно) [7, 8].

Мутация R356W ассоциирована с сольтерьющей формой, хотя в некоторых группах отмечена её частая встречаемость у больных с простой вирильной формой [4]. В среднем её распространённость при обследовании клинически разнородных групп пациентов составляет 4–10% [36], больше — в популяциях азиатского происхождения (до 20%) [6, 12].

Частота встречаемости мутации Q318X при сольтерьющей форме составляет в среднем 9–14% [4], достигая в отдельных группах более значительных показателей, например в Индии — 33,3% [13]. При обследовании смешанной группы пациентов (все формы) — около 4% [26].

В своём исследовании мы проанализировали частоту встречаемости мутаций гена *CYP21* в разных этнических группах, проживающих в четырёх регионах России (табл. 2, 3, рис. 1).

В общей группе пациентов (n=207) распределение мутаций согласуется с данными по российской популяции [1, 2]. В наших предыдущих исследованиях основную долю всех мутаций составили делеция гена (32,47%), мутация во 2-м интроне, приводящая к нарушению сплайсинга (20,78%) и мутация в 4-м экзоне I172N (20,45%) [1]. Меньшая доля делеций в настоящем исследовании (23,4% против 32,47%) связана с методикой определения мутаций. В данной работе мы применяли метод аллельспецифической ПЦР, который не позволяет отличить гемизиготные мутации от гомозиготных.

Отличительной чертой русской этнической группы вне зависимости от региона проживания является высокая доля делеций и нарушения сплайсинга во втором интроне, тогда как среди жителей Дагестана, башкир и коми-пермяков делеций гена *CYP21* не выявлено. По

Таблица 2

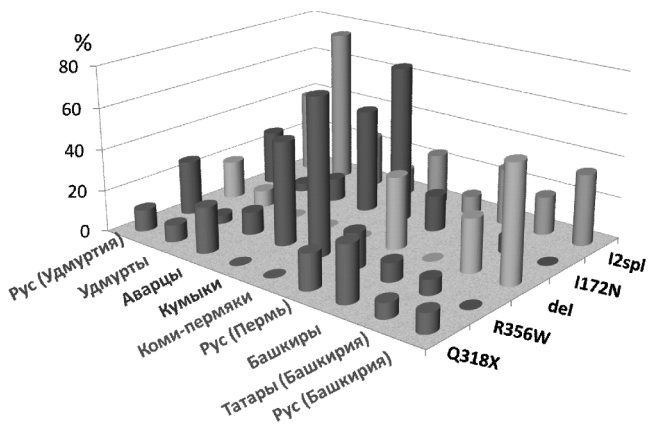
Распределение мутаций гена *CYP21* в различных популяциях, по данным литературы

Страна	Кол-во пациентов	del	I2spl	I172N	Q318X	R356W	Ссылка
Китай	52	2	31	23	14	—	12
Нидерланды	198	31,9	28,1	12,4	3,5	8,4	20
Аргентина	72	21	18	15	14	6	4
Турция	56	25,3	22	9,9	3,3	8,8	2
Центральная Европа	348	32,6	31,2	14,5	2,6	2,4	5
США	394	34	31	10	4	4	19,25
Бразилия	74	23	25	19	11	8	18
Индия	28	15,9	27,2	31,8	22,7	0	13
Япония	102	18	29	13	0	13	6
Великобритания	384	45	30	7	0	10	8
Швеция	400	33	27	20	2	3	23
Финляндия	102	34	12	29	2	0	10
Италия	146	26	20	6	8	0	7

Таблица 3

Частота встречаемости мутаций в гене *CYP21* в различных регионах РФ

Регион Этническая популяция	Удмуртия		Башкирия			Пермский край		Дагестан	
	Русские	Удмурты	Башкиры	Татары	Русские	Коми-пермяки	Русские	Аварцы	Кумыки
Аллельный вариант (общий %)	N=38	N=24	N=11	N=27	N=32	N=8	N=23	N=36	N=8
Del (23,4)	18,5	8,3	—	25,9	56,2	—	34,8	—	—
I 2 splice (30,2)	39,5	75,2	27,3	18,5	34,4	25	8,7	25	12,5
I172N (14,9)	26,3	4,1	9,1	7,4	—	75	17,4	11,1	50
Q318X (12,2)	10,5	8,3	27,3	7,4	9,4	—	17,4	22,2	—
R356W (13,5)	—	—	36,3	29,6	—	—	8,7	38,8	25



Распределение мутаций гена *CYP21* в разных этнических группах

данным литературы, низкая доля делеций характерна для азиатских популяций (Китай, Индия, Япония) [6, 12, 13].

Среди удмуртов доминирующей является мутация I2splice, которая встречается в 75% всех аллелей. Данная мутация встречается с высокой частотой во всех популяциях, а среди эскимосов Юппи выявляется в 100% случаев [25]. Интересно, что среди этнически близких удмуртам коми-пермяков мутация I2spl встречается в 25% случаев, но доминирующей в данной группе является мутация I172N, характерная для вирильной формы заболевания, она также доминирует в Индии [13]. Различия между удмуртами и коми-пермяками могут быть связаны с малочисленностью группы.

Необычно высокая доля мутации R356W выявлена у башкир, татар и аварцев и практически не встречается в русской группе пациентов. По данным литературы, относительно высокая доля данной мутации наблюдается в Турции, Японии, Великобритании и Голландии [2, 6, 8, 20].

Заключение

После введения неонатального скрининга определена частота АГС в России, которая составляет 1 случай на 9500 живых новорождённых, что превышает среднемировой уровень. Выявлены различия в распространённости частых мутаций в изучаемых этнических группах: в группе русских пациентов вне зависимости от места проживания преобладают делеции гена *CYP21* и мутация во 2-м интроне, тогда как среди башкир, татар и аварцев доминирующей мутацией является R356W, у коми-пермяков и кумыков преобладает мутация I172N.

Этнические особенности генетики АГС могут служить основой для дифференцированного подхода к проведению молекулярно-генетического исследования у пациентов, выявленных по данным неонатального скрининга в различных регионах РФ.

Список литературы

1. Дедов И.И., Калинин Н.Ю., Семичева Т.В., Кузнецова Э.С., Баканова Т.Д., Свердлова П.С., Прасолов В.С., Петеркова В.А., Рубцов П.М., Тюльпаков А.Н. Молекулярный анализ гена *CYP21* у пациентов с врождённой дисфункцией коры надпочечников, обусловленной дефицитом 21-гидроксилазы // Проблемы эндокринологии. — 2004. — №2. — С. 3–7.
2. Дедов И.И., Орловский И.В., Карева М.А., Лоскутова Л.И., Батенева Е.И., Семичева Т.В., Петеркова В.А. Молекулярная диагностика классических форм врожденной дисфункции коры надпочечников (дефицит стероид-21-гидроксилазы) методом аллель-специфической ПЦР // Молекулярная медицина. — 2004. — №2. — С. 60–65.
3. Bas F., Kayserili H., Darendeliler F., Uyguner O., Gunoz H., Yuksel Apak M., Atalar F., Bundak R., Wilson R.C., New M.I., Wollnik B., Saka N. *CYP21A2* gene mutations in congenital adrenal hyperplasia: genotype-phenotype correlation in Turkish children // J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol. — 2009. — 1(3). — P. 116–128. doi: 10.4008/jcrpe.v1i3.49. Epub 2009 Feb.
4. Cutfield W.S., Webster D. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand // J. Pediatr. — 1995. — 126. — P. 118–121.
5. Dardis A., Bergada I., Bergada C., Rivarola M., Belgorosky A. Mutations of the steroid 21-hydroxylase gene in an Argentinian population of 36 patients with classical congenital adrenal hyperplasia // J. Pediatr. Endocrinol. Metab. — 1997. — 10. — P. 55–61.
6. Dolzan V., Solyom J., Fekete G., Kovacs J., Rakosnikova V., Votava F., Lebl J., Pribilincova Z., Baumgartner-Parzer S.M., Riedl S., Waldhauser F., Frisch H., Stopar-Obreza M., Krzysnik C. Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia // Battelino T. Eur. J. Endocrinol. — 2005. — Jul. — 153(1). — P. 99–106.
7. Higashi Y., Hiromasa T., Tanae A., Miki T., Nakura J., Kondo T., Ohura T., Ogawa E., Nakayama K., Fujii-Kuriyama Y. Effects of individual mutations in the P-450 (C21) pseudogene on the P-450 (C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency // J. Biochem. (Tokyo). — 1991. — 109. — P. 638–644.
8. Carrera P., Bordone L., Azzani T., Brunelli V., Garancini M.P., Chiumello G., Ferrari M. Point mutations in Italian patients with classic, non-classic, and cryptic forms of steroid 21-hydroxylase deficiency // Hum. Genet. — 1996. — 98. — P. 662–665.
9. Lako M., Ramsden S., Campbell R.D., Strachan T. Mutation screening in British 21-hydroxylase deficiency families and development of novel microsatellite based approaches to prenatal diagnosis // J. Med. Genet. — 1999. — 36. — P. 119–124.
10. Lee H.H., Kuo J.M., Chao H.T., Lee Y.J., Chang J.G., Tsai C.H., Chung B.C. Carrier analysis and prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency in Chinese // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2000. — 85. — P. 597–600.
11. Levo A., Partanen J. Mutation-haplotype analysis of steroid 21-hydroxylase (*CYP21*) deficiency in Finland. Implications for the population history of defective alleles // Hum. Genet. 1997. — 99. — P. 488–497.
12. Liao X.Y., Zhang Y.F., Gu X.F. *CYP21* gene point mutations study in 21-hydroxylase deficiency patients // Zhonghua Er Ke Za Zhi. — 2003. — Sep. — P. 41(9). — P. 670–674.
13. Mathur R., Menon P.S., Kabra M., Goyal R.K., Verma I.C. Molecular characterization of mutations in Indian children with congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency // J. Pediatr. Endocrinol. Metab. — 2001. — Jan. — 14(1). — P. 27–35.
14. Mikami A., Fukushi M., Oda H., Fujita K., Fujieda K. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Sapporo City:

sixteen years experience // Southeast. Asian J. Trop. Med. Public Health. — 1999. — 30 (Suppl. 2). — P. 100–102.

15. Pang S.Y., Wallace M.A., Hofman L., Thuline H.C., Dorche C., Lyon I.C., Dobbins R.H., Kling S., Fujieda K., Suwa S. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // Pediatrics. — 1988. — 81. — P. 866–874. [PubMed].

16. Pang S., Clark A. Newborn screening, prenatal diagnosis, and prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // Trends Endocrinol. Metab. — 1990. — 1. — P. 300–307. [PubMed].

17. Pang S., Hotchkiss J., Drash A.L., Levine L.S., New M.I. Microfilter paper method for 17 alpha-hydroxyprogesterone radioimmunoassay: its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1977. — №45(5). — P. 1003–1008.

18. Pang S., Murphey W., Levine L.S., Spence D.A., Leon A., La Franchi S., Surve A.S., New M.I. A pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Alaska // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1982. — №55. — P. 413–420.

19. Paulino L.C., Araujo M., Guerra G.J., Marini S.H., De Mello M.P. Mutation distribution and CYP21/C4 locus variability in Brazilian families with the classical form of the 21-hydroxylase deficiency // Acta Paediatr. — 1999. — 88. — P. 275–283.

20. Speiser P.W., Dupont J., Zhu D., Serrat J., Buegeleisen M., Tusie-Luna M.T., Lesser M., New M.I., White P.C. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due

to 21-hydroxylase deficiency // J. Clin. Invest. — 1992. — 90. — P. 584–595.

21. Stikkelbroeck N.M., Hoefsloot L.H., de Wijs I.J., Otten B.J., Hermus A.R., Sijm A.A. CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2003. — Aug. — 88(8). — P. 3852–3859.

22. Tusie-Luna M.T., Ramirez-Jimenez S., Ordonez-Sanchez M.L., Cabello-Villegas J., Altamirano-Bustamante N., Calzada-Leon R., Robles-Valdes C., Mendoza-Morfin F., Mendez J.P., Teran-Garcia M. Low frequency of deletion alleles in patients with steroid 21-hydroxylase deficiency in a Mexican population // Hum. Genet. — 1996. — №98. — P. 376–379.

23. Wedell A., Luthman H. Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations // Hum. Mol. Genet. — 1993. — №2(5). — P. 499–504.

24. Wedell A., Thilen A., Ritzen E.M., Stengler B., Luthman H. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestations // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1994. — 78. — P. 1145–1152.

25. Wilson R.C., Mercado A.B., Cheng K.C., New M.I. Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1995. — 80. — P. 2322–2329.

26. White P.C., Speiser P.W. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // Endocr. Rev. — 2000. — №21(3). — P. 245–291.

Epidemiology and genetics of congenital adrenal hyperplasia

Kareva M.A., Blokh S.P., Ivanova O.N., Peterkova V.A.

Endocrinological Scientific Center, Moscow; e-mail: i_marusya@mail.ru

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) was included in Russian newborn screening programme in 2006. Since the screening programme was started the incidence of CAH has increased, and was estimated in Russia as 1:9500 live newborns. We have investigated spectrum of *CYP21* mutations in different ethnic groups from four Russian Districts (Bashkortostan, Dagestan, Permskii Krai, Udmurtia) and revealed diversity of the prevalence of frequent *CYP-21* mutations: in Russians the most frequent mutations were deletion and I2Spl in all Districts, in Bashkirs, Tatars, Avars the most frequent was R236W, but among Komi-Permyaks and Kumiks — I172N. Genotype diversity in certain ethnic groups could provide a special approach to genetic *CYP21* analysis in CAH patients diagnosed by neonatal screening.

Key words: congenital adrenal hyperplasia, epidemiology, mutations, gene *CYP21*

Регистр больных с семейной гиперхолестеринемией

Мешков А.Н.

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения РФ, Москва, 101900, Петровский пер., 10; e-mail: meshkov@lipidclinic.ru

Семейная гиперхолестеринемия (СГХС) — наследственное аутосомно-доминантное нарушение метаболизма липопротеинов, характеризующееся высоким содержанием в плазме крови липопротеинов низкой плотности (ЛНП), наличием кожных и сухожильных ксантом и высоким риском раннего развития ИБС. СГХС представляет важную проблему для здравоохранения, поскольку без своевременного лечения пациенты-гомозиготы становятся инвалидами или умирают во второй декаде жизни, пациенты-гетерозиготы на четвёртой-пятой декаде жизни соответственно. Регистр больных с СГХС создан для учета больных с гомозиготной формой и больных с тяжелой гетерозиготной формой нуждающихся в проведении процедур ЛНП-афереза. Ведение регистра направлено на сбор информации об особенностях течения заболевания, проводимом лечении и исходах, и обеспечивает поддержку по улучшению качества медицинской помощи и стандартов диагностики и лечения.

Ключевые слова: семейная гиперхолестеринемия, ИБС, лечение, исходы, регистр

Введение

Семейная гиперхолестеринемия (СГХС) — наследственное аутосомно-доминантное нарушение метаболизма липопротеинов, характеризующееся высоким содержанием в плазме крови липопротеинов низкой плотности (ЛНП), наличием кожных и сухожильных ксантом и высоким риском раннего развития ИБС. СГХС может быть обусловлена мутациями нескольких генов: гена рецептора ЛНП — *LDLR*, гена аполипопротеина В-100 — *APOB*, гена *PCSK9*, кодирующего конвертазу. Изменения в этих генах имеют доминантный тип наследования и проявляются клинически как гетеро- и гомозиготные формы СГХС, а изменения в генах *LDLRAP1*, *ABCG5*,

ABCG8, *CYP7A1* имеют рецессивный тип наследования и клинически проявляются только как гомозиготная форма СГХС [5].

Гомозиготная форма СГХС не только более тяжёлая, но и значительно более редкая — 1 случай на 1 млн населения, тогда как гетерозиготная форма СГХС считается довольно распространённым наследственным заболеванием человека с частотой 1 на 500 в открытой популяции. СГХС представляет важную проблему для здравоохранения, поскольку без своевременного лечения пациенты-гомозиготы становятся инвалидами или умирают во второй декаде жизни, пациенты-гетерозиготы — на четвёртой—пятой декаде жизни. Регистр больных с СГХС создан для учёта больных с гомозиготной формой и больных с тяжёлой гетерозиготной формой, нуждающихся в проведении процедур ЛНП-афереза. Ведение регистра направлено на сбор информации об особенностях течения заболевания, проводимом лечении и исходах, и обеспечивает поддержку улучшения качества медицинской помощи и стандартов диагностики и лечения. Ведение регистра больных с СГХС осуществляется сотрудниками ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения РФ. Более подробную информацию можно получить по телефону 8(495)9797891 или на сайте www.lipidclinic.ru.

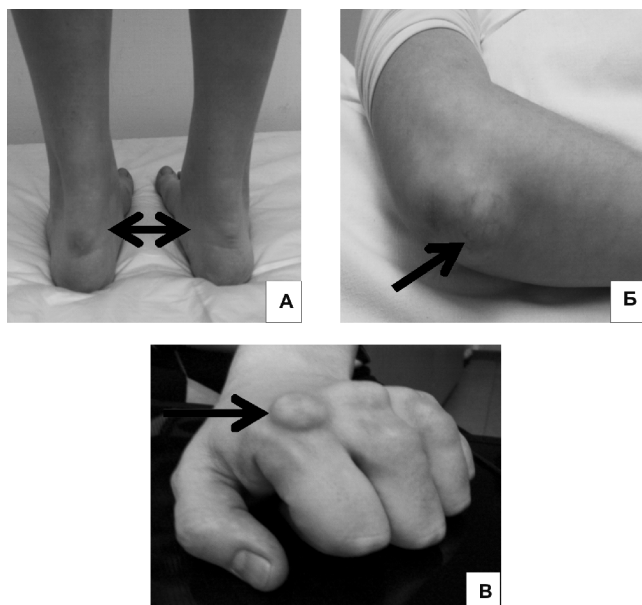


Рис. 1. Сухожильные ксантомы: А — ахилловых сухожилий; Б — на разгибательной стороне локтя; В — сухожилий разгибателей кисти

Клинические особенности заболевания

Гетерозиготная форма СГХС

Клинические критерии гетерозиготной СГХС включают в себя: высокий уровень общего холестерина (ХС) и ХС ЛНП плазмы крови, семейный анамнез гиперхолестеринемии (ГХС) (особенно случаи ГХС у детей), отложение ХС в экстраваскулярных тканях в виде ксантом сухожилий (рис. 1) или липоидной дуги роговицы (рис. 2) и раннее развитие ИБС у пациента или его родственников [2, 3]. Патогенез клинических проявлений у этих пациентов объясняется увеличением времени циркуляции ЛНП в кровото-

ке, вследствие чего эти частицы в большей степени подвергаются окислению. Модифицированные ЛНП затем захватываются моноцитами — макрофагами, которые посредством неспецифических сквенджер-рецепторов проникают в субэндотелиальное пространство артериальной стенки, откладываясь в ней и инициируя образование атеросклеротической бляшки с быстро нарастающей липидной сердцевиной, основу которой составляют пенные клетки, насыщенные этерифицированным ХС. Отложение ХС в клетках кожи век вызывает появление ксантелазм (рис. 3), в соединительной ткани внутри и вокруг сухожилий-разгибателей — ксантом, а инфильтрация ХС вдоль края радужной оболочки — липоидной дуги роговицы.

ГХС у больных с гетерозиготной формой СГХС отмечается с рождения, и её выраженность нарастает с возрастом. В целом, уровень общего ХС у этих больных вдвое выше, чем у здоровых людей, и обычно составляет 8—14 ммоль/л, триглицериды не повышены, а уровень ХС липопротеинов высокой плотности (ЛВП) обычно снижен, что служит дополнительным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Специфическим диагностическим признаком СГХС считаются ксантомы сухожилий. Эти признаки практически не встречаются при других заболеваниях. Наиболее частой локализацией ксантом являются ахилловы сухожилия и сухожилия-разгибатели пальцев кистей (в области пястно-фаланговых суставов) [4].

Гомозиготная форма СГХС

Заболевание сопровождается более тяжёлыми клиническими последствиями, чем гетерозиготная форма СГХС. При этом уровень ХС ЛНП у больных с гомозиготной формой СГХС превышает аналогичный показатель здоровых сверстников в 6—10 раз, достигая 15—20 ммоль/л. Уровень ХС ЛВП также обычно снижен. Высокой концентрации ХС ЛНП в крови сопутствуют патологические изменения в коже, сухожилиях и артериях, что проявляется ранним ксантоматозом и атеросклерозом. У больных с гомозиготной формой СГХС эти изменения появляются раньше и выражены в значительно большей степени, нежели у больных с гетерозиготной формой заболевания. Наряду с выраженным кожным ксантоматозом у больных с гомозиготной СГХС почти всегда поражаются корень аорты и аортальный клапан. Характерно появление плоских ксантом на тыльной поверхности межпальцевых перепонки кистей, ягодицах, в локтевой и подколенной ямках (рис. 4). Туберозные (бугорчатые) ксантомы на разгибательной стороне локтей и коленях появляются позже. Ксантомы всегда встречаются в ахилловых сухожилиях и сухожилиях-разгибателях кисти (рис. 1). У многих больных ещё в детстве развивается стенокардия напряжения вследствие аортального стеноза и коронарного атеросклероза. Описаны отдельные случаи развития инфаркта миокарда у детей с СГХС в 2-летнем возрасте. Продолжительность жизни нелеченных пациентов не превышает 25 лет.



Рис. 2. Липоидная дуга роговицы (arcus senilis)



Рис. 3. Ксантелазмы



Рис. 4. Кожные ксантомы: А — в области локтя; Б — в подколенных ямках

Терапия семейной гиперхолестеринемии

Лечением пациентов с гомозиготной формой СГХС на протяжении всей жизни должны заниматься специалисты по проблеме липидного обмена — врачи липидологи.

У пациентов с гетерозиготной формой СГХС подбором гиполипидемической терапии также должны в обязательном порядке заниматься липидологи, однако дальнейшее наблюдение могут осуществлять кардиологи.

Терапия СГХС состоит из двух компонентов: немедикаментозного, призванного решить вопросы вторичной профилактики сердечно-сосудистых осложнений, и медикаментозного, направленного на снижение ХС ЛНП и достижение его оптимального уровня. Немедикаментозные меры включают в себя соблюдение диеты, регулярную умеренную физическую активность, полное прекращение курения и поддержание веса тела на оптимальном уровне. Диета является важнейшим элементом терапии и больной должен придерживаться её в течение всей жизни. Одновременно с диетой пациенты должны принимать лекарственные средства, избирательно снижающие уровень ХС ЛНП, к которым относятся статины (ингибиторы гидроксиметилглутарил — коэнзим А редуктазы — фермента, регулирующего скорость биосинтеза ХС из ацетата), эзетимиб — селективный ингибитор абсорбции ХС в стенке тонкого кишечника и секвестранты желчных кислот (ионообменные смолы). При недостижении целевого уровня ХС ЛНП проводят процедуры экстракорпоральной терапии [4].

Статины являются препаратами первого ряда в лечении СГХС. Статины даже в высоких дозах хорошо переносятся больными, и побочные эффекты в виде повышения печёночных ферментов и миопатии наблюдаются редко. Однако контроль печёночных ферментов (АСТ и АЛТ) и креатинкиназы больным СГХС следует проводить регулярно с интервалом один раз в 3—6 мес. В случаях, когда уровни ферментов АСТ и АЛТ превышают три верхних предела лабораторной нормы, а креатинкиназы — в 10 раз верхний предел лабораторной нормы, лечение следует прекратить до нормализации показателей, после чего вернуться к терапии статинами, применяя их в меньшей дозе или комбинируя с другими гиполипидемическими средствами.

Эзетимиб — гиполипидемический препарат, который ингибирует абсорбцию пищевого и билиарного ХС в тонком кишечнике вследствие снижения транспорта ХС через стенку кишечника. Монотерапия эзетимибом сопровождается снижением ХС ЛНП в сыворотке крови всего лишь на 15—17%. Однако при комбинации эзетимиба со статинами гиполипидемический эффект существенно возрастает. Комбинация статинов с эзетимибом открывает более широкие возможности для эффективной коррекции гиперхолесте-

ринемии у больных с СГХС. Применение комбинации аторвастатин 80 мг и эзетимиб 10 мг в сутки позволяет снизить уровень ХС ЛНП на 60—70% от исходного.

Секвестранты желчных кислот (СЖК) являются ионообменными смолами, к которым относятся холестирамин, колестипол и колесевелам. СЖК снижают уровень ХС ЛНП на 10—25% в зависимости от дозы, вследствие связывания пищевого и билиарного ХС в просвете тонкого кишечника. Холестирамин назначают в дозе 8—24 г в день, колестипол — в дозе 5—30 г в день в виде порошка, который растворяют в жидкости, колесевелам — в дозе 3,75 г в день в виде таблеток (в одной таблетке содержится 625 мг). После того, как в клинической практике стали широко применять статины, СЖК используются главным образом в качестве дополнительных средств к основной терапии у больных с СГХС. В 50% случаев СЖК могут вызывать запоры, метеоризм и диспепсию; многие больные отказываются их принимать из-за неприятных вкусовых ощущений. СЖК могут снизить всасываемость других препаратов при их совместном назначении. Неприятные органолептические свойства существенно ограничивают применение этих препаратов. Колесевелам, который назначают в таблетках, лишён этого негативного свойства СЖК.

Несмотря на применение комбинированной гиполипидемической терапии, у подавляющего большинства пациентов с гомозиготной формой СГХС и у небольшой части пациентов с гетерозиготной формой СГХС не удаётся достичь целевого уровня ХС ЛНП. И это служит показанием к проведению процедур *экстракорпоральной терапии*: плазмафереза или селективной сорбции ХС ЛНП из плазмы крови.

Плазмаферез сравнительно прост в техническом исполнении, не столь затратен, как методы селективной сорбции. Однако в силу своей неизбирательности по удалению различных компонентов плазмы плазмаферез должен сопровождаться применением дорогостоящих замещающих растворов, прежде всего 5%-ного раствора альбумина.

Селективная сорбция ХС ЛНП (имунноферез, каскадная плазмафильтрация) позволяет проводить процедуру без замещающих растворов. Этот вид терапии хорошо переносится и даёт замечательный результат по снижению ХС ЛНП, в первую очередь, у больных с гомозиготной формой СГХС [1].

Какие целевые уровни ХС ЛНП должны быть достигнуты в процессе терапии или, по крайней мере, к чему следует стремиться? Поскольку больные с СГХС относятся к категории пациентов с высоким риском развития ИБС и других сердечно-сосудистых осложнений, то в идеале у детей следует достичь уровня ХС ЛНП ниже 3,5 ммоль/л, у взрослых больных без ИБС — ниже 2,5 ммоль/л, при наличии ИБС — ниже 1,8 ммоль/л [4].

Список литературы

1. Покровский С.Н., Коновалов Г.А., Трахт И.Н. и др. Плазмоиммуносорбция липопротеидов низкой плотности в лечении больных с наследственной гиперхолестеринемией // Тер. архив. — 1991. — №7. — С. 65–68.

2. Khachadurian A.K. The inheritance of essential familial hypercholesterolemia // Am. J. Med. — 1964. — 37. — P. 402–407.

3. Muller C. Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris // Acta Med. Scand. — 1938. — 89. — P. 75–84.

4. Nordestgaard B.G., Chapman M.J., Humphries S.E. et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus Statement of the European Atherosclerosis Society // Eur. Heart J. — 2013. — Sep. 12.

5. Soutar A.K., Naoumova R.P. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia // Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. — 2007. — 4. — P. 214–225.

Register of patients with familial hypercholesterolemia**Meshkov A.N.**

Federal State Institution «National Research Center for Preventive Medicine» of the Ministry of Health Care of Russian Federation, Moscow.
E-mail: meshkov@lipidclinic.ru

Familial hypercholesterolemia (FH) — an inherited autosomal dominant disorder of lipoprotein metabolism characterized by a high levels in plasma low-density lipoprotein (LDL), the presence of skin and tendon xanthomas and a high risk of early development of coronary artery disease. FH is an important public health problem, because without timely treatment of patients homozygotes become disabled or die in the second decade of life, patients, heterozygotes in the fourth to fifth decade of life, respectively. Register of patients with FH was created to account for patients with homozygous form and in patients with severe heterozygous form needed in carrying out the procedures of LDL-apheresis. The register is aimed at collecting information on the clinical features of the disease, and spent treatment outcomes, and provides support to improve the quality of care and standards of diagnosis and treatment.

Key words: familial hypercholesterolemia, coronary artery disease, treatment, outcomes, the register

Современные методы неинвазивной пренатальной диагностики анеуплоидий*

Доминова И.Н., Парадник Д.Ю., Патрушев М.В., Тоцаков С.В.

ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта»,
236041, г. Калининград, ул. А.Невского, д.14, факс +7(4012)466313, e-mail: post@kantiana.ru

Открытие свободно циркулирующей фетальной ДНК в плазме крови матери заложило основы для качественного прорыва в методах неинвазивной пренатальной диагностики хромосомной патологии плода. К настоящему моменту уже разработано значительное количество альтернативных подходов диагностики анеуплоидий, использующих различные биомаркеры фетальной ДНК. Задачей данной обзорной статьи является рассмотрение существующих на данный момент методик, их достоинств и недостатков, а также потенциала их внедрения в клиническую практику.

Ключевые слова: неинвазивная пренатальная диагностика, синдром Дауна, синдром Патау, трисомия, свободно циркулирующая ДНК

Введение

Хромосомные аномалии, такие, как синдром Дауна, синдром Патау, синдром Эдвардса и другие (табл. 1), встречаются у одного из 160 новорождённых [10]. Высокая частота встречаемости этих синдромов создаёт необходимость разработки достоверных методик комплексной дородовой диагностики. Наиболее надёжным методом детекции хромосомных аномалий является кариотипирование тканей плода. Этот метод предполагает выделение клеток плода путём амниоцентеза — сложной инвазивной процедуры, при проведении которой риск выкидыша составляет не менее 1% [16]. Опасность её проведения создаёт предпосылки для разработки неинвазивных методов диагностики, обладающих сравнимой с кариотипированием специфичностью и чувствительностью. В настоящее время в течение первого триместра беременности беременные женщины проходят комплекс скрининговых тестов, включающий в себя ультразвуковое обследование плода и биохимическое измерение различных белков и гормонов в крови. Такие комбинированные подходы скрининга позволяют оценить степень риска возникновения отклонений в развитии плода, однако, в целом, носят лишь предсказательный характер [36].

Новый толчок пренатальная диагностика хромосомных анеуплоидий получила в 1997 г., после открытия присутствия фетальных свободно циркулирующих ДНК (далее — сцДНК) и мРНК в крови матери начиная уже с 4-й недели беременности [20]. В среднем количество молекул фетальной ДНК составляет 3—6% от общего количества сцДНК плазмы [21]. Фетальная ДНК сильно фрагментирована — размер фрагментов составляет, как правило, около 150 п.н., однако совокупность всех фрагментов полностью покрывает весь геном плода, что позволяет проводить определение первичной последовательности и исследовать статус метилирования фе-

тальной ДНК в плазме крови матери [8]. Такие эксперименты дают возможность определять по плазме крови матери пол плода, его резус-фактор и группу крови [14], а также разрабатывать подходы к пренатальной диагностике хромосомных аномалий. Также разрабатываются и альтернативные подходы, ориентированные на исследование специфичной фетальной мРНК [24]. Основным достоинством таких методик, по сравнению с оценкой косвенных факторов риска, является то, что они могут давать однозначный диагноз без применения инвазивных процедур, и именно это является основной предпосылкой стремительного развития и большого разнообразия методов неинвазивной пренатальной диагностики хромосомных анеуплоидий плода по сцДНК плазмы крови матери. Мы детально рассмотрим существующие в настоящий момент методики, отмечая их основные преимущества и недостатки.

Методы, основанные на обогащении фракции фетальной сцДНК

Основной проблемой анализа фетальной сцДНК является то, что доля сцДНК плода в общей фракции внеклеточной ДНК плазмы составляет, по разным оценкам, всего лишь от 3 до 10%. Отсюда вытекает, что для проведения достоверного анализа необходимо селективно отделять фетальную ДНК от материнской. Фрагменты фетальной ДНК имеют размер меньше 300 п.н., т.е. намного меньше материнских фрагментов ДНК [2]. Основываясь на этом факте, группа исследователей из университета Базеля предприняла попытку обогатить образец ДНК плазмы крови методом гель-электрофореза в агарозном геле. Такая методика давала возможность значительно повысить относительное количество сцДНК плода, однако не позволяла исследователям де-

* Данная работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 14.A18.21.0109

тектировать хромосомные аномалии плода, основываясь на образце ДНК плазмы крови матери [18]. Последующие попытки применить фракционирование ДНК по размеру для детекции анеуплоидий плода также не нашли широкого применения, в первую очередь, из-за трудоёмкости и невысокой воспроизводимости, а также чувствительности к контаминации.

Другой подход к обогащению фетальной сцДНК основывался на наблюдении, что большая часть материнской ДНК плазмы крови возникает из гематопозитических клеток [23]. Таким образом, обработка образца крови формальдегидом должна стабилизировать материнские лейкоциты, что приведёт к значительному снижению высвобождающейся материнской ДНК в крови. Относительное количество фетальной ДНК в плазме крови значительно увеличивается по сравнению со стандартными методами выделения сцДНК [9]. Этот метод был апробирован на 60 беременных, в том числе 3 беременные с подтверждённой трисомией хромосомы 21 у плода. В результате правильно было классифицировано 56 из 57 нормальных случаев и 2 из 3 случаев трисомии. И хотя первые результаты были вполне многообещающими, они не были воспроизведены другими исследовательскими группами, что поставило под сомнение возможность их внедрения в клиническую практику (табл. 2) [5].

Методы, основанные на различиях уровня метилирования материнской и фетальной сцДНК

Другая группа подходов основывается на наличии эпигенетических различий между материнской и фетальной сцДНК. Одним из наиболее распространённых эпигенетических механизмов у млекопитающих является метилирование ДНК. Идентификация различий в паттернах метилирования у здоровых лиц и больных онкологическими заболеваниями [12] навела исследователей на мысль, что паттерны метилирования сцДНК плода и сцДНК матери также могут различаться.

В 2002 г. L.L. Roop с соавторами впервые продемонстрировали наличие различий в общем уровне метилирования фетальной и материнской ДНК [30]. Три года спустя появилось сообщение об открытии первого гена, имеющего разные уровни метилирования у плода и матери, им был ген *SERPINB5*, кодирующий ингибитор В5 сериновой протеазы и локализованный на хромосоме 18 [4]. Промоторный регион гена *SERPINB5* был гипометилирован у плода и гиперметилирован у небеременных женщин, кроме того, гипометилированные последовательности были обнаружены в ДНК, выделённой из материнской плазмы во время беременности, что указывало на наличие гипометилированных фрагментов гена *SERPINB5* в сцДНК плода из кровотока матери.

Таблица 1

Частота встречаемости различных хромосомных аномалий

Тип хромосомной аномалии	Частота
Числовые аномалии половых хромосом у мужчин	
47, XXУ (синдром Клайнфельтера)	1/1080 рождённых мальчиков
47, ХУУ	1/1080
Другие	1/1350
Всего	1/385
Числовые аномалии половых хромосом у женщин	
45, X (синдром Тернера)	1/9600 рождённых девочек
47, ХХХ	1/960
Другие	1/2740
Всего	1/660
Числовые аномалии аутосом у младенцев	
Трисомия 21 (синдром Дауна)	1/800
Трисомия 18 (синдром Эдвардса)	1/8140
Трисомия 13 (синдром Патау)	1/19 000
Триплоидия	1/57 000
Всего	1/695
Структурные аномалии у новорождённых (аутосомы и половые хромосомы)	
Сбалансированные перестройки:	
Робертсоновские транслокации	1/1120
Другие	1/965
Несбалансированные перестройки	
Всего	1/395
Все хромосомные аномалии (аутосомы и половые хромосомы)	1/160

Впоследствии было описано множество других эпигенетических маркёров, пригодных для детекции фетальной сцДНК в материнской плазме, в частности ген *RASSF1A*, расположенный на хромосоме 3 [1], и несколько маркёров хромосомы 21 [25]. Теоретически, направленно обогащая генетический материал плазмы гипо- или гиперметилированными последовательностями плода, можно значительно снизить количество материнской ДНК в образцах ДНК плазмы, однако основным лимитирующим фактором данных методов является то, что для детекции метилирования используются подходы, основанные на бисульфитной конверсии ДНК. В результате обработки геномной ДНК бисульфитом натрия неметилированный цитозин превращается в урацил, тогда как метилированный цитозин не подвергается изменениям. Это позволяет различать метилированные и неметилированные участки ДНК путём дизайна специфических праймеров к конвертированным и неконвертированным последовательностям [17]. Основным недостатком такого метода является то, что в ходе проведения конверсии до 90% геномной ДНК подвергается деградации [15], что накладывает ограничение на его использование при анализе сцДНК плода, количество молекул которой сильно лимитировано. Одной из возможных альтернатив бисульфитной конверсии ДНК является метод, заключающийся в применении чувствительных к метилированию эндонуклеаз рестрикции, которые могут расщеплять молекулу двуцепочечной ДНК только по неметилированным сайтам. Обработка материнской плазмы чувствительными к метилированию эндонуклеазами рестрикции способствует обогащению

гиперметилированными последовательностями фетальной ДНК [25]. Этот метод имеет ограничение по количеству регионов, пригодных для анализа, так как участки генома, имеющие сайты узнавания чувствительных к метилированию эндонуклеаз рестрикции и в то же время гипометилированные у матери и гиперметилированные у плода встречаются достаточно редко (табл. 2) [11]. Там не менее, применение такого подхода позволило выявить значительное количество различий в уровнях метилирования между фетальной и материнской ДНК на хромосоме 21 [4], что дало возможность разработать экспериментальные тест-системы для пренатальной диагностики синдрома Дауна. Основными недостатками таких методов диагностики являются, в первую очередь, необходимость наличия достаточно большого количества материала, а также тот факт, что с их помощью анализу подвергаются только CpG-участки промоторов некоторых генов, что, в целом, снижает достоверность получаемых результатов.

Другим подходом к обогащению фетальной сцДНК, использующим её эпигенетические характеристики, является иммунопреципитация метилированной сцДНК. Этот метод позволяет обогащать пробы специфичными гиперметилированными участками фетальной ДНК путём применения антител, специфичных к 5-метилцитозину. Впервые иммунопреципитация метилированных участков ДНК была применена в сочетании с анализом на высокоразрешающих микрочипах, что позволило идентифицировать большое количество участков хромосом 13, 18, 21, X и Y, дифференциально метилированных у матери и плода и таким образом потенциально

Таблица 2

Преимущества и недостатки методов неинвазивной пренатальной диагностики анеуплоидий

Наименование метода/технологии	Чувствительность/ Специфичность (%)	Стоимость	Воспроизводимость	Преимущества	Технические и клинические проблемы
Обработка формальдегидом	Чувствительность — 98,2% Специфичность — 66,6%	Низкая	Плохая	Непрямое обогащение ДНК плода	Требуется большого количества информативных полиморфизмов
Исследование метилирования с использованием бисульфита натрия	Небольшие независимые исследования	Низкая	Не оценивалась	Прямое обогащение ДНК плода	Деградация ДНК, редко достигается полная конверсия
Исследование метилирования с использованием эндонуклеаз рестрикции	Небольшие независимые исследования	Низкая	Не оценивалась	Непрямое обогащение ДНК плода	Исследования ограничены количеством регионов с сайтами узнавания для эндонуклеаз рестрикции
Секвенирование следующего поколения	Чувствительность — 99,2 — 100% Специфичность — 97,9 — 99,7%	Высокая	Да	Надёжный	Требуется значительных временных затрат, кропотливости при выполнении работ, технических знаний, дорогостоящего оборудования и инфраструктуры
Иммунопреципитация метилированной ДНК	Чувствительность — 100% Специфичность — 100%	Низкая	Не оценивалась	Результаты готовы в течение 3—4 дней	Требуют 100%-ной эффективности антител, тщательного контроля качества реагентов перед использованием

представляющих собой достоверные биомаркёры анеуплоидий [27]. Впоследствии в той же лаборатории была разработана детальная методика неинвазивной пренатальной диагностики трисомии хромосомы 21. Несколько выбранных участков 21-й хромосомы, дифференциально метилированных у матери и плода, обогащались методом иммунопреципитации и подвергались количественному анализу методом количественной ПЦР в реальном времени. Так удавалось детектировать изменения относительного количества ДНК 21-й хромосомы при трисомии по сравнению с эуплоидным состоянием (табл. 2) [28]. Впоследствии, использование модифицированного набора дифференциально метилированных участков ДНК 21-й хромосомы дало ещё более высокую значимость наблюдаемых различий между нормой и патологией и, вследствие этого, более высокую достоверность анализа [32].

Методы, основанные на анализе фетальной сРНК

Матричные РНК (мРНК), активно транскрибирующиеся у плода, также попадают в материнский кровоток. Наличие фетальной мРНК в крови матери впервые было описано в 2000 г. [29] и положило начало активному поиску РНК-маркёров генетического материала плода. В данном аспекте РНК представляет собой более удобный материал, нежели ДНК, так как все мРНК, активно экспрессирующиеся в плаценте и не экспрессирующиеся у матери будут представлять собой генетический материал плода. Масштабное профилирование фетальных мРНК в плазме крови матери при помощи микрочипов дало возможность выявить несколько десятков плацентарных генов [33]. Дальнейшие исследования позволили выделить из этого набора гены, локализованные на хромосоме 21, мРНК которых может быть обнаружена в плазме крови матери [26]. Однако вследствие того, что уровень экспрессии найденных генов, в целом, был невысок, а также того, что количество мРНК этих генов, как правило, сильно варьировало у пациенток, серьёзного развития данная методика не получила.

Тем не менее, плацентарная мРНК гена *PLAC4* была успешно применена для разработки стратегии пренатальной диагностики трисомии 21, использующей соотношение между аллелями. В данном методе использовались гетерозиготные у плода полиморфизмы данного гена [19].

Суть подхода состояла в следующем. Если плод является эуплоидным и гетерозиготным по гену *PLAC4*, то варианты мРНК, соответствующие двум аллелям данного гена, будут присутствовать в плазме крови матери в соотношении 1:1. Если плод анеуплоидный, то соотношение будет составлять 2:1 (рис. 1). Измеряя соотношение между аллелями методом количественной ПЦР, можно диагностировать трисомию хромосомы 21. Исследование, в которое были включены 153 беременные женщины на первом триместре беременности, включая

нормальные случаи и трисомии хромосомы 21, показало, что чувствительность метода составляет 100%, а специфичность — 89,7% (табл. 2) [34].

Кроме того, подобная стратегия с использованием гена *SERPINB2* была также применена для пренатальной диагностики трисомии хромосомы 18 [35].

Основным минусом таких подходов служит то, что они применимы только в том случае, если плод является гетерозиготным по исследуемому аллелю. Так, частота встречаемости гетерозигот по использованному авторами полиморфизму гена *PLAC4* составляет около 45% для европейской популяции, что говорит о том, что этот метод может дать информативные результаты только в половине случаев. С другой стороны, степень применимости такой стратегии может быть значительно увеличена путём одновременного анализа нескольких полиморфизмов мРНК плацентарных генов 21-й хромосомы.

Секвенирование следующего поколения

Реализация технологий секвенирования следующего поколения в развитии неинвазивной пренатальной диагностики анеуплоидий произвела революцию в этой области. В 2008 г. две независимые группы продемонстри-

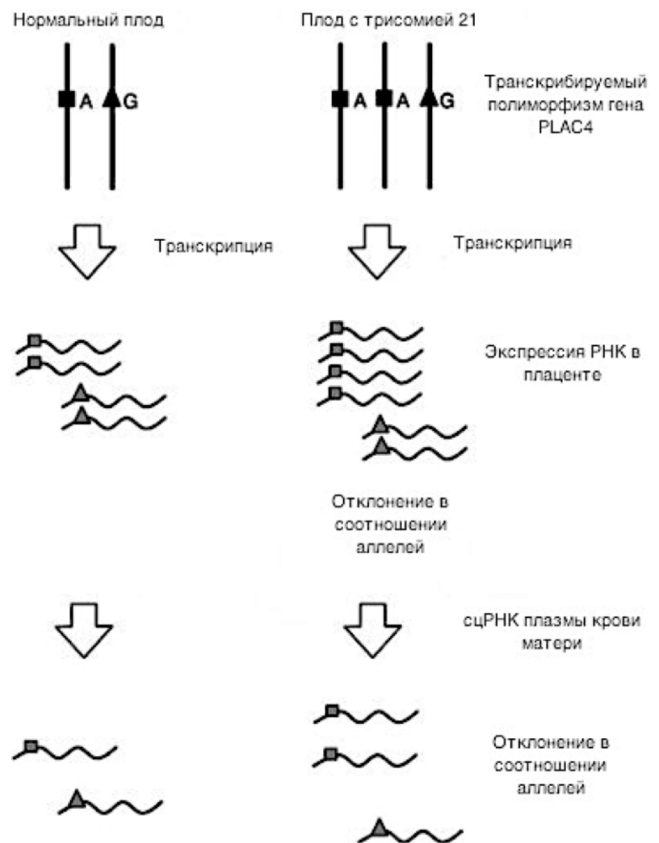


Рис. 1. Схема стратегии диагностики трисомии, использующей соотношение между аллелями [19]

ровали, что неинвазивная пренатальная диагностика трисомии хромосомы 21 может быть осуществлена с использованием массивно-параллельного секвенирования сцДНК материнской плазмы методом «дробовика» [6, 13]. Такой подход заключается в получении большого количества (несколько миллионов) коротких прочтений, которые картируются на референтную последовательность генома человека, в результате чего каждое прочтение может быть соотнесено с определённым участком хромосомы. Подсчитывая количество прочтений, попавших на определённые участки хромосом, можно сделать вывод о том, находится ли данный фрагмент в избыточном или в недостаточном количестве относительно эуплоидного генома (рис. 2). В работе Y.C. Fan такая методика была протестирована на плазме пациенток со сроком гестации 10–35 недель. Учёным удалось выявить все случаи возникновения хромосомных аномалий, таким образом, чувствительность и специфичность предложенного метода составили 100%, хотя размер выборки в данном исследовании оказался небольшим (n=14). В работе R.W.K. Chiu использовалась та же методика высокопараллельного секвенирования, однако авторы применили усовершенствованный алгоритм подсчёта прочтений, учитывая только прочтения, соответствующие уникальным участкам генома. Таким образом, исследователям удалось избавиться от отклонений, вносимых повторяющимися последовательностями мобильных элементов генома. Последующие исследования, направленные на разработку методов детекции трисомий 13 и 18, были менее успешными, что связано с отклонениями по среднему GC-составу различных аутосом [7].

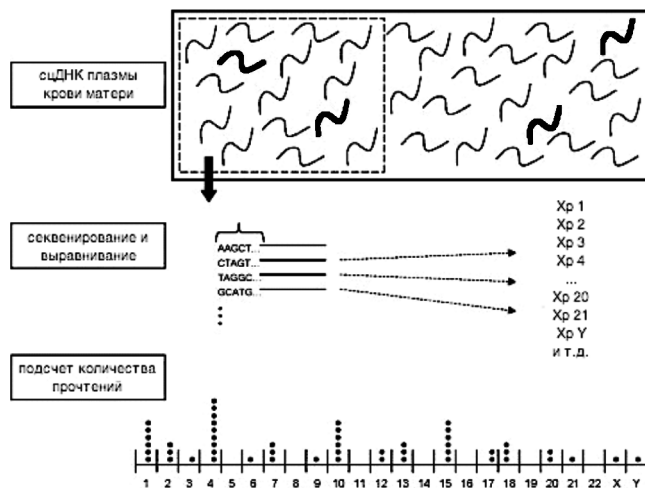


Рис. 2. Общая схема эксперимента по определению ploидности плода методом высокопараллельного секвенирования сцДНК плазмы крови матери. В результате секвенирования образца плазмы крови матери получается несколько миллионов коротких прочтений, которые соотносятся с определённой хромосомой. Количество уникальных последовательностей для каждой хромосомы подсчитывается и выражается в виде доли от общего числа прочтений. Впоследствии тестируемый образец сравнивается с нормой, что даёт информацию о ploидности каждой хромосомы [6]

Стоит отметить, что наблюдаемые различия между нормой и патологией, как правило, невелики даже при теоретических расчётах. Так, если у плода трисомия хромосомы 21 и фракция ДНК плода составляет 10%, то относительный избыток фрагментов ДНК хромосомы 21 будет равен $(0,9 \cdot 2) + (0,1 \cdot 3) = 2,1$ по сравнению с нормальным плодом — $(0,9 \cdot 2) + (0,1 \cdot 2) = 2$, т.е. относительное увеличение плотности покрытия хромосомы 21 составляет только 5% [31]. Поэтому для достоверной детекции таких различий необходимо получать большое количество прочтений и в каждом случае должно проводиться нормирование плотности покрытия.

Нормировать плотность покрытия можно двумя основными способами. В первом показателе количества прочтений, относящиеся к определённой хромосоме, нормируются на усреднённое значение плотности покрытия всех остальных хромосом. Другой вариант предполагает сравнение с внешним контролем, т.е. сравнение соотношения прочтений, приходящихся на определённый участок, к общему количеству прочтений в эксперименте и в эуплоидном контроле.

Помимо количества прочтений определённые сложности анализа привносит и GC-состав анализируемых участков. Большинство существующих ныне систем секвенирования следующего поколения не очень эффективно прочитывают последовательности GC и AT богатых участков. Это создаёт необходимость введения дополнительных этапов статистического анализа в эксперимент [22].

Важным преимуществом технологии высокопараллельного секвенирования перед другими методами неинвазивной пренатальной диагностики является то, что данный подход может быть использован вне зависимости от пола или статуса определённых полиморфизмов плода, а также то, что при проведении одного теста можно получить информацию о наличии или отсутствии всех видов анеуплоидий. Недостатками же являются высокая стоимость расходных материалов, отсутствие масштабируемости эксперимента и время работы прибора (у большинства современных систем 2–3 дня). Однако в 2013 г. появилось сообщение об использовании полупроводникового секвенатора Ion Torrent для пренатальной диагностики анеуплоидий. Несмотря на сравнительно небольшую производительность данного прибора, он характеризуется наименьшей стоимостью запуска и при этом наибольшей скоростью секвенирования из существующих на данный момент платформ. С использованием данной системы была проведена детекция анеуплоидий у 13 пациенток (6 — с трисомией 21, 2 — с трисомией 18, 1 — с трисомией 13 и 4 — с эуплоидным геномом плода) (табл. 2). Авторы данной работы также разработали эффективный алгоритм обработки и нормализации результатов. Референтная последовательность генома была условно поделена на «корзины» длиной 60 т.п.н., для каждой из которых подсчитывалось относительное количество уникальных последовательностей и содержание

ГС. Исходя из этих показателей, для каждой «корзины» рассчитывался коэффициент, на который нормировалось количество прочтений. В итоге исследователям удалось практически полностью избавиться от отклонений в количестве прочтений по различным участкам хромосом и достоверно определить случаи трисомий [35].

Заключение

Развитие методов неинвазивной пренатальной диагностики хромосомной патологии плода ориентировано на развитие безопасных и эффективных методов, позволяющих избежать риск потери плода, связанного с используемыми в настоящее время инвазивными методами диагностики. Открытие в 1997 г. внеклеточной фетальной ДНК, свободно циркулирующей в плазме крови матери, положило теоретическую основу для разработок в данной области. В настоящий момент разработано несколько методов, потенциально готовых к внедрению в клиническую практику. Это, в первую очередь, секвенирование следующего поколения, а также методы, основанные на иммунопреципитации метилированной ДНК и анализе свободно циркулирующей фетальной РНК.

В идеале система пренатальной диагностики анеуплоидий должна быть надёжной и воспроизводимой, возможность её применения не должна зависеть от пола или статуса полиморфизмов плода, кроме того, её стоимость должна быть сравнима со стоимостью комплекса биохимических и генетических тестов, применяемых в настоящее время. К сожалению, ни один из современных методов неинвазивной пренатальной диагностики не удовлетворяет одновременно всем требованиям.

Стратегия определения соотношения между аллелями является наиболее дешёвой и простой с технологической точки зрения, однако её основной недостаток заключается в том, что её применимость зависит от статуса полиморфизмов плода. При этом стоит отметить, что увеличение количества маркерных полиморфизмов может в значительной степени расширить возможности применения этого метода.

В плане применимости секвенирование следующего поколения является идеальным методом, позволяющим проводить исследование на любом сроке беременности и не накладывающим каких-либо дополнительных требований к тестируемому. Однако использование данной методики ограничивается стоимостью оборудования и высокими требованиями к квалификации персонала. Тем не менее, на сегодняшний день уже несколько зарубежных биотехнологических компаний (SEQUENOM, Aria Diagnostics, Verinata Health и другие) предоставляют услуги по пренатальной диагностике, применяя данный подход.

Все описанные здесь стратегии нуждаются в дополнительном тестировании и валидации их диагностического потенциала, для чего необходимо проведение популяционных клинических исследований. Только после этого неинвазивная пренатальная диагностика хромосомной патологии сможет стать реальностью.

Список литературы

1. Chan K.C.A. et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis // *Clinical chemistry*. — 2006. — Vol. 52, №12. — P. 2211–2218.
2. Chan K.C.A. et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma // *Clinical chemistry*. — 2004. — Vol. 50, №1. — P. 88–92.
3. Chim S.S.C. et al. Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21 // *Clinical chemistry*. — 2008. — Vol. 54, №3. — P. 500–511.
4. Chim S.S.C. et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2005. — Vol. 102, №41. — P. 14753–14758.
5. Chinnapapagari S.K.R. et al. Treatment of maternal blood samples with formaldehyde does not alter the proportion of circulatory fetal nucleic acids (DNA and mRNA) in maternal plasma // *Clinical chemistry*. — 2005. — Vol. 51, №3. — P. 652–655.
6. Chiu R.W.K. et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2008. — Vol. 105, №51. — P. 20458–20463.
7. Chiu R.W.K. et al. Maternal plasma DNA analysis with massively parallel sequencing by ligation for noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21 // *Clinical chemistry*. — 2010. — Vol. 56, №3. — P. 459–463.
8. Dennis Lo Y.M., Chiu R.W.K. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids // *Nature reviews. Genetics*. — 2007. — Vol. 8, №1. — P. 71–77.
9. Dhallan R. et al. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study // *Lancet*. — 2007. — Vol. 369, №9560. — P. 474–481.
10. Driscoll D.A., Gross S. Clinical practice. Prenatal screening for aneuploidy // *The New England journal of medicine*. — 2009. — Vol. 360, №24. — P. 2556–2562.
11. Eckhardt F. et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22 // *Nature genetics*. — 2006. — Vol. 38, №12. — P. 1378–1385.
12. Esteller M. et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients // *Cancer research*. — 1999. — Vol. 59, №1. — P. 67–70.
13. Fan H.C. et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2008. — Vol. 105, №42. — P. 16266–16271.
14. Finning K. et al. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study // *BMJ (Clinical research ed.)*. — 2008. — Vol. 336, №7648. — P. 816–818.
15. Grunau C., Clark S.J., Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters // *Nucleic acids research*. — 2001. — Vol. 29, №13. — P. E65–5.
16. Guo Q. et al. Simultaneous detection of trisomies 13, 18, and 21 with multiplex ligation-dependent probe amplification-based real-time PCR // *Clinical chemistry*. — 2010. — Vol. 56, №9. — P. 1451–1459.
17. Herman J.G. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1996. — Vol. 93, №18. — P. 9821–9826.

18. Li Y. et al. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms // *Clinical chemistry*. — 2004. — Vol. 50, №6. — P. 1002–1011.
19. Lo Y.M.D. et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection // *Nature medicine*. — 2007. — Vol. 13, №2. — P. 218–223.
20. Lo Y.M. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum // *Lancet*. — 1997. — Vol. 350, №9076. — P. 485–487.
21. Lo Y.M. et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis // *American journal of human genetics*. — 1998. — Vol. 62, №4. — P. 768–775.
22. Lo Y.M.D., Chan K.C.A., Chiu R.W.K. Noninvasive fetal trisomy 21 detection using chromosome-selective sequencing: a variation of the molecular counting theme // *Expert review of molecular diagnostics*. — 2012. — Vol. 12, №4. — P. 329–331.
23. Lui Y.Y.N. et al. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation // *Clinical chemistry*. — 2002. — Vol. 48, №3. — P. 421–427.
24. Ng E.K.O. et al. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2003. — Vol. 100, №8. — P. 4748–4753.
25. Old R.W. et al. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome // *Reproductive biomedicine online*. — 2007. — Vol. 15, №2. — P. 227–235.
26. Oudejans C.B.M. et al. Detection of chromosome 21-encoded mRNA of placental origin in maternal plasma // *Clinical chemistry*. — 2003. — Vol. 49, №9. — P. 1445–1449.
27. Papageorgiou E.A. et al. Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies // *The American journal of pathology*. — 2009. — Vol. 174, №5. — P. 1609–1618.
28. Papageorgiou E.A. et al. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21 // *Nature medicine*. — 2011. — Vol. 17, №4. — P. 510–513.
29. Poon L.L. et al. Presence of fetal RNA in maternal plasma // *Clinical chemistry*. — 2000. — Vol. 46, №11. — P. 1832–1834.
30. Poon L.L.M. et al. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma // *Clinical chemistry*. — 2002. — Vol. 48, №1. — P. 35–41.
31. Sehnert A.J. et al. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood // *Clinical chemistry*. — 2011. — Vol. 57, №7. — P. 1042–1049.
32. Tsiliki E. et al. MeDIP real-time qPCR of maternal peripheral blood reliably identifies trisomy 21 // *Prenatal diagnosis*. — 2012. — Vol. 32, №10. — P. 996–1001.
33. Tsui N.B.Y. et al. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling // *Journal of medical genetics*. — 2004. — Vol. 41, №6. — P. 461–467.
34. Tsui N.B.Y. et al. Synergy of total PLAC4 RNA concentration and measurement of the RNA single-nucleotide polymorphism allelic ratio for the noninvasive prenatal detection of trisomy 21 // *Clinical chemistry*. — 2010. — Vol. 56, №1. — P. 73–81.
35. Tsui N.B.Y. et al. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study // *Prenatal diagnosis*. — 2009. — Vol. 29, №11. — P. 1031–1037.
36. Wapner R. et al. First-trimester screening for trisomies 21 and 18 // *The New England journal of medicine*. — 2003. — Vol. 349, №15. — P. 1405–1413.
37. Yuan Y. et al. Feasibility study of semiconductor sequencing for noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy // *Clinical chemistry*. — 2013. — Vol. 59, №5. — P. 846–849.

Modern methods of noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies

Dominova I.N., Paradnik D.Ju., Patrushev M.V., Toshchakov S.V.

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia; e-mail: post@kantiana.ru

Opening of the fetal DNA in maternal serum has led to the development of noninvasive prenatal diagnosis of the fetal aneuploidies. Several approaches have been developed to diagnose fetal aneuploidies using different biomarkers of fetal DNA. Existing methods for noninvasive prenatal diagnosis, their advantages and disadvantages, the potential introduction into clinical practice have been described in the review.

Key words: noninvasive prenatal diagnosis, Down syndrome, Patau syndrome, trisomy, cell-free DNA

Ассоциация полиморфных вариантов гена транспортера ABCG1 с концентрацией холестерина плазмы крови при атеросклерозе*

Мирошникова В.В.^{1,2}, Пантелеева А.А.³, Демина Е.П.¹, Курьянов П.С.², Вавилов В.Н.², Уразгильдеева С.А.⁴, Гуревич В.С.⁴, Сироткина О.С.^{1,2}, Шварцман А.Л.¹

¹ — Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, 188300, Ленинградская область, Гатчина, Орлова роща, тел. (81371)323-03, e-mail: www.biod.pnpi.spb.ru

² — Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8, тел. (812)347-55-46, e-mail: www.spb-gmu.ru

³ — Санкт-Петербургский государственный технологический институт, 190013, Санкт-Петербург, Московский пр., 26, тел. (812)494-92-99, e-mail: www.technolog.edu.ru

⁴ — Центр атеросклероза и нарушений липидного обмена Клинической больницы №122 им. Л.Г. Соколова ФМБА, 194291, Санкт-Петербург, пр. Культуры, 4, тел. (812)559-97-59, e-mail: www.med122.com

Нарушение обратного транспорта холестерина (ОТХ) является фактором риска развития атеросклероза. В данной работе была исследована роль ключевого белка ОТХ — транспортера ABCG1 — в обмене холестерина при атеросклерозе. Распределение генотипов полиморфных вариантов (-134)T>G (SNPID rs1378577), (-204)A>C (SNPID rs1893590) и (-384)G>A (SNPID rs4148082) гена ABCG1 было изучено в группе пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе. Корреляционный анализ продемонстрировал достоверную ассоциацию вариантов (-134)T>G и (-204)A>C гена ABCG1 с концентрацией общего холестерина плазмы крови. Однако варианты (-134)T>G, (-204)A>C и (-384)G>A гена ABCG1 не были ассоциированы с повышенным риском развития атеросклероза.

Ключевые слова: атеросклероз, транспортер ABCG1, ген ABCG1

Введение

Антиатерогенная функция липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), которая заключается в обратном транспорте холестерина (ОТХ) из периферических тканей в печень, была подтверждена во многих экспериментальных, клинических и эпидемиологических исследованиях [5, 6, 11]. Ключевую роль в элиминации холестерина из периферических клеток играют АТФ-связывающие кассетные транспортеры семейства ABC [9]. Транспортер ABCG1 осуществляет перенос холестерина из внутриклеточного матрикса на частицы ЛПВП и, таким образом, обеспечивает их насыщение холестерином [19].

Ген ABCG1 локализован в хромосомном районе 21q22.3 и содержит значительное число однонуклеотидных замен (Single nucleotide polymorphism, SNP), большая часть которых локализована в регуляторных областях данного гена [12]. Несмотря на то, что полногеномный анализ ассоциаций (GWAS) не выявил связи SNP в гене ABCG1 с заболеваниями сердечно-сосудистой системы и метаболическими нарушениями [10, 22], для ряда популяций была продемонстрирована ассоциация полиморфных вариантов гена ABCG1 с развитием коро-

нарной болезни сердца и сахарного диабета [8, 20, 21, 23]. Исследования также показали, что вариации нуклеотидной последовательности в промоторной области гена ABCG1, влияющие на уровень экспрессии гена, могут быть связаны с уровнем общего холестерина (ОХС) и холестерина в составе ЛПВП (Х-ЛПВП) плазмы крови [3, 4, 7, 20].

Таким образом, можно предположить, что изменение уровня экспрессии транспортера ABCG1 может оказывать влияние на эффективность ОТХ и как следствие — на предрасположенность к развитию атеросклероза у человека [14, 15]. Снижение уровня транскрипции гена ABCG1, в частности, наблюдается при следующих заменах в промоторной области: (-134)T>G (SNPID rs1378577), (-204)A>C (SNPID rs1893590) и (-384)G>A (SNPID 4148082) [8, 12, 17].

Вклад данных полиморфных вариантов в развитие атеросклероза в популяции России ранее не был исследован.

Целью настоящей работы было исследование ассоциации полиморфных вариантов (-134)T>G, (-204)A>C и (-384)G>A гена ABCG1 с развитием атеросклероза и уровнем холестерина плазмы крови в популяции Северо-Западного региона России.

* Работа поддержана грантом РФФИ (№10-04-01151-а).

Результаты

Частоты генотипов полиморфных вариантов $(-134)T>G$, $(-204)A>C$ и $(-384)G>A$ гена *ABCG1* в группе пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе представлены в табл. 1. В исследуемых группах распределение генотипов гена *ABCG1* находилось в соответствии с распределением Харди—Вайнберга. Различий в частотах вариантов $(-134)T>G$, $(-204)A>C$ и $(-384)G>A$ гена *ABCG1* между группой пациентов с атеросклерозом и контрольной группой обнаружено не было. Таким образом, исследованные варианты гена *ABCG1* не вносят вклад в риск развития атеросклероза у жителей Северо-Западного региона России.

Анализ сцепления полиморфных аллелей гена *ABCG1*, проведённый при генотипировании 604 индивидов (382 представителя контрольной группы и 222 пациента), продемонстрировал неравновесное сцепление вариантов $(-134)T>G$ и $(-204)A>C$ ($D' = 0,93$, $r^2 = 0,51$, $p < 0,0001$). Ранее неравновесное сцепление этих полиморфных вариантов было показано и для европейской популяции ($D' = 0,96$, $r^2 = 0,68$) [17]. Сцепления варианта $(-384)G>A$ с вариантами $(-134)T>G$ и $(-204)A>C$ гена *ABCG1* в данном исследовании, а также в других популяциях, выявлено не было. Однако нужно учесть, что ввиду малой частоты редкого аллеля $A(-384)$ размер нашей выборки может быть недостаточным для установления факта сцепления варианта $(-384)G>A$ с другими исследованными вариантами гена *ABCG1*.

Среди больных атеросклерозом ($N=115$), не принимавших статины и другие препараты, способных повлиять на уровень липидов плазмы крови, и в контрольной группе был проведён анализ корреляции вариантов гена *ABCG1* с концентрацией ОХС и Х-ЛПВП (табл. 2 и 3). Выявлена достоверная корреляция вариантов $(-134)T>G$ и $(-204)A>C$ гена *ABCG1* с уровнем ОХС плазмы крови в контрольной группе (табл. 2). Редкие аллели $G(-134)$ и $C(-204)$ гена *ABCG1* были ассоциированы с повышением уровня ОХС плазмы крови у представителей контрольной группы. Варианты $(-204)A>C$ гена *ABCG1* также коррелировали с уровнем Х-ЛПВП в плазме крови у здоровых лиц (табл. 2). У носителей генотипа $CC(-204)$ *ABCG1* уровень Х-ЛПВП был достоверно выше, чем у носителей генотипов $AC(-204)$ и $AA(-204)$ ($1,29 \pm 0,45$ vs $1,13 \pm 0,27$, $p < 0,02$).

Значения концентраций ОХС и Х-ЛПВП при носительстве различных генотипов полиморфных вариантов гена *ABCG1* в группе пациентов представлены в табл. 3. Среди пациентов носители генотипа $GG(-134)$ *ABCG1* демонстрируют более высокий уровень холестерина по сравнению с носителями генотипов $TT(-134)$ и $TG(-134)$ (табл. 3). Корреляции вариантов $(-384)G>A$ гена *ABCG1* с уровнем ОХС и Х-ЛПВП плазмы крови в исследованных группах выявлено не было.

Обсуждение

Атеросклероз — сложное многофакторное заболевание, развивающееся при тесном взаимодействии генетических и средовых факторов. Однако генетические факторы риска развития атеросклероза для конкретных популяций в настоящее время изучены недостаточно [1]. Значительную роль в патогенезе атеросклероза играют нарушения ОТХ [11]. Ключевая роль в ОТХ из сосудистой стенки отводится трансмембранным транспортёрам семейства ABC [9, 19]. Показано, что полиморфизм генов *ABCA1* и *ABCG1* ассоциирован с изменениями липидного профиля плазмы крови и модулирует риск развития сердечно-сосудистых заболеваний в ряде популяций [2, 20]. В данной работе мы впервые исследовали распределение частот вариантов $(-134)T>G$, $(-204)A>C$ и $(-384)G>A$ гена *ABCG1* в популяции Северо-Западного региона России. Нужно отметить, что вопрос о влиянии полиморфных вариантов гена *ABCG1* на липидный профиль плазмы крови и риск развития атеросклероза в популяции России до сих пор оставался неизученным.

Наше исследование продемонстрировало достоверную корреляцию вариантов $(-134)T>G$ и $(-204)A>C$ гена *ABCG1* с концентрацией ОХС плазмы крови (табл. 2). Редкие аллели $G(-134)$ и $C(-204)$ гена *ABCG1* были ассоциированы с повышением уровня ОХС плазмы крови у здоровых лиц. Нужно отметить, что данные варианты находятся в неравновесном сцеплении: генотипу $GG(-134)$ чаще всего соответствует генотип $CC(-204)$. Поэтому влияние на концентрацию ОХС плазмы крови одного из полиморфных вариантов может объясняться влиянием второго варианта.

Данное исследование показало, что в контрольной группе у носителей генотипа $CC(-204)$ *ABCG1* уровень

Таблица 1

Частоты вариантов гена *ABCG1* в группе больных атеросклерозом и в контрольной группе

Генетический вариант	Группа пациентов с атеросклерозом				Контрольная группа				Достоверность различий, р
	Частоты генотипов, N (%)			Частота редкого аллеля	Частоты генотипов, N (%)			Частота редкого аллеля	
	NN	NM	MM		NN	NM	MM		
$(-134)T>G$	133 (59,9)	77 (34,7)	12 (5,4)	0,23	224 (58,6)	129 (33,8)	29 (7,6)	0,24	$p > 0,05$
$(-204)A>C$	94 (42,3)	99 (44,6)	29 (13,1)	0,35	166 (43,5)	167 (43,7)	49 (12,8)	0,35	$p > 0,05$
$(-384)G>A$	215 (96,8)	7 (3,2)	0 (0)	0,02	367 (96,1)	14 (3,7)	1 (0,2)	0,02	$p > 0,05$

Примечание. NN — гомозигота; NM — гетерозигота по редкому аллелю; MM — гомозигота по редкому аллелю

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Х-ЛПВП в плазме крови был выше, чем у носителей генотипов *AC(-204)* и *AA(-204)*. Исследование, проведённое ранее в популяции Испании, продемонстрировало ассоциацию аллеля *C(-204)* гена *ABCG1* с повышением концентрации Х-ЛПВП [3]. Однако можно предположить, что данный эффект может наблюдаться за счёт повышения концентрации ОХС плазмы крови, которое имеет место у носителей аллеля *C(-204)* гена *ABCG1*. В то же время ни в нашем исследовании, ни в европейской популяции не была показана ассоциация вариантов *(-134)T>G* с уровнем Х-ЛПВП [3, 20], что можно объяснить неполным сцеплением между вариантами *(-134)T>G* и *(-204)A>C* гена *ABCG1*.

Механизм влияния полиморфных вариантов *(-134)T>G* и *(-204)A>C* гена *ABCG1* на концентрацию холестерина в плазме крови неизвестен. Однако он может быть связан с возможным влиянием исследованных вариантов на уровень экспрессии гена *ABCG1* [19]. Эти вариации представляют собой однонуклеотидные замены в промоторной области гена *ABCG1* в позициях (-134) и (-204) от сайта начала транскрипции и могут затрагивать сайты посадки транскрипционных факторов. Действительно, для вариантов *(-134)T>G* и *(-204)A>C* гена *ABCG1* было показано снижение уровня транскрипции гена *ABCG1* [10, 19]. При этом самый низкий уровень экспрессии гена

Таблица 2

Содержание холестерина плазмы крови при различных генотипах полиморфных вариантов гена *ABCG1* в контрольной группе

Варианты гена <i>ABCG1</i>		Общий холестерин, ммоль/л ± SD	р	Х-ЛПВП, ммоль/л ± SD	р
<i>(-134)T>G</i>	<i>TT</i>	5,12±1,42	0,072	1,12±0,30	0,284
	<i>TG</i>	5,61±1,19		1,20±0,36	
	<i>GG</i>	5,63±1,30		1,16±0,23	
<i>(-134)T>G</i>	<i>TT</i>	5,12±1,42	0,022*	1,12±0,30	0,128
	<i>TG+GG</i>	5,62±1,21		1,19±0,31	
<i>(-204)A>C</i>	<i>AA</i>	5,06±1,44	0,119	1,14±0,29	0,171
	<i>AC</i>	5,50±1,34		1,11±0,24	
	<i>CC</i>	5,49±1,06		1,29±0,44	
<i>(-204)A>C</i>	<i>AA</i>	5,06±1,44	0,039*	1,14±0,29	0,654
	<i>AC+CC</i>	5,50±1,43		1,16±0,31	
<i>(-384)G>A</i>	<i>GG</i>	5,38±1,17	0,784	1,13±0,36	0,334
	<i>GA+AA</i>	5,13±1,15		0,94±0,05	

Примечание. * – $p < 0,05$, t-критерий Стьюдента

Таблица 3

Содержание холестерина плазмы крови при различных генотипах полиморфных вариантов гена *ABCG1* у пациентов, не принимающих статины

Варианты гена <i>ABCG1</i>		Общий холестерин, ммоль/л ± SD	р	Х-ЛПВП, ммоль/л ± SD	р
<i>(-134)T>G</i>	<i>TT</i>	5,47±1,23	0,008* 0,001**	1,12±0,34	0,377
	<i>TG</i>	4,98±1,00		1,07±0,35	
	<i>GG</i>	6,11±0,68		1,30±0,47	
<i>(-134)T>G</i>	<i>TT+TG</i>	5,30±1,17	0,014***	1,11±0,34	0,209
	<i>GG</i>	6,11±0,68		1,30±0,47	
<i>(-204)A>C</i>	<i>AA</i>	5,56±1,23	0,067	1,20±0,33	0,203
	<i>AC</i>	5,11±1,06		1,06±0,34	
	<i>CC</i>	5,75±1,20		1,16±0,46	
<i>(-204)A>C</i>	<i>AA+AC</i>	5,28±0,15	0,077	1,12±0,34	0,776
	<i>CC</i>	5,75±1,20		1,16±0,46	
<i>(-384)G>A</i>	<i>GG</i>	5,38±1,17	0,784	1,13±0,36	0,334
	<i>GA+AA</i>	5,13±1,15		0,94±0,05	

Примечание. * – One-Way ANOVA; ** – $p = 0,001$ для (*TG*vs*GG*); $p = 0,060$ для (*TT*vs*TG*); $p = 0,062$ для (*TT*vs*GG*), критерий парных сравнений Джеймса–Ховелла; *** – $p < 0,02$, t-критерий Стьюдента

ABCG1 был характерен для аллеля *G(-134)C(-204)* [17]. Снижение уровня экспрессии гена *ABCG1* приводит к подавлению оттока холестерина из периферических тканей и как следствие — к уменьшению эффективности ОТХ [13, 25, 24]. Снижение скорости ОТХ, в свою очередь, может объяснить более высокий уровень ОХС при носительстве вариантов *(-134)T>G* и *(-204)A>C* гена *ABCG1*.

На концентрацию ОХС и Х-ЛПВП у больных атеросклерозом существенное влияние могут оказывать статины и другие гиполипидемические препараты, направленные на коррекцию липидного спектра плазмы крови [18]. Поэтому анализ корреляции полиморфных вариантов гена *ABCG1* с концентрацией ОХС и Х-ЛПВП был проведён в подгруппе пациентов с атеросклерозом, не принимающих статины. Среди больных атеросклерозом носительство генотипа *GG(-134) ABCG1* было ассоциировано с более высоким уровнем ОХС плазмы крови по сравнению с носителями генотипов *TT(-134)* и *TG(-134)*. В то же время наше исследование показало, что варианты *(-134)T>G* гена *ABCG1* не вносят вклад в риск развития атеросклероза, что согласуется с данными, полученными в европейской популяции [20]. Частота редкого аллеля *G(-134)* гена *ABCG1* для популяции России составила 0,23, что также соответствует европейской популяции. В то же время в популяции Японии была показана ассоциация аллеля *G(-134)* гена *ABCG1* с коронарной болезнью сердца [8]. Однако аллель *G(-134)* гена *ABCG1* в популяции Японии встречается значительно чаще (частота 0,44). Также отмечено снижение концентрации Х-ЛПВП в плазме крови у большинства носителей генотипа *GG(-134) ABCG1* в японской популяции [8].

При анализе корреляции вариантов *(-204)A>C* гена *ABCG1* с уровнем ОХС в группе пациентов различия не достигли статистической значимости. Следует отметить, что среди пациентов все носители генотипа *GG(-134)* были носителями генотипа *CC(-204)*, тогда как среди пациентов-носителей генотипа *CC(-204)* были носители различных генотипов *(-134)T>G ABCG1*. Таким образом, самый высокий уровень ОХС плазмы крови среди пациентов наблюдался при носительстве сочетанного генотипа *GG(-134)CC(-204) ABCG1*. Однако носительство генотипа *GG(-134)CC(-204) ABCG1* не было ассоциировано с повышением риска развития атеросклероза.

Заключение

Таким образом, можно заключить, что полиморфные варианты *(-134)T>G*, *(-204)A>C* и *(-384)G>A* гена *ABCG1* не влияют на риск развития атеросклероза в популяции Северо-Западного региона России. Однако полиморфные варианты *(-134)T>G* и *(-204)A>C* оказывают влияние на концентрацию холестерина в плазме крови.

Список литературы

1. Готов О.С., Баранов В.С. Генетический полиморфизм, мультифакториальные болезни и долголетие // Медицинская генетика. — 2007. — Т. 6, №4. — С. 17–29.
2. Шейдина А.М., Пчелина С.Н., Родыгина Т.И., Сироткина О.В., Тараскина А.Е., Ходжаянц Н.Е., Шварцман А.Л., Шварц Е.И. Аллельные варианты генов *PON1* и *ABCA1* как факторы риска развития ишемического инсульта // Медицинская генетика. — 2006. — Т. 5, №2. — С. 40–44.
3. Abellan R., Mansego M.L., Martinez-Hervas S. et al. Association of selected ABC gene family single nucleotide polymorphisms with postprandial lipoproteins: Results from the population-based Horteaga study // *Atherosclerosis*. — 2010. — Vol. 211. — P. 203–209.
4. Abellan R., Mansego M.L., Martinez-Hervas S. et al. Dietary polyunsaturated fatty acids may increase plasma LDL-cholesterol and plasma cholesterol concentrations in carriers of an ABCG1 gene single nucleotide polymorphism: Study in two Spanish populations // *Atherosclerosis*. — 2011. — Vol. 219. — P. 900–906.
5. Boden W.E. High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial // *Am. J. Cardiol.* — 2000. — Vol. 86. — P. 19–22.
6. Despres J.P., Lemieux I., Dagenais G.R. et al. HDL cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the Quebec cardiovascular study // *Atherosclerosis*. — 2000. — Vol. 153. — P. 263–272.
7. Edmondson A.C., Braund P.S., Stylianou I.M. et al. Dense genotyping of candidate gene loci identifies variants associated with high-density lipoprotein cholesterol // *Circ. Cardiovasc. Genet.* — 2011. — Vol. 4. — P. 145–155.
8. Furuyama S., Uehara Y., Zhang B. et al. Genotypic effect of ABCG1 gene promoter -257T>G polymorphism on coronary artery disease severity in Japanese men // *J. Atheroscler. Thromb.* — 2009. — Vol. 16(3). — P. 194–200.
9. Gelissen I.C., Harris M., Rye K.A. et al. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to ApoA-I // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2006. — Vol. 26. — P. 534–540.
10. Hindorf L.A., Sethupathy P., Junkins H.A. et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2009. — Vol. 106. — P. 9362–9367.
11. Hovingh G.K., de Groot E., van der Steeg W. et al. Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis // *Curr. Opin. Lipidol.* — 2005. — Vol. 16(2). — P. 139–145.
12. Iida A., Saito S., Sekine A. et al. Catalog of 605 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among 13 genes encoding human ATP-binding cassette transporters: ABCA4, ABCA7, ABCA8, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, and ABCG8 // *J. Hum. Genetics*. — 2002. — Vol. 47. — P. 285–310.
13. Kennedy M.A., Barrera G.C., Nakamura K. et al. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation // *Cell Metab.* — 2005. — Vol. 1. — P. 121–131.
14. Li C., Guo R., Lou J., Zhou H. The transcription levels of ABCA1, ABCG1 and SR-BI are negatively associated with plasma CRP in Chinese populations with various risk factors for atherosclerosis // *Inflammation*. — 2012. — Vol. 35(5). — P. 1641–1648.
15. Mauldin J.P., Nagelin M.H., Wojcik A.J. et al. Reduced expression of ABCG1 increases cholesterol accumulation in macrophages of patients with type 2 diabetes // *Circulation*. — 2008. — Vol. 117(21). — P. 2785–2792.

16. Mueller J.C. Linkage disequilibrium for different scales and applications // Briefings in bioinformatics. — 2004. — Vol. 5(4). — P. 355—364.
17. Olivier M., Tanck M.W., Out R. et al. Human ATP-binding cassette G1 controls macrophage lipoprotein lipase bioavailability and promotes foam cell formation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2012. — Vol. 32. — P. 2223—2231.
18. Schmitz G., Langmann T. Pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy // *Vascular Pharmacology.* — 2006. — Vol. 44. — P. 75—89.
19. Schmitz G., Langmann T., Heimerl S. Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism // *J. Lipid Res.* — 2001. — Vol. 42. — P. 1513—1520.
20. Schou J., Jensen G., Frikke-Schmidt R. et al. Genetic variation in ABCG1 and risk of myocardial infarction and ischemic heart disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2012. — Vol. 32. — P. 506—515.
21. Schou J., Tybjaerg-Hansen A., Moller H.J. et al. ABC transporter genes and risk of type 2 diabetes: a study of 40,000 individuals from the general population // *Diabetes Care.* — 2012. — Vol. 35(12). — P. 2600—2606.
22. Wang X., Li X., Zhang Y.B. et al. Genome-wide linkage scan of a pedigree with familial hypercholesterolemia suggests susceptibility loci on chromosomes 3q25-26 and 21q22 // *PLoS ONE.* — 2011. — Vol. 6(10). — e24838.
23. Xu Y., Wang W., Zhang L. et al. A polymorphism in the ABCG1 promoter is functionally associated with coronary artery disease in a Chinese Han population // *Atherosclerosis.* — 2011. — Vol. 219. — P. 648—654.
24. Zhou H., Tan K.C., Shiu S.W., Wong Y. Determinants of leukocyte adenosine triphosphate binding cassette transporter G1 gene expression in type 2 diabetes mellitus // *Metabolism.* — 2008. — Vol. 57. — P. 1135—1140.

Association of ABCG1 transporter genetic variation with plasma cholesterol concentration in atherosclerosis

Miroshnikova V.V.^{1,2}, Panteleeva A.A.³, Demina E.P.¹, Kurjanov P.S.², Vavilov V.N.², Urazgildeeva S.A.⁴, Gurevich V.S.⁴, Sirotkina O.S.^{1,2}, Schwarzman A.L.¹

¹ — Petersburg nuclear physics institute;

Gatchina, Leningrad district, 188300, Russia, (81371)323-03, e-mail: www.biod.pnpi.spb.ru

² — Saint-Petersburg Pavlov State Medical University;

Lev Tolstoy str. 6/8, Saint Petersburg, 197022, Russia, (812)347-55-46, e-mail: www.spb-gmu.ru

³ — St. Petersburg State Technological Institute;

Moskovsky Prospect 26, Saint-Petersburg, 190013, Russia, (812)494-92-99, e-mail: www.technolog.edu.ru

⁴ — Center of Atherosclerosis and lipid disorders,

Federal State Medical Institution «Clinical Hospital №122 n.a. L.G. Sokolov under the Federal Medico-biologic Agency», pr. Kultury 4, 194291, St.Petersburg, Russia, (812)559-97-59, e-mail: www.med122.com

Disruption in reverse cholesterol transport (RCT) is a risk factor of atherosclerosis. In this study we investigated the role of key RCT protein — transporter ABCG1 — in cholesterol homeostasis at atherosclerosis. Allelic frequencies of *ABCG1* genetic variants (-134)T>G (SNPID rs1378577), (-204)A>C (SNPID rs1893590) and (-384)G>A (SNPID rs4148082) were determined in the group of patients with atherosclerosis and in the control group. Correlation analysis showed significant association of (-134)T>G and (-204)A>C variants with total plasma cholesterol concentration. However genetic variations (-134)T>G, (-204)A>C and (-384)G>A in the *ABCG1* gene were not associated with increased risk of atherosclerosis.

Key words: atherosclerosis, transporter ABCG1, *ABCG1* gene

Поиск маркёров риска развития рака мочевого пузыря на основе изучения полиморфных вариантов генов системы *Ahr-CYP**

Ахмадишина Л.З.¹, Корытина Г.Ф.¹, Кочетова О.В.¹, Урманцев М.Ф.²,
Измайлов А.А.², Измайлова С.М.², Павлов В.Н.², Викторова Т.В.^{1,2}

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук; 450054, Уфа, Проспект Октября, 71; тел. (факс): (347)235-60-88; e-mail: l.akhmadishina@gmail.com

² — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 450000, г.Уфа, ул. Ленина, 3; тел.: (347) 272-11-60; e-mail: ecolab_203@mail.ru

С целью оценки вклада полиморфных вариантов генов *CYP1A1*, *CYP1A2*, *AHR*, *AHRR*, *ARNT* в развитие и тяжесть течения рака мочевого пузыря (РМП), проведено генотипирование 289 образцов ДНК больных и 216 практически здоровых индивидов. Показано, что аллели *G* локуса *c.1384A>G* гена *CYP1A1* (OR=2,94), *delT* маркёра *g.29731delT* гена *CYP1A2* (OR=2,83) ассоциированы с риском развития опухоли мочевого пузыря.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, ассоциация, генетический полиморфизм, цитохром P450 1A1 и 1A2, система арил-гидрокарбонowego рецептора

Введение

РМП — это онкологическое заболевание, при котором наблюдается злокачественное перерождение клеток мочевого пузыря. Наиболее часто заболевание развивается в возрасте 50—70 лет [1, 18]. Большинство исследователей отмечает преимущественное поражение опухолью мочевого пузыря у мужчин (соотношение больных мужчин и женщин составляет 2,6:1).

Важнейшей причиной развития злокачественной трансформации служит взаимодействие генетических и внешнесредовых факторов, т.е. влияние неблагоприятных условий на генетически предрасположенный организм [7]. Среди внешних факторов риска развития РМП наиболее значимым является курение. Риск этой опухоли у курильщиков разных стран примерно одинаков: заболевание напрямую зависит от длительности курения и числа выкуриваемых сигарет в сутки [3].

Показано, что компоненты табачного дыма индуцируют экспрессию микросомальных ферментов (цитохрома P450 1A1, 1A2) через активацию системы арил-гидрокарбонowego рецептора, что, в свою очередь, может привести к нарушению равновесия между ксенобиотиками и скоростью их метаболизма и запуску механизмов канцерогенеза.

Поэтому целью нашего исследования было оценить вклад полиморфных вариантов *c.1384A>G* гена *CYP1A1*, *g.32035C>A* и *g.29731delT* гена *CYP1A2*, *c.1661 G>A* гена *AHR*, *c.565C>G* гена *AHRR*, *c.522G>C* гена *ARNT* в развитие и тяжесть течения РМП.

Материалы и методы

Материалом для молекулярно-генетического анализа послужили образцы ДНК, выделенные из лимфоцитов периферической венозной крови стандартным фенольно-хлороформным методом. Группу исследования составил 291 больной РМП. Средний возраст больных составил 60,93±11,32 года. Все больные находились на стационарном лечении в урологических отделениях клинических больниц г.Уфы: Республиканской клинической больнице им. Куватова, Республиканском онкологическом диспансере и клинике БГМУ, и были прооперированы в период с 2005 по 2012 гг. Клиническое обследование больных проводилось врачами стационаров и включало обязательные и дополнительные методы исследования. Диагноз основывался на данных анамнеза, результатах ультразвуковой диагностики (УЗИ) органов мочевой системы и гистологического исследования биопсийного материала. Среди обследованных пациентов было 245 мужчин (84,19%) и 46 женщин (15,81%). По этническому составу татары — 93 чел. (31,59%), башкиры — 25 чел. (8,59%) и русские — 173 чел. (59,45%). Курильщиками являлись 285 чел., бывшими курильщиками — 3 чел., и только 3 чел. не курили никогда. Индекс курения для курильщиков составил 29,37±14,61.

Контрольную группу составили 216 чел., жители Республики Башкортостан, отобранные по возрасту, полу и этнической принадлежности, без хронических заболеваний мочеполовой системы в анамнезе. Среди них 175 мужчин (81,02%) и 41 женщина (18,98%). Средний

* Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РГНФ №13-06-00101 и РФФИ №13-04-00287 А.

возраст составил $56,12 \pm 8,57$ года. По этническому составу татары — 74 чел. (34,26%), башкиры — 33 чел. (15,28%) и русские — 109 чел. (50,46%). Курильщиками были 127 чел., бывшими курильщиками — 6 чел., и 83 чел. не курили никогда. Индекс курения для курильщиков составил $20,79 \pm 15,11$.

Анализ полиморфных вариантов генов проводили методом ПЦР-ПДРФ и аллельспецифичной ПЦР. Условия проведения ПЦР, последовательности праймеров описаны ранее [11, 15, 17].

Результаты амплификации оценивали при помощи вертикального электрофореза в 6–8%-ном полиакриламидном геле (исходное соотношение акриламида и метиленабисакриламида 29:1) при напряжении 200–300 В (10 В/см). В качестве буфера использовали трис-боратный буфер (ТВЕ). По окончании электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия (0,1 мкг/мл) в течение 15 мин и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Для идентификации аллелей использовали маркер молекулярного веса с шагом 100 п.н. «100 bp DNA ladder» («Сибэнзим»).

Математическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакетов статистических программ: Microsoft Office Access, Microsoft Office Excel, BIOSTAT [2], SNPstats [6]. Вычисляли средние величины количественных показателей и их стандартные ошибки ($M \pm m$). При сравнении частот качественных признаков использовали критерий χ^2 . Анализ ассоциации проводили с использованием расчёта показателя отношения шансов (OR). При всех использованных методах анализа статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для выявления ассоциации полиморфных локусов в различных моделях (аддитивной, доминантной, рецессивной, модели сверхдоминирования) использовали метод логистической регрессии. Гипотезу о значимости независимых факторов проверяли на основе коэффициента t -статистики и уровня значимости (p_{value}) для коэффициента t . Экспоненту отдельного коэффициента регрессии (β) интерпретировали как OR для логистической модели с расчётом 95%-ного доверительного интервала (95%CI). Лучшую модель выбирали с использованием информационного критерия Акайке (AIC). Для каждого локуса, показавшего статистически значимые различия с контролем ($p_{\text{adj}} < 0,05$), выбирали модели с наименьшим значением AIC. Оценку взаимодействия генетических локусов и фактора курения оценивали при помощи регрессионного анализа в программе SNPStats [6].

Результаты и обсуждение

Нами проанализированы полиморфные локусы генов цитохрома P450 *IA1* и *IA2*, арилгидрокарбонового рецептора, репрессора и транслокатора арилгидрокарбонового рецептора в выборках больных РМП и практически здоровых индивидов. Данные о распределении частот аллелей и генотипов приведены в табл. 1 и 2.

В результате проведённого анализа распределения частот генотипов и аллелей маркера *c.1384A>G* гена *CYP1A1* было показано существование статистически значимых различий между группами больных и здоровых ($\chi^2=29,13$, $df=2$, $p=0,0001$ — для генотипов) и ($\chi^2=27,06$, $df=1$, $p=0,0001$ — для аллелей), что обусловлено статистически достоверным повышением у больных РМП частоты гетерозигот *AG* ($\chi^2=20,27$, $p=0,0005$, $p_{\text{cor}}=0,001$; OR=2,81, 95%CI 1,75–4,52) и гомозигот *GG* (2,84%, $\chi^2=4,40$, $p=0,04$). В выборке больных, как и в группе контроля, преобладали генотип *A* и аллель *A*. При анализе данных с учётом логистической регрессии полученные ассоциации сохранились, показав наиболее достоверные в аддитивной модели. Интересно отметить, что при введении поправок на этническое происхождение, пол, статус курения значение OR остаётся достоверным и даже увеличивается (табл. 1). Отдельный анализ мужчин и женщин показал сохранение ассоциации; так, наличие аллеля *G* увеличивает риск развития РМП почти в 3 раза у мужчин ($\chi^2=19,48$, $p=0,0005$; OR=2,94, 95%CI 1,77–4,92) и в 3,5 раза — у женщин ($\chi^2=8,27$, $p=0,005$; OR=3,48, 95%CI 1,43–8,66). Анализ больных с учётом клинического течения РМП не выявил достоверных различий в частотах генотипов ($\chi^2=3,88$, $p=0,15$) и аллелей ($\chi^2=1,48$, $p=0,23$) между группами больных с мышечно-инвазивной и мышечно-неинвазивной формами РМП.

В литературе достаточно широко представлены ассоциативные исследования роли полиморфных вариантов гена *CYP1A1* в развитии онкологической патологии, сроках манифестации, тяжести течения, скорости метастазирования. Однако подобные исследования довольно немногочисленны при опухолях мочевого пузыря. Так, M. Pande с соавторами показали, что у гетерозигот по полиморфному локусу *c.1384A>G* гена *CYP1A1* колоректальный рак развивается на 4 года раньше, чем у гомозигот по норме [14]. J.P. Grando с соавторами выявили ассоциацию риска развития РМП с присутствием гетерозиготного и полиморфного гомозиготного генотипа гена *CYP1A1* [5]. В то же время L. Fontana с соавторами никаких ассоциаций данного полиморфизма с РМП не обнаружили [4].

D. Surekha с соавторами показали ассоциацию гетерозиготного генотипа полиморфного локуса *c.1384A>G* гена *CYP1A1* с риском развития рака молочной железы [19], тогда как исследования, проведённые в Мексике, выявили отсутствие такой взаимосвязи [12]. Широко исследуется роль полиморфных вариантов гена *CYP1A1* в метаболической активации противоопухолевых агентов. Так, Q. Zheng с соавторами было показано, что присутствие аллеля *2С полиморфного маркера *c.1384A>G* гена *CYP1A1* увеличивает скорость гидроксирования аминифлавона [20], который применяется в опытах *in vitro* при комбинированной химиотерапии рака яичника, молочной железы и почки [9].

Проведено исследование двух полиморфных локусов *g.32035C>A* и *g.29731delT* гена *CYP1A2*. Данные по распределению частот генотипов и аллелей представлены в табл. 1.

Сравнительный анализ выявил статистически достоверные различия между группой больных РМП и здоровыми индивидами в распределении частот генотипов ($\chi^2=6,19$, $df=2$, $p=0,05$), но не аллелей ($\chi^2=2,78$, $df=1$, $p=0,1$) локуса *g.32035C>A* гена *CYP1A2*.

Было показано, что генотип AA локуса *g.32035C>A* гена *CYP1A2* является маркером устойчивости к развитию РМП. (OR=0,63, 95%CI 0,43—0,93). Данная ассоциация сохранялась при введении поправок на этническое происхождение, пол, статус курения (табл. 1).

При сравнении общей выборки больных мышечно-инвазивной и мышечно-неинвазивной формами РМП статистически достоверных различий в распределении частот генотипов ($\chi^2=0,33$, $df=2$, $p=0,85$) и аллелей ($\chi^2=0,23$, $df=1$, $p=0,63$) не обнаружено.

При сравнении больных РМП и здоровых мужчин обнаружены статистически значимые различия в распределении частот генотипов ($\chi^2=8,81$, $df=2$, $p=0,01$) и аллелей ($\chi^2=6,11$, $df=1$, $p=0,01$) полиморфного локуса *g.32035C>A* гена *CYP1A2*. Отмечалась тенденция к повышению частоты генотипов СА и СС в группе здоровых мужчин по сравнению с группой больных раком, $p=0,08$, однако статистической значимости данный результат не достиг. Среди здоровых и больных женщин

Таблица 1

Распределение частот генотипов и аллелей изученных полиморфных локусов цитохрома P450 1A1 и 1A2 в выборках больных раком мочевого пузыря и здоровых индивидов

Генотипы/аллели/модели	Рак мочевого пузыря, N (%)	Здоровые индивиды, N (%)	OR, 95% CI, p
CYP1A1 c.1384A>G			
AA	179 (63,48)	179 (84,83)	
AG	95 (33,69)	32 (15,17)	
GG	8 (2,84)	0	
A	453 (80,32)	390 (92,42)	
G	111 (19,68)	32 (7,58)	
Аддитивная модель			3,18 (2,07—4,90) <0,0001
С учётом этнического происхождения			3,16 (2,05—4,89) <0,0001
С учётом гендерных различий			3,40 (2,18—5,31) <0,0001
С учётом статуса курения			4,35 (2,66—7,11) <0,0001
CYP1A2 g.32035C>A			
CC	113 (39,65)	62 (29,38)	
CA	112 (39,30)	103 (48,82)	
AA	60 (21,05)	46 (21,80)	
C	338 (59,30)	227 (53,79)	
A	232 (40,70)	195 (46,21)	
Доминантная модель			
AA	113 (39,65)	62 (29,38)	
CA-CC	172 (60,35)	149 (70,62)	0,63 (0,43—0,93) 0,018
С учётом этнического происхождения			0,63 (0,43—0,92) 0,016
С учётом гендерных различий			0,62 (0,42—0,91) 0,014
С учётом статуса курения			0,61 (0,41—0,91) 0,014
CYP1A2 g.29731delT			
TT	128 (46,04)	158 (75,24)	
Tdel T	113 (40,65)	45 (21,43)	
delTdel T	37 (13,31)	7 (3,33)	
T	369 (66,31)	361 (85,95)	
del T	187 (33,63)	59 (14,05)	
Аддитивная модель			2,83 (2,04—3,92) <0,0001
С учётом этнического происхождения			2,82 (2,04—3,91) <0,0001
С учётом гендерных различий			2,83 (2,04—3,92) <0,0001
С учётом статуса курения			2,81 (2,02—3,92) <0,0001

статистически значимых различий по данному локусу обнаружено не было ($\chi^2=2,43$, $df=2$, $p=0,30$).

Анализ выявил статистически значимые различия в распределении частот генотипов ($\chi^2=44,25$, $df=2$, $p=0,0001$) и аллелей ($\chi^2=47,65$, $df=1$, $p=0,0001$) полиморфного локуса *g.29731delT* гена *CYP1A2* между общей выборкой больных РМП и здоровыми индивидами. Так, гомозиготный генотип *TT* в группе здоровых индивидов встречался достоверно чаще, чем в группе больных опухолью мочевого пузыря. Было показано, что с увеличением дозы полиморфного аллеля *delT* возрастает и риск развития РМП (OR=2,83, 95%CI 2,04–3,92). Полученная ассоциация сохранялась при анализе с учётом этнического происхождения, пола и статуса курения (табл. 1). Однако при отдельном сравнении мужчин и женщин достоверных ассоциаций получено не было ($p=0,13$).

Анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса *g.29731delT* гена *CYP1A2* с учётом клинического течения заболевания статистически значимых различий между выборками больных мышечно-инвазивной и мышечно-неинвазивной формами РМП не выявил.

При анализе литературных данных, посвящённых изучению полиморфных маркёров гена *CYP1A2*, в работах D. Li с соавторами обнаружена ассоциация аллеля *delT* гена *CYP1A2* с развитием рака поджелудочной железы у женщин-курильщиц [10]. S. Pavanello с соавтора-

ми в 2005, 2010 гг. показали, что присутствие у курильщиков хотя бы одного аллеля *delT* гена *CYP1A2* увеличивает активность фермента *CYP1A2*, вероятно, это связано с полиморфизмами, локализованными в промоторе гена *CYP1A2*, которые могут модифицировать сайт связывания гетеродимера Ah-рецептора с транслокатором (комплекс AhR/ARNT), расположенный между участками -2495 и -2000 промотора [15, 16]. Это, возможно, приводит к увеличению индукции *CYP1A2* компонентами табачного дыма и накоплению промежуточных высокотоксичных соединений. Не исключено, что аналогично индуцируется развитие РМП при воздействии факторов окружающей и производственной среды.

Были изучены частоты распределения генотипов и аллелей маркёров с.1661G>A гена *AhR*, с.565C>G гена *AHRR* и с.522G>C гена *ARNT*. При сравнении выборок больных РМП и здоровых индивидов значимых ассоциаций для маркёров генов *AhR* и *AHRR* обнаружено не было (табл. 2). Однако при анализе ассоциаций с тяжестью течения заболевания было обнаружено, что с повышением дозы аллеля G гена *AHRR*, повышается и его протективный эффект (OR=0,61, $p=0,016$). Из литературных источников до недавнего времени было известно, что замена нуклеотидов в данном положении приводит к аминокислотной замене в PAS-домене репрессора, т.е. в домене, который ответственен за взаимодействие с комплексом арил-гидрокарбонowego рецептора и его ядерного транслокатора. Однако исследования S.I. Кар-

Таблица 2

Распределение частот генотипов и аллелей изученных полиморфных локусов арилгидрокарбонowego рецептора, репрессора и транслокатора арилгидрокарбонowego рецептора в выборках больных раком мочевого пузыря и здоровых индивидов

Генотипы и аллели	Больные раком мочевого пузыря, N (%)			Здоровые индивиды, N (%)		
	Мужчины	Женщины	Всего	Мужчины	Женщины	Всего
AhR с.1661G>A						
G/G	141 (78,33)	23 (67,65)	164 (76,64)	124 (78,48)	22 (62,86)	146 (75,65)
G/A	37 (20,56)	11 (32,35)	48 (22,43)	34 (21,52)	13 (37,14)	47 (24,35)
A/A	2 (1,11)		2 (0,93)			
G	319 (88,61)	57 (83,82)	376 (87,85)	282 (89,24)	57 (81,43)	339 (87,82)
A	41 (11,39)	11 (16,18)	52 (12,15)	34 (10,76)	13 (18,57)	47 (12,18)
AHRR с.565C>G						
C/C	77 (41,85)	9 (25,00)	86 (39,09)	65 (36,93)	15 (37,50)	80 (37,04)
C/G	81 (44,02)	19 (52,78)	100 (45,45)	87 (49,43)	19 (47,50)	106 (49,07)
G/G	26 (14,13)	8 (22,22)	34 (15,45)	24 (13,64)	6 (15,00)	30 (13,89)
C	235 (63,86)	37 (51,39)	272 (61,82)	217 (61,65)	49 (61,25)	266 (61,57)
G	133 (36,14)	35 (48,61)	168 (38,18)	135 (38,35)	31 (38,75)	166 (38,43)
ARNT с.522G>C						
G/G	78 (46,71)	22 (61,11)	100 (49,26)	72 (42,35)	17 (40,48)	89 (41,98)
G/C	52 (31,14)	9 (25,00)	61 (30,05)	72 (42,35)	20 (47,62)	92 (43,40)
CC	37 (22,16)	5 (13,89)	42 (20,69)	26 (15,29)	5 (11,90)	31 (14,62)
G	208 (62,28)	53 (73,61)	261 (64,29)	216 (63,53)	54 (64,29)	270 (63,68)
C	126 (37,72)	19 (26,39)	145 (35,71)	124 (36,47)	30 (35,71)	154 (36,32)

снгер с соавторами показали, что белки AHRR-Pro¹⁸⁵ и AHRR-Ala¹⁸⁵ обладают одинаковой способностью репрессировать AHR [8]. Можно предположить, что данный локус находится в неравновесном сцеплении с маркером, находящимся в регионе (короткое плечо хромосомы 5), потеря которого часто происходит при различных злокачественных новообразованиях, в частности и при РМП.

Анализ полиморфного локуса с.522G>C гена *ARNT* показал статистически достоверные различия в распределении частот генотипов ($\chi^2=8,39$, $p=0,02$), но не аллелей ($\chi^2=0,01$, $p=0,91$) между группами больных РМП и практически здоровыми индивидами. Так, было показано, что гетерозиготный генотип является фактором устойчивости к развитию заболевания (OR=0,56, 95%CI (0,38—0,85), $p=0,005$). Ассоциация сохранилась и при отдельном анализе мужчин (OR=0,62, 95%CI(0,38—0,99), $p=0,04$, $\chi^2=4,09$). У женщин отмечена сходная тенденция ($p=0,07$, $\chi^2=3,33$). Анализ внутри выборки больных РМП значимых различий не выявил.

Таким образом, в результате проведённого анализа, установлены маркеры риска развития РМП: аллель G маркера 2454 A>G гена *CYP1A1* (OR=2,94), аллель delT маркера T-2467delT гена *CYP1A2* (OR=2,83).

Список литературы

1. Фигурин К.М., Камолов Б.Ш. Рак мочевого пузыря: диагностика и лечение // Вместе против рака. — 2004. — №4.
2. BIOSTATISTICA, Primer of biostatistics version 4.03 by Stanton A. Glanz, McGraw Hill перевод на русский язык программа BIOSTAT. (для IBM PC). — Практика, 1998.
3. Brennan P., Bogillot O., Cordier S., Greiser E., Schill W., Vineis P., Lopez-Abente G., Tzonou A., Chang-Claude J., Bolm-Audorff U., Jockel K.H., Donato F., Serra C., Wahrendorf J., Hours M., T'Mannetje A., Kogevinas M., Boffetta P. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies // Int. J. Cancer. — 2000. — Vol. 86, №2. — P. 289—294.
4. Fontana L., Delort L., Joumard L., Rabiau N., Bosviel R., Satih S., Guy L., Boiteux J.P., Bignon Y.J., Chamoux A., Bernard-Gallon. Genetic polymorphisms in *CYP1A1*, *CYP1B1*, *COMT*, *GSTP1* and *NAT2* Genes and Association with Bladder Cancer Risk in a French Cohort // Anticancer Res. — 2009. — Vol. 29, №5. — P. 1631—1635.
5. Grando J.P., Kuasne H., Losi-Guembarovski R., Sant'ana Rodrigues I., Matsuda H.M., Fuganti P.E., Gregorio E.P., Junior F.L., de Menezes R.P., de Freitas Rodrigues M.A., de Syllos Colus I.M. Association between polymorphisms in the biometabolism genes *CYP1A1*, *GSTMI*, *GSTTI* and *GSTPI* in bladder cancer // Clin. Exp. Med. — 2009. — Mar. — Vol. 9, №1. — P. 21—28.
6. <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>.
7. John T. Leppert, Oleg Shvarts, Kelly Kawaoka, Ron Lieberman, Arie S. Belldegrun, Allan J. Pantuck. Профилактика рака мочевого пузыря: обзор // European Urology. — 2006. — Vol. 49. — P. 226—234.
8. Karchner S.I., Jenny M.J., Tarrant A.M., Evans B.R., Kang H.J., Bae I., Sherr D.H., Hahn M.E. The active form of human aryl hydrocarbon receptor (AHR) repressor lacks exon 8, and its Pro 185 and Ala 185 variants repress both AHR and hypoxia-inducible factor // Mol. Cell. Biol. — 2009. — Vol. 29, №13. — P. 3465—3477.
9. Kuffel M.J., Schroeder J.C., Pobst L.J., Naylor S., Reid J.M., Kaufmann S.H., Ames M.M. Activation of the Antitumor Agent Aminoflavone (NSC 686288) Is Mediated by Induction of Tumor Cell Cytochrome P450 *I1A1/I1A2* // Mol. Pharmacol. — 2002. — Vol. 62. — P. 143—153.
10. Li D., Jiao Li., LiY., Doll M.A., Hein D.W., Bondy M.L., Evans D.B., Wolff R.A., Lenzi R., Pisters P.W., Abbruzzese J.L., Hassan M.M. Polymorphisms of cytochrome P450 and N-acetyltransferase genes, smoking, and risk of pancreatic cancer // Carcinogenesis. — 2006. — Vol. 27, №1. — P. 103—111.
11. Merisalu A., Punab M., Altmae S., Haller K., Tiido T., Peters M., Salumets A. The contribution of genetic variations of aryl hydrocarbon receptor pathway genes to male factor infertility // Fertil. Steril. — 2007. — Vol. 88, №4. — P. 854—859.
12. Moreno-Galvan M., Herrera-Gonzalez N.E., Robles-Perez V., Velasco-Rodriguez J.C., Tapia-Conyer R., Sarti E. Impact of *CYP1A1* and *COMT* genotypes on breast cancer risk in Mexican women: a pilot study // Int. J. Biol. Markers. — 2010. — Vol. 25, №3. — P. 157—163.
13. Oyama T., Mitsudomi T., Kawamoto T. et al. Detection of *CYP1A1* Polymorphism Using Designed RFLP and Distributions of *CYP1A1* Genotypes in Japanese // Int. Arch. Occup. Environ. Health. — 1995. — Vol. 67. — P. 253—256.
14. Pande M., Amos C.I., Osterwisch D.R., Chen J., Lynch P.M., Broaddus R., Frazier M.L. Genetic variation in genes for the xenobiotic-metabolizing enzymes *CYP1A1*, *EPHX1*, *GSTMI*, *GSTTI*, and *GSTPI* and susceptibility to colorectal cancer in Lynch syndrome // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. — 2008. — Sep. — Vol. 17, №9. — P. 2393—2401.
15. Pavanello S., Pulliero A., Lupi S., Gregorio P., Clonfero E. Influence of the genetic polymorphism in the 5'-noncoding region of the *CYP1A2* gene on *CYP1A2* phenotype and urinary mutagenicity in smokers // Mutation Research. — 2005. — Vol. 587. — P. 59—66.
16. Pavanello S., Mastrangelo G., Placidi D., Compagna M., Pulliero A., Garta A., Arici C., Porru S. *CYP1A2* polymorphisms, occupation and environmental exposures and risk bladder cancer // Eur. J. Epidemiol. — 2010. — Vol. 25. — P. 491—500.
17. Sachse C., Bhabra U., Smith G., Lightfoot T.J., Barrett J.H., Scollay J., Garner R.C., Boobis A.R., Wolf C.R., Gooderham N.J. Polymorphisms in the cytochrome P450 *CYP1A2* gene (*CYP1A2*) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism // Br. J. Clin. Pharmacol. — 2003. — Vol. 55, №1. — P. 68—76.
18. Stenzl A., Cowan N.C., De Santis M., Jakse G., Kuczyk M.A., Merseburger A.S., Ribal M.J., Sherif A., Witjes J.A. Update of the Clinical Guidelines of the European Association of Urology on muscle-invasive and metastatic bladder carcinoma // Actas Urol Esp. — 2010. — Vol. 34, №1. — P. 51—62.
19. Surekha D., Sailaja K., Nageswara Rao D., Padma T., Raghunadharao D., Vishnupriya S. Association of *CYP1A1**2 Polymorphisms with breast cancer risk: A case control study // Indian J. Med. Sci. — 2009. — Vol. 63, №1. — P. 13—20.
20. Zheng Q., Sha X., Liu J., Heath E.I., Lorusso P. Association of human cytochrome P450 *I1A1* (*CYP1A1*) and sulfotransferase *I1A1* (*SULT1A1*) polymorphisms with differential metabolism and cytotoxicity of aminoflavone // Mol. Cancer Ther. — 2010. — Vol. 9, №10. — P. 2803—2813.

**Bladder cancer markers searching based
on the *Ahr-CYP* system gene polymorphisms trial**

**Akhmadishina L.Z.¹, Korytina G.F.¹, Kochetova O.V.¹, Urmantsev M.F.²,
Izmailov A.A.², Izmailova S.M.², Pavlov V.N.², Viktorova T.V.^{1,2}**

¹ – Institute of Biochemistry and Genetics,

450054, Ufa, Pr. Oktyabrya 71; tel. (fax): (347)2356088; e-mail: l.akhmadishina@gmail.com

² – Bashkir State Medical University,

450000, Ufa, Lenina st. 3, tel.: (347) 272-11-60; e-mail: ecolab_203@mail.ru

In order to estimate the *CYP1A1*, *CYP1A2*, *AHR*, *AHRR*, *ARNT* polymorphism contribution in the bladder cancer development and severity, 289 case and 216 control samples DNA were genotyped. It was shown *CYP1A1***G* allele (OR=2,94), *CYP1A2***delT* allele (OR=2,83) were associated with the risk of bladder cancer.

Key words: bladder cancer, gene polymorphism, cytochrome *P450 1A1* and *1A2*, aryl hydrocarbon receptor system

Роль генетической вариабельности локуса *ACVR2A* в формировании подверженности преэклампсии*

Ворожищева А.Ю.¹, Трифонова Е.А.², Бутко Ю.К.², Сереброва В.Н.²,
Максимова Н.Р.³, Павлова К.К.³, Габидулина Т.В.⁴, Степанов В.А.²

¹ — МЛПУ «Городская клиническая больница №1», 654057, г.Новокузнецк

² — ФГБУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» СО РАМН, 634050, г.Томск, ул. Набережная р.Ушайки, д. 10, факс: 8(3822)513744, e-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru

³ — Якутский научный центр комплексных медицинских проблем СО РАМН, Якутск

⁴ — ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г.Томск

Преэклампсия (ПЭ), обуславливающая значительный уровень материнской и перинатальной заболеваемости и смертности, является одним из наиболее тяжёлых гестационных осложнений, в реализации которого участвует множество генетических и средовых факторов. Используя метод позиционного клонирования в комбинации с биоинформационными подходами и анализом экспрессионных профилей генов, зарубежные исследователи в качестве высокоприоритетного позиционного кандидата ПЭ обозначили локус 2q22, включающий область гена рецептора активина 2-го типа — *ACVR2A*. В представленной работе проведён анализ роли наследственной вариабельности гена *ACVR2A* в формировании предрасположенности к ПЭ в различных этнических группах России. Установлена ассоциация полиморфизма rs17742342 гена *ACVR2A* с развитием тяжёлой формы ПЭ у русских, выявлены два рискованных гаплотипа. Показана популяционная специфичность в структуре неравновесия по сцеплению и распределении гаплотипов гена *ACVR2A*.

Ключевые слова: преэклампсия, однонуклеотидный полиморфный вариант, ген *ACVR2A*, гаплотип

Введение

Одним из наиболее тяжёлых осложнений беременности, определяющих в значительной мере уровень материнской и перинатальной заболеваемости и смертности, остаётся ПЭ. Несмотря на существенные достижения отечественной и зарубежной медицины в комплексной терапии этого заболевания, его частота не имеет тенденции к снижению и варьирует, по данным ряда авторов, от 7 до 22% [1, 19]. К настоящему времени выдвинуто множество теорий этиопатогенеза ПЭ, однако ни одна из предложенных гипотез полностью не объясняет механизм развития данной патологии и не определяет значимые факторы, предрасполагающие к её развитию, а многие авторы рассматривают это гестационное осложнение как многофакторное заболевание (МФЗ) [1, 3].

Данные, полученные при проведении ряда независимых исследований генетической архитектуры ПЭ в пяти популяциях (Исландии, Австралии/Новой Зеландии, Норвегии, Финляндии и Дании) на семейном материале методом полногеномного анализа сцепления родословных (Genom-wide linkage studies), свидетельствуют о существовании нескольких локусов, обеспечивающих предрасположенность к преэклампсии и расположенных на различных хромосомах [7, 15, 17]. Однако необходимо отметить, что в трёх из обследованных популяций была картирована ассоциация ПЭ с близлежащими участками второй хромосомы (Исландия: 2p13 и 2q23;

Австралия/Новая Зеландия: 2p11-12 и 2q22; Финляндия: 2p25). Используя метод позиционного клонирования в комбинации с биоинформационными подходами и анализом экспрессионных профилей генов, австралийская группа исследователей в качестве высокоприоритетного позиционного кандидата ПЭ выделила локус 2q22, который включает область гена рецептора активина 2-го типа — *ACVR2A*, лигандом которого является член суперсемейства сигнальных белков трансформирующего фактора роста β -активин А [7, 8]. Показано, что данный протеин вовлечён в такие процессы, как регуляция апоптоза, инвазия трофобласта и ремоделирование спиральных артерий, являющиеся ключевыми в патогенезе ПЭ [9, 10, 11]. Кроме того, в нескольких зарубежных исследованиях была установлена связь развития преэклампсии с повышением уровня активина А в сыворотке крови на ранних сроках гестации [12, 13].

Целью настоящей работы была оценка роли наследственной вариабельности гена *ACVR2A* в формировании предрасположенности к ПЭ в различных этнических группах России.

Поскольку ПЭ является многофакторным состоянием, то для идентификации новых полиморфных вариантов, предрасполагающих к развитию данного заболевания, активно используется метод анализа генетических ассоциаций. Однако исследования ассоциаций одного или нескольких маркёров кандидатных генов охватывают лишь незначительную долю вариабельности генома

* Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» (Соглашение №8118).

каждого пациента. Одним из решений данной проблемы является использование подхода, базирующегося на концепции «блочной организации» генома человека, постулирующей существование неравновесия по сцеплению среди полиморфных сайтов в геноме. Анализ ассоциаций в рамках данного подхода подразумевает, что даже если SNPs, причинно вовлечённые в процесс болезни, непосредственно не изучаются, то ассоциация может быть детектирована с помощью исследованного «полномочного» полиморфизма (tagSNP), находящегося в тесном сцеплении с ними [14]. В настоящей работе вышеописанный подход был применён для выбора изучаемых полиморфных вариантов гена *ACVR2A*.

Материалы и методы

Было обследовано более 600 женщин из двух этнических выборок (якуты из г.Якутска, N=346 чел., и русские из г.Томска, N=290 чел.), из них 356 пациенток с ПЭ. Группа больных была неоднородной как по степени тяжести ПЭ, так и по наличию ранее предшествовавших и сопутствующих фоновых заболеваний. Контрольная группа была представлена 280 женщинами (160 русских и 130 якутских женщин) с физиологически протекавшими беременностью и родами, а также отсутствием неблагоприятного акушерского анамнеза. По показателю среднего возраста все исследуемые группы были сопоставимы. Обследованные индивиды относятся к европеоидной (русские) и монголоидной (якуты) расам.

Исследованы четыре tagSNPs, расположенные в интронах гена *ACVR2A*: rs1014064, rs17742342, rs1049725, rs2161984 (табл. 1). Для выбора этих полиморфных вариантов был использован алгоритм Aggressive tagging программного обеспечения Haploview 4.2, основанный на выявлении tagSNPs в 2- и 3-маркёрных гаплотипах, в пределах которых все входящие полиморфные варианты должны находиться в состоянии сильного сцепления ($LOD > 3$) между собой [8]. Данный анализ был проведён на массиве данных по популяциям европеоидов (CEU), японцев (JPT) и китайцев (CHB), полученных в ходе реализации II фазы международного проекта «HapMap». Предсказательная способность данного набора tagSNPs относительно всего массива исследованных полиморфизмов гена *ACVR2A* составляла 100%.

Генотипирование изученных полиморфных вариантов проводилось методом ПЦР в режиме реального вре-

мени, воспроизводимым с помощью линейных разрушаемых проб TaqMan Genotyping Assay (Applied Biosystems). Статистическая обработка результатов исследования проводилась посредством пакетов статистических программ Statistica 7.0 и Haploview 4.2.

Результаты

Анализ распределения частот генотипов и аллелей в изученных выборках

В табл. 2 представлены распределение частот аллелей и генотипов исследованных полиморфных вариантов, соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди—Вайнберга и уровень значимости, полученный при сравнении групп больных с контрольными выборками.

Как видно, распределение частот генотипов во всех контрольных выборках соответствовало равновесию Харди—Вайнберга, а частоты аллелей и генотипов находились в диапазоне мировых.

Полученные данные не выявили в якутской и русской выборках ассоциации с ПЭ ни одного из изученных tagSNPs гена *ACVR2A*, однако при анализе отдельных клинических форм данной патологии были получены статистически значимые различия для маркёра rs17742342 в этнической выборке русских (рис. 1): в группе пациенток с ПЭ тяжёлой степени отмечалось значимое повышение частоты генотипа AC по сравнению с этим показателем в контрольной выборке ($p=0,01$; OR=1,96; CI: 1,11—3,47).

Анализ различий частот генотипов и аллелей между исследованными этническими группами показал статистически значимые различия по двум генетическим маркёрам — rs17742342 и rs10497025. При сравнении как больных из популяционных выборок русских и якутов, так и женщин с физиологическим течением беременности у русских была выявлена более высокая частота гетерозигот (уровень значимости для критерия Фишера при попарном сравнении больных составил $6,7 \cdot 10^{-10}$, контрольных выборок — 0,002 для rs17742342 и $p=2,62 \cdot 10^{-13}$ и $p=1,85 \cdot 10^{-7}$ для rs10497025 соответственно). Интересным представляется, что именно эти генетические маркёры показали ассоциацию с тяжёлой формой ПЭ в настоящей работе (rs17742342) и исследовании зарубежных учёных (rs10497025) [10].

Характеристика исследуемых полиморфных вариантов

Таблица 1

№	Полиморфный вариант	Локализация на хромосоме	Локализация в гене	Аллели	Предковый аллель
1	rs1014064	148612154	Интрон 1	A/G	A
2	rs17742342	148633936	Интрон 1	A/C	A
3	rs2161984	148648486	Интрон 1	A/G	G
4	rs10497025	148662202	Интрон 4	C/G	C

*Распределение частот гаплотипов
и структура неравновесия по сцеплению гена ACVR2A
в исследованных группах*

Нами был проведён также анализ совместного наследования аллелей в гаплотипах и неравновесия по сцеплению (LD) в изученных выборках. В популяции русских было обнаружено 4 гаплотипа гена *ACVR2A*, встречающихся с частотой более 1%, в изученных выборках якутов — 5 гаплотипов (рис. 2).

Частота гаплотипа AAGC статистически значимо была выше в группе женщин с ПЭ из якутской популяции ($\chi^2=12,77$; $p=0,0003$), в то время как частота гаплотипов GAAG и ACGC преобладала у русских (для гаплотипа GAAG $\chi^2=66,36$, $p<10^{-5}$; $\chi^2=28,91$, $p<10^{-5}$; при сравнении между собой больных и женщин с физиологической беременностью из различных этнических групп соответственно; для гаплотипа ACGC $\chi^2=46,11$, $p<10^{-5}$; $\chi^2=14,35$, $p=0,0001$ соответственно).

Сравнение частот гаплотипов у пациенток с ПЭ и в контрольной группе в разных этнических выборках показало статистические различия только у русских, где выявлена ассоциация с развитием тяжёлой формы ПЭ гаплотипа GCAG, включающего только производные аллели (уровень значимости для критерия Фишера $p=0,008$; OR 8,54; CI:0,98—73,72), и гаплотипа ACGC ($\chi^2=5,08$; $p=0,024$, OR1,87; CI:1,08—3,25). По остальным гаплотипам статистически значимых различий не обнаружено.

Анализ гаплотипической архитектуры гена *ACVR2A* в исследованных группах продемонстрировал как межэтнические, так и внутриспопуляционные различия в структуре LD (рис. 3). Так, сильное сцепление всех изученных маркёров наблюдалось в контрольной выборке и группе пациенток с ПЭ у русских, в то время как у якутов тесное сцепление было выявлено только между тремя первыми полиморфными вариантами (1 — rs1014064, 2 — rs17742342, 3 — rs2161984).

Таблица 2

Распределение частот генотипов и аллелей исследованных полиморфных вариантов гена ACVR2A в изученных популяциях

Исследуемые полиморфизмы			Исследуемые популяции					
			Якуты			Русские		
			Пациентки с ПЭ, N=216	Контрольная группа, N=130	p^*	Пациентки с ПЭ, N=140	Контрольная группа, N=150	p^*
rs1014064	Частоты генотипов, %	AA	39	36	0,63	38	45	0,40
		AG	49	49		45	42	
		GG	12	15		17	13	
	Частота аллеля, %	G	36	39	0,39	40	34	0,16
p^{**}			0,53	0,84		0,63	0,99	
rs17742342	Частоты генотипов, %	AA	92	89	0,66	66	75	0,10
		AC	8	11		33	25	
		CC	0	0		1	0	
	Частота аллеля, %	C	4	5	0,37	18	13	0,16
p^{**}			0,53	0,86		0,19	0,48	
rs2161984	Частоты генотипов, %	AA	12	14	0,57	15	13	0,64
		AG	47	49		44	42	
		GG	42	37		41	45	
	Частота аллеля, %	A	35	61	0,29	37	34	0,33
p^{**}			0,83	0,79		0,62	0,61	
rs10497025	Частоты генотипов, %	CC	86	85	0,52	51	57	0,51
		CG	12	14		39	36	
		GG	2	1		10	7	
	Частота аллеля, %	G	8	7	0,84	29	25	0,23
p^{**}			0,06	0,88		0,58	0,72	

Примечание. N — количество индивидов в группе; * — уровень значимости p для критерия χ^2 с поправкой Йейтса или критерия Фишера получены при сравнении частот аллелей или генотипов контрольной группы и группы больных ПЭ; ** — уровень значимости p , полученный при анализе на соответствие распределению Харди–Вайнберга

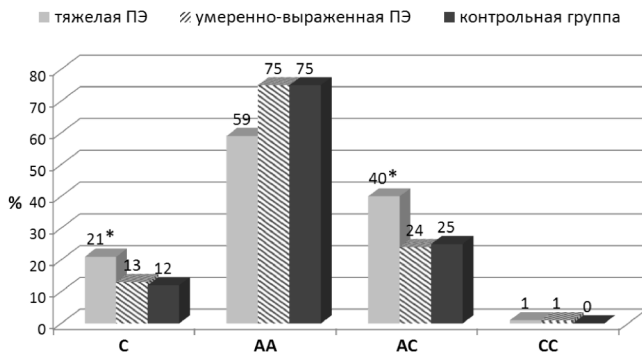


Рис. 1. Распределение частот аллеля C и генотипов полиморфного варианта rs17742342 в исследованных группах:
* — статистически значимые отличия при сравнении с контрольной группой

Кроме того, у русских были показаны существенные различия в структуре LD между женщинами с физиологической беременностью и пациентками с тяжёлой ПЭ: в то время как в контрольной группе все исследованные маркёры формируют единый блок сцепления, в группе пациенток с тяжёлой ПЭ наблюдается участок рекомбинации в области локализации rs17742342, ассоциированного, согласно полученным данным, с развитием тяжёлой формы ПЭ.

Обсуждение результатов

В последнее время роль генетической вариабельности локуса *ACVR2A* в развитии ПЭ была предметом ряда исследований. Проведённый анализ неравновесной передачи аллелей в 34 австралийских и новозеландских семьях выявил ассоциацию между развитием ПЭ и полиморфным вариантом rs1424954, расположенным на расстоянии около 1800 п.н. выше сайта инициации транскрипции гена *ACVR2A* [16]. Последующий анализ 45 SNPs этого гена у 480 индивидуумов из 74 семей идентичного происхождения показал связь с развитием ПЭ маркёров rs10497025 ($p=0,025$), rs13430086 ($p=0,010$), LF004, LF013 и LF020, однако после введения поправки на множественные сравнения не было получено статистически значимой ассоциации ни с одним из изученных полиморфизмов [10]. L.T. Roten с соавторами провели исследование более 70 SNPs, расположенных в локусе 2q22-23 в большой когорте норвежских женщин (1139 пациенток с ПЭ и 2269 женщин из контрольной группы). В работе не было показано ассоциации с ПЭ полиморфного варианта rs1424954, однако была обнаружена связь с развитием данной патологии других маркёров гена *ACVR2A* — rs1424941, rs1014064, rs2161983 и rs3768687 [17]. Необходимо отметить, что данный участок генома ранее был картирован позиционно-кандидатным способом в качестве локуса предрасположенности к ПЭ в норвежской популяции. Не было получено подтверждений результатов исследования E.K. Moses

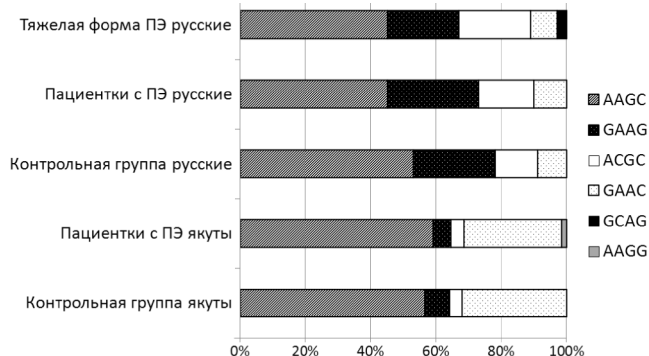


Рис. 2. Распределение частот гаплотипов гена *ACVR2A* в исследованных группах:
порядок аллель полиморфных вариантов в гаплотипе (слева направо): rs1014064, rs1774234, rs2161984 и rs1049725

с соавторами по ассоциации rs1424954 с ПЭ и в финской популяции [14]. Настоящая работа также не выявила в якутской и русской популяциях ассоциации с ПЭ ни одного из изученных SNPs, тем не менее, была показана связь аллеля C и генотипа AC маркёра rs17742342, расположенного вблизи промоторной области гена *ACVR2A*, с развитием тяжёлой формы ПЭ у русских.

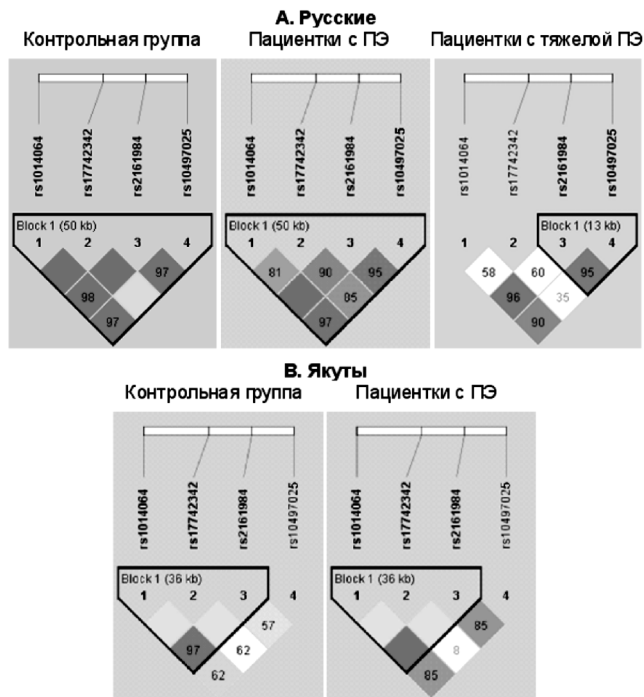


Рис. 3. Структура неравновесия по сцеплению в гене *ACVR2A* в исследованных группах. Цветовая гамма в ячейках отображает силу сцепления между SNPs: тёмно-серый — сильное сцепление ($D'=1$, $LOD>2$); серый и светло-серый — значительное сцепление ($D'<1$, $LOD>2$); белый — слабое сцепление ($D'<1$, $LOD<2$). Порядок SNPs слева направо: 1 — rs1014064; 2 — rs17742342; 3 — rs2161984; 4 — rs10497025

Результаты проведённого нами анализа ассоциации гаплотипов также свидетельствуют о роли гена *ACVR2A* в формировании предрасположенности к тяжёлой форме ПЭ у русских. Поскольку оба рискованных гаплотипа — GCAG и ACGC, — ассоциированных с тяжёлой ПЭ, отличаются по аллелям всех входящих в них SNPs, за исключением аллеля C, принадлежащего rs17742342, а ранее зарубежными исследователями была показана связь с развитием ПЭ маркёров rs1424954, rs1364658, rs1014064, rs1895694 (рис. 4), локализованных вблизи или непосредственно в 5'-нетранслируемой области этого гена, то можно предположить, что аллельный вариант rs17742342 сцеплен с функциональным полиморфизмом промоторной области гена *ACVR2A*, участвующим в регуляции его транскрипции и не исследованном в настоящей работе. Кроме того, интересным представляется факт существования значительных различий в распределении паттернов LD гена *ACVR2A* в якутской и русской этнических выборках, а также группах из русской популяции, дифференцирующихся по наличию/отсутствию гестационных осложнений. Необходимо отметить, что в предыдущих наших исследованиях также были получены результаты, демонстрирующие популяционную специфичность структуры неравновесия по сцеплению ряда генов-кандидатов МФЗ [4, 5].

Несмотря на успехи, полученные при проведении полногеномного анализа сцепления в ряде популяций, и картирования участка второй хромосомы 2q22, включающего ген *ACVR2A*, как кандидатного локуса ПЭ, последующие ассоциативные исследования не выявили причинный SNP в этом гене. Результаты вышеописанных работ, посвящённых данной проблеме, свидетельствуют о возможной популяционной специфичности в структуре подверженности развитию этого патологического состояния: во всех изученных популяциях были зафиксированы ассоциации различных генетических маркёров с развитием ПЭ.

Кроме того, были обнаружены сходные паттерны неравновесия по сцеплению (LD) в группах пациенток с

ПЭ из австралийской и норвежской популяций, при наблюдаемых различных ассоциированных с ПЭ генетических маркёрах в этих этнических группах [10, 17], что указывает на вовлечённость в генетическую архитектуру ПЭ редких полиморфных вариантов гена *ACVR2A*.

Необходимо отметить, что для распространённых болезней человека предположение об общности происхождения причинного варианта в большой открытой популяции, на котором основано использование неравновесия по сцеплению для картирования генов МФЗ, достаточно спорно. Этнспецифичное происхождение мутаций в геноме подтверждается тем, что для многих генов, участвующих в детерминации болезни, обнаружены различные неблагоприятные мутации, приводящие к нарушению одного и того же метаболического процесса и имеющие одинаковое фенотипическое проявление [2]. Очевидно, что такие мутации впервые возникали у разных людей в различных этнических группах и, таким образом, у каждого из них рядом с причинным функционально значимым аллелем могли находиться разные маркёрные аллели, что служит одной из возможных причин наблюдаемого отсутствия репликации ассоциаций идентичных полиморфных вариантов гена *ACVR2A* с ПЭ в исследованных популяционных выборках.

Наличие популяционной специфичности ассоциации полиморфных маркёров, локализованных вблизи 5'-нетранслируемой области гена *ACVR2A*, с развитием ПЭ свидетельствует о возможной классификации полученных ассоциаций как «синтетических» (термин *синтетические ассоциации* введён S.P. Dickson с соавторами в 2010 г.) [9]. Принимая во внимание свойства таких ассоциаций, участки генома, планируемые для изучения в последующих работах по выявлению структуры генетической подверженности ПЭ в локусе *ACVR2A*, должны распространяться далеко за пределы блока неравновесия по сцеплению, в котором локализованы ассоциированные tagSNPs, а дизайн анализа должен соответствовать возможности выявления редких причинных аллельных вариантов.

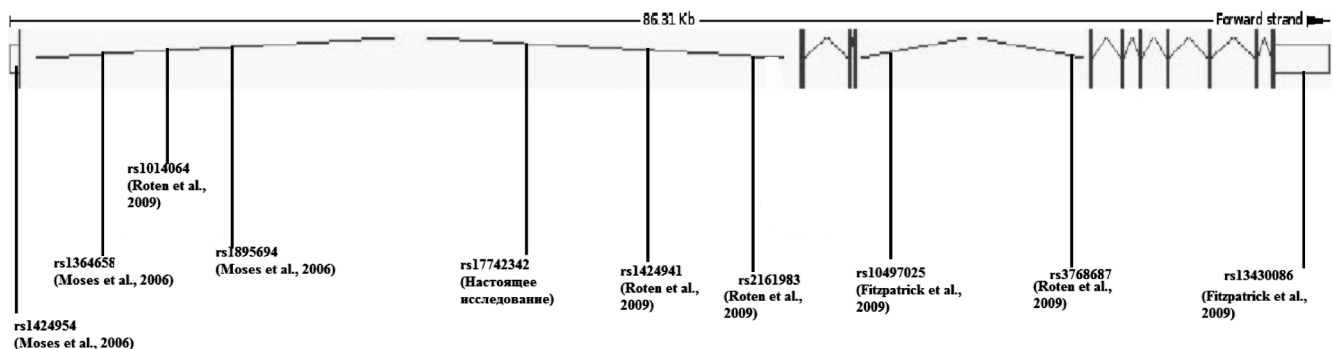


Рис. 4. Локализация в гене *ACVR2A* полиморфных вариантов, ассоциированных с ПЭ, в различных этнических группах

Список литературы

1. Айламазян Э.К., Мозговая Е.В. Гестоз: теория и практика. — М.: МЕДпресс-Информ, 2008. — 272 с.
2. Аульченко Ю.С., Аксенович Т.И. Методологические подходы и стратегии картирования генов, контролирующих комплексные признаки человека // Вестник ВОГиС. — 2006. — №10. — С. 189—202.
3. Картик П. Патогенез поздних гестозов беременных // Международный медицинский журнал. — 2010. — №1. — С. 62—66.
4. Трифонова Е.А., Едачева А.А., Павлова К.К. и др. Ассоциации tagSNPs и гаплотипов гена VEGF с развитием гестоза в популяциях различного этнического происхождения // Медицинская генетика. — 2012. — №1. — С. 28—36.
5. Трифонова Е.А., Еремина Е.Р., Урнов Ф.Д. и др. Генетическое разнообразие и структура неравновесия по сцеплению гена MTHFR в популяциях Северной Евразии // Acta Naturae. — 2012. — Т. 4, №1(12). — С. 79—96.
6. Altshuler D., Daly M.J., Lander E.S. Genetic Mapping in Human Disease // Science. — 2008. — Vol. 322. — P. 881—888.
7. Arngrimsson R., Siguroarottir S., Frigge M.L. et al. A Genome-Wide Scan Reveals a Maternal Susceptibility Locus for Pre-Eclampsia on Chromosome 2p13 // Hum. Mol. Genet. — 1999. — Vol. 8, №9. — P. 1799—1805.
8. Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps // Bioinformatics. — 2005. — №21. — P. 263—265.
9. Dickson S.P., Wang K., Krantz I. et al. Rare variants create synthetic genome-wide associations // PLoS Biol. — 2010. — Vol. 8, №1. — P. e1000294.
10. Fitzpatrick E., Johnson M.P., Dyer T.D. et al. Genetic association of the activin A receptor gene (ACVR2A) and pre-eclampsia // Mol. Hum. Reprod. — 2009. — Vol. 15, №3. — P. 195—204.
11. Florio P., Gabbanini M., Borges L.E. et al. Reviews: activins and related proteins in the establishment of pregnancy // Reprod. Sci. — 2010. — Vol. 17, №4. — P. 320—330.
12. Hoegh A.M., Borup R., Nielsen F.C. et al. Gene Expression Profiling of Placentas Affected by Pre-Eclampsia // J. Biomed. Biotechnol. — 2010. Article ID 787545.
13. Lai J., Pinas A., Syngelaki A. et al. Maternal serum activin-A at 30—33 weeks in the prediction of preeclampsia // J. Matern. Fetal Neonatal Med. — 2013. [Epub ahead of print]
14. Lokki A.I., Klemetti M.M., Heino S. et al. Association of the rs1424954 polymorphism of the ACVR2A gene with the risk of pre-eclampsia is not replicated in a Finnish study population // BMC Res. Notes. — 2011. — Vol. 4. — P. 545.
15. Moses E.K., Lade J.A., Guo G.L. et al. A genome scan in families from Australia and New Zealand confirms the presence of a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia, on chromosome 2 // Am. J. Hum. Genet. — 2000. — Vol. 67, №6. — P. 1581—1585.
16. Moses E.K., Fitzpatrick E., Freed K.A. et al. Objective prioritization of positional candidate genes at a quantitative trait locus for pre-eclampsia on 2q22 // Mol. Hum. Reprod. — 2006. — Vol. 12, №8. — P. 505—512.
17. Roten L.T., Johnson M.P., Forsmo S. et al. Association between the candidate susceptibility gene ACVR2A on chromosome 2q22 and pre-eclampsia in a large Norwegian population-based study (the HUNT study) // Eur. J. Hum. Genet. — 2009. — Vol. 17, №2. — P. 250—257.
18. Schneider-Kolsky M.E., Manuelpillai U., Waldron K. et al. The distribution of activin and activin receptors in gestational tissues across human pregnancy and during labour // Placenta. — 2002. — Vol. 23, №4. — P. 294—302.
19. Srinivas S.K., Morrison A.C., Andrela C.M. et al. Allelic variations in angiogenic pathway genes are associated with preeclampsia // Am. J. Obstet. Gynecol. — 2010. — Vol. 202, №5. — P. 445. e1-11.
20. The GeneCards Human [Electronic resource] // GENECARDS.ORG: GeneCards is a searchable, integrated, database of human genes that provides concise genomic related information, on all known and predicted human genes. — Weizmann Institute of Science. — 1996.
21. Yu L., Li D., Liao Q. et al. High levels of activin A detected in preeclamptic placenta induce trophoblast cell apoptosis by promoting nodal signaling // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2012. — Vol. 97, №8. — P. 1370—1379.

Genetic variability of the *ACVR2A* locus in the structure of hereditary predisposition to complications of pregnancy

Vorozhischeva A.Y.¹, Trifonova E.A.², Butko Y.K.², Serebrova V.N.², Maksimova N.R.³, Pavlova K.K.³, Gabidulina T.V.⁴, Stepanov V.A.²

¹ — The City Clinical Hospital №1, Novokuznetsk

² — Institute for Medical Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk; Fax: (3822)513144

³ — Yakut Scientific Center of Complex Medical Problems, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Yakutsk

⁴ — Siberian State Medical University, Tomsk

Pre-eclampsia (PE) is one of the most severe gestational complications, which is associated with significant maternal and perinatal morbidity and mortality. The suspected aetiology of pre-eclampsia is complex, with susceptibility being attributable to multiple environmental factors and a large genetic component. Using the method of positional cloning in combination with bioinformatics approaches and the analysis of gene expression profiles, foreign researchers have identified 2q22 locus as a high positional PE candidate, which includes the gene region of activin receptor type 2 — *ACVR2A*. In this study, we analyzed the role of genetic variation in the *ACVR2A* gene in predisposition to PE in the different ethnic groups of Russia. We found the association of rs17742342 polymorphism of *ACVR2A* gene with development of severe forms PE in Russians and found two risk haplotypes. Population specificity in the structure of linkage disequilibrium and haplotype distribution of *ACVR2A* gene has been shown.

Key words: pre-eclampsia, single nucleotide polymorphisms, *ACVR2A* gene, haplotype