

Главный редактор
ГИНТЕР Е.К.
академик РАН, д.б.н., профессор
Заместители главного редактора
ПУЗЫРЕВ В.П.
академик РАН, д.м.н., профессор
БАРАНОВ В.С.
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
Ответственный секретарь
ИЖЕВСКАЯ В.Л.
д.м.н.

Редакционная коллегия
АРЧАКОВ А.И.
академик РАН, д.б.н., профессор
ВОЕВОДА М.И.
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
ДУРНЕВ А.Д.
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
ИВАНОВ В.П.
д.б.н., профессор
ИЛЛАРИОШКИН С.Н.
д.м.н., профессор
КОЗЛОВА С.И.
д.м.н., профессор
КОПНИН Б.П.
д.б.н., профессор
КУЦЕВ С.И.
д.м.н.

КУЧИНСКАС В. (Kucinskas V.)
академик Литовской АН, д.б.н., профессор
ЛИМБОРСКАЯ С.А.
д.б.н., профессор
МАЦЕК М. (Macek M. Jr.)
доктор медицины и педиатрии (MD),
доктор философии по медицине
и молекулярной генетике (PhD), профессор

МИХАЙЛОВА Л.К.
д.м.н., профессор

НАЗАРЕНКО Л.П.
д.м.н., профессор

НОВИКОВ П.В.
д.м.н., профессор

НОСИКОВ В.В.
д.б.н., профессор

РОГАЕВ Е.И.
д.б.н., профессор

РУБЦОВ Н.Б.
д.б.н., профессор

СВЕРДЛОВ Е.Д.
академик РАН, д.б.н., профессор

СЕРЕДЕНИН С.Б.
академик РАН, д.м.н., профессор

СМИРНОВ В.Н.
академик РАН, д.м.н., профессор

СТЕПАНОВ В.А.
д.б.н., профессор

ХУСНУТДИНОВА Э.К.
д.б.н., профессор

ЧЕХОНИН В.П.
академик РАН, д.б.н., профессор

ЧУЧАЛИН А.Г.
академик РАН, д.м.н., профессор

Издатель: Иришкин Дмитрий
E-mail: genius-media@mail.ru

Адреса редакции:

115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1,

Федеральное государственное

бюджетное учреждение

Медико-генетический научный центр РАМН

Тел. (499) 612-81-07, факс: 324-07-02

E-mail: L_Tarlycheva@med-gen.ru

Внимание авторов и читателей:

Рукописи и иллюстрации не возвращаются.

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

© Российское общество медицинских генетиков

© Российская академия медицинских наук

© ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич

Тираж 200 экз.

Медицинская ГЕНЕТИКА

Ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал

2018 г. Том 17. №1 (187)

СОДЕРЖАНИЕ

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

Васильев С.А., Лебедев И.Н.

Цитогенетические и экспрессионные маркеры индивидуальной радиочувствительности человека3

*Голубенко М.В., Салахов Р.Р., Шумакова Т.В., Буйкин С.В.,
Макеева О.А., Назаренко М.С., Пузырев В.П.*

Полиморфизм митохондриальной ДНК и заболевания сердечно-сосудистого континуума9

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Бочарова А.В., Марусин А.В., Макеева О.А., Жукова И.А.,
Жукова Н.Г., Алифирова В.М., Степанов В.А.*

Генетические варианты, связанные с нарушениями когнитивных функций человека, при болезни Альцгеймера14

*Марусин А.В., Макеева О.А., Вагайцева К.В., Бочарова А.В.,
Сваровская М.Г., Салахов Р.Р., Степанов В.А.*

Ассоциация гена аполипопротеина E с вариабельностью когнитивных способностей пожилых людей20

*Бабушкина Н.П., Брагина Е.Ю., Гараева А.Ф., Гончарова И.А.,
Цитриков Д.Ю., Гомбоева Д.Е., Рудко А.А., Фрейдин М.Б.*

Выявление генетической предрасположенности к латентному течению туберкулезной инфекции27

Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Степанов В.А.

Эволюционно-генетический анализ роли регуляторных участков гена *NDRG1* в формировании структуры наследственной предрасположенности к преэклампсии в популяциях различного этнического происхождения32

Попович А.А., Вагайцева К.В., Бочарова А.В., Степанов В.А.

Связь генетической структуры популяций человека с географическими и климатическими параметрами37

Шилова Н.В.

Аутосомные реципрокные транслокации: пренатальная селекция, сегрегация и оценка эмпирического риска рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом при семейном носительстве41

*Никитина Т.В., Жигалина Д.И., Саженова Е.А.,
Толмачева Е.Н., Скрябин Н.А., Лебедев И.Н.*

Неслучайное распределение кариотипов эмбрионов у женщин с привычным невынашиванием беременности50

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

Executive editor
IZHEVSKAYA V.L.

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

Publisher: Irishkin Dmitry
E-mail: genius-media@mail.ru

Medical GENETICS

Monthly reviewed scientific and practical journal

2018. Volume 17. №1 (187)

Content

REVIEWS

- Vasilyev S.A., Lebedev I.N.*
Cytogenetic and expression markers of individual human radiosensitivity3
- Golubenko M.V., Salakhov R.R., Shumakova T.V., Buikin S.V.,
Makeeva O.A., Nazarenko M.S., Puzyrev V.P.*
Mitochondrial DNA polymorphism and cardiovascular continuum diseases9

ARTICLES

- Bocharova A.V., Marusin A.V., Makeeva O.A., Zhukova I.A.,
Zhukova N.G., Alifirova V.M., Stepanov V.A.*
Genetic markers of decline human cognitive functions in Alzheimer's disease.....14
- Marusin A.V., Makeeva O.A., Vagaytseva K.V.,
Bocharova A.V., Swarovskaya M.G., Salakhov R.R., Stepanov V.A.*
Association of apolipoprotein E gene polymorphism
with cognitive abilities variability of elderly people20
- Babushkina N.P., Bragina E.Yu., Garaeva A.F., Goncharova I.A.,
Tcitrkov D.Yu., Gomboeva D.E., Rudko A.A., Freidin M.B.*
Identification of genetic predisposition to latent tuberculosis infection.....27
- Serebrova V.N., Trifonova E.A., Stepanov V.A.*
Evolutionary-genetic analysis of the role of regulatory regions
in *NDRG1* gene in the formation of the hereditary predisposition structure
to preeclampsia in different ethnic groups32
- Popovich A.A., Vagaitseva K.V., Bocharova A.V., Stepanov V.A.*
Relationship between the genetic structure
of human populations and geographical and climatic parameters.....37
- Shilova N.V.*
Autosomal reciprocal translocations:
prenatal selection, segregation and assessment
of empirical risks for reciprocal translocation carriers of having
a liveborn child with chromosome imbalance41
- Nikitina T.V., Zhigalina D.I., Sazhenova E.A.,
Tolmacheva E.N., Skryabin N.A., Lebedev I.N.*
Non-random distribution of embryonic karyotypes
in women with recurrent pregnancy losses.....50

Цитогенетические и экспрессионные маркеры индивидуальной радиочувствительности человека

Васильев С.А., Лебедев И.Н.

ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»
Научно-исследовательский институт медицинской генетики, г. Томск, Россия, e-mail genetics@tnimc.ru

Воздействие ионизирующего излучения вызывает значительные функциональные изменения в клетках человека, выражающиеся в активации различных сигнальных путей и транскрипционного ответа множества генов. Величина этих изменений переменна у разных индивидов, составляя феномен индивидуальной радиочувствительности. В обзоре рассматриваются известные маркеры индивидуальной радиочувствительности человека, начиная от цитогенетических, позволяющих непосредственно оценить эффективность репарации радиационно-индуцированных повреждений ДНК в клетках, до маркеров, выделенных на основании полногеномных и полнотранскриптомных исследований дифференциально экспрессирующихся генов, обуславливающих различные аспекты клеточного и организменного ответа на радиационное воздействие.

Ключевые слова: биомаркеры, индивидуальная радиочувствительность, хромосомные аберрации, микроядра, фокусы γ H2AX, экспрессия генов.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено при поддержке стипендии Президента РФ СП-3647.2015.4.

Cytogenetic and expression markers of individual human radiosensitivity

Vasilyev S.A., Lebedev I.N.

Research Institute of Medical Genetics,
Tomsk National Research Institute of Medical Genetics, Tomsk

Exposure to ionizing radiation causes significant functional changes in human cells which lead to activation of various signaling pathways and transcriptional response of many genes. The magnitude of these changes is variable for different individuals, making the phenomenon of individual radiosensitivity. In the review, markers of individual radiosensitivity are described ranging from cytogenetic markers for assessing the efficiency of DNA repair of radiation-induced damage in cells to genome- and transcriptome-wide approaches to identify differentially expressed genes that determine various aspects of response to radiation exposure.

Keywords: biomarkers, individual radiosensitivity, chromosome aberrations, micronuclei, γ H2AX foci, gene expression.

Введение

Значительные отличия в радиочувствительности между отдельными индивидами диктуют необходимость характеристики механизмов, ответственных за формирование индивидуальных особенностей ответа клеток человека на ионизирующее излучение. Частота повреждений ДНК в соматических клетках человека определяется уровнем мутагенной нагрузки, которой подвергаются клетки человека, а также эффективностью работы систем репарации возникающих нарушений. В основе межиндивидуальных различий лежат генетические причины, такие, как вариации на уровне последовательности ДНК или экспрессии генов репарации ДНК, метаболизма ксенобиотиков, антиоксидантной защиты. Хорошо известны ключевые сигнальные пути, играющие ведущую роль в ответе соматических клеток человека на ионизирующее излучение и, в первую очередь, в восстановлении повреждений ДНК. Однако молекулярные и клеточные механизмы, обуславливающие межиндивидуальные различия в уровне радиационно-индуциро-

ванных повреждений ДНК в клетках человека, остаются ещё во многом не идентифицированными.

Возможные приложения этих исследований обширны и простираются от профессионального отбора кандидатов на дальние космические полеты до разработки персонализированных подходов к проведению лучевой терапии онкологических больных. Кроме того, актуальным является поиск генов-мишеней для радиосенсибилизации опухолевых клеток при лучевой терапии злокачественных новообразований.

В обзоре рассматриваются известные маркеры индивидуальной радиочувствительности человека, начиная от цитогенетических, позволяющих непосредственно оценить эффективность репарации радиационно-индуцированных повреждений ДНК в клетках, до маркеров, выделенных на основании полногеномных и полнотранскриптомных исследований дифференциально экспрессирующихся генов, обуславливающих различные аспекты клеточного и организменного ответа на радиационное воздействие.

Цитогенетические маркеры индивидуальной радиочувствительности

Одним из классических методов, позволяющих оценивать индивидуальную радиочувствительность, является анализ хромосомных aberrаций в культивированных лимфоцитах периферической крови. Данный метод позволяет оценить как aberrации хромосомного типа (делеции, транслокации), так и разрывы и обмены, являющиеся нарушениями хроматидного типа. Анализ препаратов метафазных хромосом после воздействия ионизирующего излучения *in vitro* использовался для оценки индивидуальной радиочувствительности в отношении развития осложнений в ходе лучевой терапии лишь в немногочисленных исследованиях [1–3]. У больных раком молочной железы (РМЖ) в ходе лучевой терапии с использованием малых и больших мощностей доз не было показано связи между вероятностью возникновения и тяжестью побочных реакций с частотой хроматидных разрывов после модельного воздействия γ -излучением в дозе 3,5 Гр *in vitro* [1]. В другом исследовании было обнаружено, что частота хроматидных разрывов в культивированных лимфоцитах периферической крови больных с опухолями головы и шеи после облучения *in vitro* рентгеновским излучением в дозе 6 Гр была статистически значимо выше у пациентов, имеющих тяжелые осложнения в ходе лучевой терапии, по сравнению с менее радиочувствительными пациентами [2]. В более поздней работе той же группой авторов было показано, что частота хроматидных разрывов отражает вероятность возникновения побочных реакций лучевой терапии только при модельном воздействии в дозе 6 Гр, но не 3 Гр [3].

Таким образом, ввиду небольшого числа проведенных исследований и противоречивых результатов нельзя однозначно говорить о возможности предсказания побочных эффектов лучевой терапии на основе анализа частоты хроматидных aberrаций *in vitro* при облучении. Необходимо подчеркнуть, что в проведенных к настоящему моменту исследованиях применялся подход с облучением лимфоцитов периферической крови в фазе G₂ клеточного цикла *in vitro* и использованием анализа только частоты хроматидных разрывов в качестве маркера ошибок системы репарации ДНК [1–3].

Наряду с исследованием препаратов метафазных хромосом в качестве маркера оценки вероятности развития побочных реакций при лучевой терапии возможно и использование частоты микроядер. Микроядра образуются при отстаивании в анафазе митотического деления как ацентрических фрагментов, связанных с прямым воздействием ионизирующего излучения, так и целых хроматид или хромосом [4]. Следовательно, оценка частоты микроядер, содержащих фрагменты хромосом, может рассматриваться как аналог оценки частоты хроматидных разрывов. Большие возможности для автоматизации и низкие трудозатраты при подсчете микроядер определяют интерес исследователей к их анализу в каче-

стве биомаркера индивидуальной радиочувствительности. Однако к настоящему моменту было предпринято лишь несколько попыток оценки возможности применения микроядерного теста для предсказания индивидуальной радиочувствительности онкологических больных в ходе лучевой терапии. Не было обнаружено корреляции между уровнем микроядер при облучении *in vitro* и вероятностью развития побочных реакций у больных РМЖ [1] и пациентов с раком шейки матки [5]. Однако при облучении лимфоцитов периферической крови *in vitro* γ -излучением в дозе 4 Гр частота микроядер в клетках, полученных от больных с тяжелыми реакциями после курса лучевой терапии, была статистически значимо выше по сравнению с клетками больных с отсутствием побочных эффектов [6].

Недавно была предложена новая чувствительная методика определения числа двунитевых разрывов ДНК, основанная на иммунофлуоресцентном анализе белков, участвующих в репарации этих разрывов. В клетке в ответ на действие ионизирующего излучения наблюдается образование так называемых радиационно-индуцированных фокусов белков репарации ДНК [7]. Они являются динамическими структурами, содержащими тысячи копий белков, участвующих в различных этапах репарации двунитевых разрывов ДНК и передаче сигналов, активирующих контрольную точку клеточного цикла. Эти структуры могут оцениваться микроскопически в виде дискретных фокусов, окружающих двунитевые разрывы ДНК. Среди белков, участвующих в образовании радиационно-индуцированных фокусов, особое значение придается фосфорилированному гистону γ H2AX и медиаторному белку 53BP1, играющим важную роль в репарации двунитевых разрывов ДНК [8]. Так как число радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX тесно связано с числом двунитевых разрывов, принято считать, что фокусы γ H2AX локализуются в местах двунитевых разрывов ДНК [8, 9]. В связи с этим важным вопросом является взаимосвязь числа фокусов γ H2AX с частотой структурных и числовых нарушений хромосом. Фактически, исходя из механизмов формирования и динамики исчезновения фокусов γ H2AX после возникновения двунитевых разрывов ДНК в клетке, число остаточных фокусов γ H2AX должно отражать количество оставшихся нерепарированными двунитевых разрывов ДНК. Эти нерепарированные двунитевые разрывы ДНК напрямую связаны с формированием одноударных структурных aberrаций хромосомного и хроматидного типа (парных и хроматидных фрагментов) и центромеро-негативных микроядер. Тем не менее, такая связь между остаточными фокусами γ H2AX и частотой хромосомных нарушений далеко не всегда обнаруживается при проведении реальных исследований [10]. Так, при анализе радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах женщин, больных злокачественными новообразованиями, не было обнаружено

никакой корреляции между результатами G₂-теста и числом фокусов γH2AX после облучения в условиях *in vitro* [11]. В другом исследовании у больных злокачественными новообразованиями до терапии был установлен повышенный уровень хромосомных aberrаций, по сравнению со здоровыми индивидами, тогда как уровень фокусов γH2AX не был статистически значимо повышен [12].

В нашей работе в лимфоцитах периферической крови 54 здоровых людей после воздействия γ-излучения в дозе 2 Гр *in vitro* были проанализированы спонтанные фокусы γH2AX и радиационно-индуцированные микроядра [13]. Анализ фокусов γH2AX был осуществлен путём иммунофлуоресцентного анализа препаратов, тогда как для оценки частоты микроядер был использован микроядерный тест на цитокинез-блокированных двухъядерных клетках в комбинации с флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH) с панцентромерными ДНК-зондами. Была обнаружена обратная корреляция между спонтанным уровнем фокусов γH2AX и частотой центромеро-негативных микроядер после облучения, являющихся маркером потерь ацентрических хромосомных фрагментов ($R = -0,37$, $p = 0,025$) [13]. Обратная корреляция была обнаружена также и между спонтанным уровнем фокусов γH2AX до лучевой терапии и частотой aberrаций хромосомного типа после окончания лучевой терапии в группе больных злокачественными новообразованиями ($R = -0,85$, $p = 0,0008$) [14]. Это указывает на возможность использования спонтанного уровня фокусов γH2AX для прогноза индивидуальной радиочувствительности соматических клеток человека как *in vitro*, так и *in vivo*. С другой стороны, обнаруженный эффект, по-видимому, может иметь определенную специфику, определяемую типом клеток, так как, например, в фибробластах экстраэмбриональной мезодермы человека он не обнаруживается [15].

Теоретически, эффективность репарации двунитевых разрывов ДНК может определять не только формирование структурных хромосомных aberrаций в отдельных клетках, но и реакцию тканей на воздействие ионизирующего излучения *in vivo*. В связи с этим интересны попытки установления связи между уровнем фокусов белков репарации ДНК и риском возникновения побочных эффектов в здоровых тканях у больных злокачественными новообразованиями в ходе лучевой терапии. Чаще всего для этих целей используется уровень фокусов γH2AX в лимфоцитах периферической крови онкологических больных или их лимфобластоидных клеточных линиях после облучения в условиях *in vitro*. Однако, опыт использования анализа уровня радиационно-индуцированных фокусов γH2AX в клетках после облучения в условиях *in vitro* для прогноза радиочувствительности больных злокачественными новообразованиями в ходе лучевой терапии пока нельзя назвать успешным [11, 12, 16, 17]. Так, никакого повышения уровня радиа-

ционно-индуцированных фокусов γH2AX после облучения *in vitro* не было зарегистрировано в лимфобластоидных линиях больных злокачественными новообразованиями различных локализаций с побочными эффектами в ходе лучевой терапии относительно группы больных без таких побочных эффектов [16]. Еще в одном аналогичном исследовании в выборке больных с опухолями шейки матки и эндометрия также не было обнаружено значимых отличий между уровнем радиационно-индуцированных фокусов γH2AX в лимфоцитах больных с побочными эффектами относительно больных без таких эффектов после облучения в условиях *in vitro*. Интересно, что использовавшийся параллельно анализ частоты хроматидных разрывов после облучения в фазе G₂ клеточного цикла позволил выявить повышенный уровень хроматидных разрывов у больных с побочными эффектами после прохождения лучевой терапии [11]. Однако в последующем исследовании больных раком простаты различий между больными с побочными эффектами лучевой терапии и без них не было обнаружено ни для фокусов γH2AX, ни для хроматидных разрывов [12]. Наконец, статистически значимых отличий не было выявлено у больных с побочными эффектами лучевой терапии путем оценки цито- и генотоксичности с использованием окраски аннексином, анализа фокусов γH2AX и комет-теста [17].

Результаты анализа связи фокусов γH2AX с радиочувствительностью больных злокачественными новообразованиями в ходе лучевой терапии после воздействия радиации на лимфоциты в условиях *in vivo* пока также противоречивы. Так, анализ уровня фокусов γH2AX в лимфоцитах больных с опухолями головы и шеи через 0,5, 2,5, 5 и 24 ч после первой фракции воздействия не позволил обнаружить значимых различий между больными с побочными эффектами и больными без них [18]. Аналогичные результаты были получены и в нашем исследовании для фокусов белков γH2AX и 53BP1 в лимфоцитах периферической крови больных РМЖ в ходе лучевой терапии [19]. Однако в другой работе в лимфоцитах больных РМЖ с тяжелыми побочными эффектами лучевой терапии был установлен повышенный уровень фокусов γH2AX [20]. Тем не менее, в последующем исследовании тех же авторов в подгруппе больных колоректальным раком с тяжелыми побочными эффектами лучевого воздействия повышенного уровня фокусов γH2AX и 53BP1 в лимфоцитах не наблюдалось [21].

Принципиальным вопросом является оценка радиочувствительности именно опухолевых клеток. В одном из исследований динамика репарации радиационно-индуцированных фокусов γH2AX коррелировала с клональной выживаемостью опухолевых клеточных линий [22]. В нашем исследовании также была обнаружена корреляция динамики возникновения и исчезновения радиационно-индуцированных фокусов белка 53BP1

в 11 опухолевых клеточных линиях с их радиочувствительностью [23]. Однако в других исследованиях такой взаимосвязи не установлено [24, 25].

В целом, цитогенетических маркеров, по-видимому, оказывается недостаточно для оценки индивидуальной радиочувствительности человека, а значит должны учитываться дополнительные маркеры, среди которых могут быть дифференциальная активность генов, уровень апоптоза, иммунный ответ и другие компоненты радиационно-индуцированного ответа организма.

Радиогеномика и радиотранскриптомика

Долгое время основные усилия в выявлении маркеров индивидуальной радиочувствительности были направлены на определение генетической составляющей такого ответа в части влияния полиморфизма отдельных кандидатных генов, участвующих в репарации ДНК и метаболизме ксенобиотиков, на индивидуальную радиочувствительность человека [26, 27]. Проведенные работы позволили выявить влияние отдельных полиморфных вариантов, которое, однако, не всегда подтверждалось в независимых исследованиях [28]. Учитывая эти проблемы, в 2010 г. была сформулирована концепция радиогеномики [29] и начался период широкогеномных ассоциативных исследований (GWAS), направленных на выявление полиморфных генетических вариантов, ассоциированных с риском развития побочных эффектов при лучевой терапии [30, 31]. Результатом таких исследований стало выявление значимых ассоциаций с отдельными полиморфными вариантами в генах *FSHR*, *IFNK*, *HSD17B2*, *SLC36A4*, *KCND3*, *TANC1*, играющих в большинстве своем сигнальную роль. Таким образом, проведение GWAS дало понимание того, что в формировании радиочувствительности человека на клеточном и организменном уровне ключевую роль могут играть гены, не задействованные напрямую в репарации радиационно-индуцированных повреждений ДНК. Поэтому выявление важных участников этого процесса невозможно в рамках кандидатного подхода и требует проведения именно широкогеномных исследований [34, 35].

Помимо структурной вариабельности генома, ключевую роль в формировании фенотипа играет эпигенетическая компонента, определяющая различную регуляцию экспрессии генов в клетках различных индивидов. Поэтому еще одной возможностью для выявления генов, играющих определяющую роль в формировании индивидуальной радиочувствительности, является полнотранскриптомный анализ профиля экспрессии генов у индивидов с различной радиочувствительностью. Такой подход может позволить не только выявить отдельные компоненты радиационно-индуцированного клеточного ответа, но и значительно углубить понимание механизмов его реализации за счет анализа сетей регуляции транскрипционной активности генов через поиск ключевых генов-регуляторов.

Наиболее очевидными кандидатами на роль генов, экспрессия которых может быть связана с изменением эффективности репарации ДНК, являются гены, продукты которых участвуют в ответе на повреждение ДНК. Действительно, клетки, нокаутные по многим генам репарации ДНК, имеют повышенную радиочувствительность. Среди них есть как непосредственные участники репарации ДНК, так и гены, продукты которых обеспечивают проведение сигналов, направленных на привлечение других белков, активацию экспрессии других генов или активацию контрольных точек клеточного цикла. Однако нарушение работы таких генов значительно снижает жизнеспособность организма и приводит к гибели или формированию наследственных синдромов, в частности синдрома Ниймегена, пигментной ксеродермы, атаксии-телеангиэктазии и ряда других [36, 37]. Поэтому, вероятно, индивидуальная радиочувствительность здоровых индивидов должна определяться генами с менее выраженным влиянием на жизнеспособность. Ими могут быть косвенные участники радиационно-индуцированного ответа, преимущественно обеспечивающие отдельные аспекты проведения сигналов, или транскрипционные факторы, регулирующие экспрессию их генов.

Доступность технологий полнотранскриптомного анализа с использованием микрочипов определила проведение большого количества исследований, направленных на выявление радиационно-индуцированных изменений профиля экспрессии генов. Такие работы выполняются как на нормальных соматических клетках человека [38, 44], так и в опухолевых клеточных линиях [45–51]. Кроме того, было обнаружено, что транскрипционный ответ клеток на воздействие радиации в малых и высоких дозах значительно различается между собой [39, 40]. Наконец, такого рода исследования позволили выявить гены, уровень экспрессии которых может быть потенциально использован для целей биодозиметрии [42, 52, 53].

Вместе с тем, несмотря на значительное количество работ, связанных с профилированием радиационно-индуцированной активности генов, сравнительно мало исследований направлено на выявление генов, отличия в экспрессии которых могут обуславливать индивидуальные особенности ответа на радиацию. В основном эти исследования проведены с использованием только опухолевых клеточных линий, часто отличающихся между собой по локализации первичной опухоли и кариотипу. В результате этих работ были сформированы экспрессионные панели, состоящие из различного числа генов и позволяющие определять индивидуальную радиочувствительность опухолевых клеточных линий: 10 генов (на основе 48 опухолевых линий) [54]; 31 ген (на основе 60 опухолевых линий) [48]; 70 генов Mammarray® (на основе опухолей 1053 больных РМЖ) [55]; 7 генов (на основе опухолей 191 больного РМЖ) [56]. Продукты генов из сформированных панелей участвуют в регуляции

клеточного цикла, репликации ДНК, межклеточных контактах, апоптотическом сигналинге и ремоделировании хроматина [48, 54, 55].

К сожалению, отличия профилей экспрессии нормальных соматических клеток различных индивидов в ответ на воздействие ионизирующего излучения остаются практически не исследованными. Проведение такого анализа позволило бы выявить маркеры индивидуальной радиочувствительности здоровых тканей человека. Такие маркеры могли бы найти применение в системах планирования курсов лучевой терапии злокачественных новообразований для персонализированного предсказания риска развития побочных эффектов. Кроме того, такие системы маркеров обладают большим потенциалом для использования при профессионального отбора и биомониторинга на предприятиях, связанных с воздействием ионизирующего излучения на человека в рамках профессиональной деятельности, а также в космической отрасли. Учитывая такой потенциал, актуальным становится проведение полнотранскриптомных исследований, направленных на выявление маркеров индивидуальной радиочувствительности нормальных соматических клеток человека.

Таким образом, в настоящее время наблюдается высокий интерес к выявлению маркеров индивидуальной чувствительности человека к воздействию ионизирующего излучения, связанный, в первую очередь, с необходимостью понимания биологических основ противоопухолевой терапии и разработки новых средств преодоления опухолевой радиорезистентности. Развитие молекулярно-генетических технологий определяет переход от цитогенетических методов определения радиочувствительности к созданию панелей экспрессионных генетических маркеров. Кроме того, сравнительная доступность широкогеномных и полнотранскриптомных подходов предоставляют новые возможности для разведочного поиска маркеров индивидуальной радиочувствительности среди генов, не связанных очевидным образом с радиационно-индуцированным клеточным ответом, что представляет собой, возможно, наиболее перспективный путь к выявлению клинически значимых маркеров чувствительности нормальных соматических клеток человека к воздействию ионизирующего излучения.

Список литературы

1. Barber JB, Burrill W, Spreadborough AR, et al. Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol.* 2000; 55(2): 179-86.
2. Borgmann K, Roper B, El-Awady R, et al. Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. *Radiother Oncol.* 2002; 64(2): 141-52.
3. Borgmann K, Haerberle D, Doerk T, et al. Genetic determination of chromosomal radiosensitivities in G0- and G2-phase human lymphocytes. *Radiother Oncol.* 2007; 83(2): 196-202.
4. Fenech M The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys.* 2010; 98(2): 234-43.
5. Slonina D, Biesaga B, Urbanski K, et al. Comparison of chromosomal radiosensitivity of normal cells with and without HRS-like response and normal tissue reactions in patients with cervix cancer. *Int J Radiat Biol.* 2008; 84(5): 421-8.
6. Widel M, Jedrus S, Lukaszczuk B, et al. Radiation-induced micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is correlated with normal tissue damage in patients with cervical carcinoma undergoing radiotherapy. *Radiat Res.* 2003; 159(6): 713-21.
7. Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, et al. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol.* 2006; 173(2): 195-206.
8. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, et al. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res.* 2002; 158(4): 486-92.
9. Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, et al. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(16): 5706-15.
10. Valdiglesias V, Giunta S, Fenech M, et al. gammaH2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res.* 2013.
11. Werbrout J, De Ruyck K, Beels L, et al. Prediction of late normal tissue complications in RT treated gynaecological cancer patients: potential of the gamma-H2AX foci assay and association with chromosomal radiosensitivity. *Oncol Rep.* 2010; 23(2): 571-8.
12. Brzozowska K, Pinkawa M, Eble MJ, et al. In vivo versus in vitro individual radiosensitivity analysed in healthy donors and in prostate cancer patients with and without severe side effects after radiotherapy. *Int J Radiat Biol.* 2012; 88(5): 405-13.
13. Васильев СА, Величевская АИ, Вишневецкая ТВ, и др. Фоновое количество фокусов γ H2AX в клетках человека как фактор индивидуальной радиочувствительности. Радиационная биология и радиоэкология. 2015; 55(4): 402-410.
14. Melnikov AA, Vasilyev SA, Musabaeva LI, et al. Cytogenetic effects of neutron therapy in patients with parotid gland tumors and relapse of breast cancer. *Experimental oncology.* 2012; 34(4): 354-357.
15. Беленко АА, Васильев СА, Лебедев ИН Маркеры индивидуальной радиочувствительности экстраэмбриональных клеток зародышей человека в условиях in vitro. Экологическая генетика. 2015; 13(4): 33-35.
16. Vasireddy RS, Sprung CN, Cempaka NL, et al. H2AX phosphorylation screen of cells from radiosensitive cancer patients reveals a novel DNA double-strand break repair cellular phenotype. *Br J Cancer.* 2010; 102(10): 1511-8.
17. Greve B, Bolling T, Amler S, et al. Evaluation of different biomarkers to predict individual radiosensitivity in an inter-laboratory comparison—lessons for future studies. *PLoS One.* 2012; 7(10): e47185.
18. Fleckenstein J, Kuhne M, Seegmuller K, et al. The impact of individual in vivo repair of DNA double-strand breaks on oral mucositis in adjuvant radiotherapy of head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011; 81(5): 1465-72.
19. Markova E, Somsedikova A, Vasilyev S, et al. DNA repair foci and late apoptosis/necrosis in peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients undergoing radiotherapy. *Int J Radiat Biol.* 2015; 91(12): 934-45.
20. Djuzenova CS, Elsner I, Katzer A, et al. Radiosensitivity in breast cancer assessed by the histone gamma-H2AX and 53BP1 foci. *Radiat Oncol.* 2013; 8(1): 98.
21. Djuzenova CS, Zimmermann M, Katzer A, et al. A prospective study on histone gamma-H2AX and 53BP1 foci expression in

rectal carcinoma patients: correlation with radiation therapy-induced outcome. *BMC Cancer*. 2015; 15: 856.

22. Klovov D, MacPhail SM, Banath JP, et al. Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of X-rays. *Radiother Oncol*. 2006; 80(2): 223-9.

23. Belyaev IY Radiation-induced DNA repair foci: spatio-temporal aspects of formation, application for assessment of radiosensitivity and biological dosimetry. *Mutat Res*. 2010; 704(1-3): 132-41.

24. Yoshikawa T, Kashino G, Ono K, et al. Phosphorylated H2AX foci in tumor cells have no correlation with their radiation sensitivities. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2009; 50(2): 151-60.

25. Zhao J, Guo Z, Zhang H, et al. The potential value of the neutral comet assay and gammaH2AX foci assay in assessing the radiosensitivity of carbon beam in human tumor cell lines. *Radiol Oncol*. 2013; 47(3): 247-57.

26. Andreassen CN Can risk of radiotherapy-induced normal tissue complications be predicted from genetic profiles? *Acta Oncol*. 2005; 44(8): 801-15.

27. Сальникова ЛЕ, Чумаченко АГ, Веснина ИН, и др. Полморфизм генов репарации и цитогенетические эффекты облучения. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2010; 50(6): 656-662.

28. Andreassen CN, Alsner J Genetic variants and normal tissue toxicity after radiotherapy: a systematic review. *Radiother Oncol*. 2009; 92(3): 299-309.

29. West C, Rosenstein BS, Alsner J, et al. Establishment of a Radiogenomics Consortium. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010; 76(5): 1295-6.

30. Kerns SL, Ostrer H, Stock R, et al. Genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the development of erectile dysfunction in African-American men after radiotherapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010; 78(5): 1292-300.

31. Kerns SL, Stock RG, Stone NN, et al. Genome-wide association study identifies a region on chromosome 11q14.3 associated with late rectal bleeding following radiation therapy for prostate cancer. *Radiother Oncol*. 2013; 107(3): 372-6.

32. Fachal L, Gomez-Caamano A, Barnett GC, et al. A three-stage genome-wide association study identifies a susceptibility locus for late radiotherapy toxicity at 2q24.1. *Nat Genet*. 2014; 46(8): 891-4.

33. Barnett GC, Thompson D, Fachal L, et al. A genome wide association study (GWAS) providing evidence of an association between common genetic variants and late radiotherapy toxicity. *Radiother Oncol*. 2014; 111(2): 178-85.

34. Guo Z, Shu Y, Zhou H, et al. Radiogenomics helps to achieve personalized therapy by evaluating patient responses to radiation treatment. *Carcinogenesis*. 2015; 36(3): 307-17.

35. Andreassen CN, Schack LM, Laursen LV, et al. Radiogenomics — current status, challenges and future directions. *Cancer Lett*. 2016; 382(1): 127-136.

36. Surrallés J, Jackson SP, Jasin M, et al. Molecular cross-talk among chromosome fragility syndromes. *Genes Dev*. 2004; 18(12): 1359-70.

37. Chrzanoska KH, Gregorek H, Dembowska-Baginska B, et al. Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet J Rare Dis*. 2012; 7: 13.

38. Amundson SA, Do KT, Shahab S, et al. Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat Res*. 2000; 154(3): 342-6.

39. Ding LH, Shingyoji M, Chen F, et al. Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses. *Radiat Res*. 2005; 164(1): 17-26.

40. El-Saghire H, Thierens H, Monsieurs P, et al. Gene set enrichment analysis highlights different gene expression profiles in whole blood samples X-irradiated with low and high doses. *Int J Radiat Biol*. 2013; 89(8): 628-38.

41. Franco N, Lamartine J, Frouin V, et al. Low-dose exposure to gamma rays induces specific gene regulations in normal human keratinocytes. *Radiat Res*. 2005; 163(6): 623-35.

42. Kabacik S, Mackay A, Tamber N, et al. Gene expression following ionising radiation: identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response. *Int J Radiat Biol*. 2011; 87(2): 115-29.

43. Kang CM, Park KP, Song JE, et al. Possible biomarkers for ionizing radiation exposure in human peripheral blood lymphocytes. *Radiat Res*. 2003; 159(3): 312-9.

44. Warters RL, Packard AT, Kramer GF, et al. Differential gene expression in primary human skin keratinocytes and fibroblasts in response to ionizing radiation. *Radiat Res*. 2009; 172(1): 82-95.

45. Amundson SA, Do KT, Vinikoor LC, et al. Integrating global gene expression and radiation survival parameters across the 60 cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *Cancer Res*. 2008; 68(2): 415-24.

46. Eschrich SA, Fulp WJ, Pawitan Y, et al. Validation of a radiosensitivity molecular signature in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2012; 18(18): 5134-43.

47. Hall JS, Iype R, Senra J, et al. Investigation of radiosensitivity gene signatures in cancer cell lines. *PLoS One*. 2014; 9(1): e86329.

48. Kim HS, Kim SC, Kim SJ, et al. Identification of a radiosensitivity signature using integrative metaanalysis of published microarray data for NCI-60 cancer cells. *BMC Genomics*. 2012; 13: 348.

49. Otomo T, Hishii M, Arai H, et al. Microarray analysis of temporal gene responses to ionizing radiation in two glioblastoma cell lines: up-regulation of DNA repair genes. *J Radiat Res*. 2004; 45(1): 53-60.

50. Tewari D, Monk BJ, Al-Ghazi MS, et al. Gene expression profiling of in vitro radiation resistance in cervical carcinoma: a feasibility study. *Gynecol Oncol*. 2005; 99(1): 84-91.

51. Torres-Roca JF, Eschrich S, Zhao H, et al. Prediction of radiation sensitivity using a gene expression classifier. *Cancer Res*. 2005; 65(16): 7169-76.

52. Marchetti F, Coleman MA, Jones IM, et al. Candidate protein biosimeters of human exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*. 2006; 82(9): 605-39.

53. Paul S, Amundson SA Development of gene expression signatures for practical radiation biodosimetry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008; 71(4): 1236-1244.

54. Eschrich SA, Pramana J, Zhang H, et al. A gene expression model of intrinsic tumor radiosensitivity: prediction of response and prognosis after chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009; 75(2): 489-96.

55. Drukker CA, Elias SG, Nijenhuis MV, et al. Gene expression profiling to predict the risk of locoregional recurrence in breast cancer: a pooled analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 148(3): 599-613.

56. Tramm T, Mohammed H, Myhre S, et al. Development and validation of a gene profile predicting benefit of postmastectomy radiotherapy in patients with high-risk breast cancer: a study of gene expression in the DBCG82bc cohort. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(20): 5272-80.

Полиморфизм митохондриальной ДНК и заболевания сердечно-сосудистого континуума

Голубенко М.В.^{1,2}, Салахов Р.Р.², Шумакова Т.В.¹, Буйкин С.В.¹,
Макеева О.А.¹, Назаренко М.С.^{1,2,3}, Пузырев В.П.^{1,3}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

³ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

e-mail: maria.golubenko@medgenetics.ru

Митохондриальный геном кодирует жизненно важные белки субъединиц дыхательной цепи и характеризуется высоким уровнем полиморфизма в популяциях человека. Однако работы по поиску генов предрасположенности к многофакторным заболеваниям, в том числе сердечно-сосудистым, часто ограничиваются анализом ядерного генома. В то же время показано, что отдельные генотипы мтДНК могут отличаться более высокой или низкой эффективностью окислительного фосфорилирования. Выявлены ассоциации популяционного полиморфизма мтДНК с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Согласно результатам наших исследований, а также опубликованных другими авторами результатам ассоциативных и функциональных исследований, можно говорить о том, что эффект полиморфизма мтДНК проявляется чаще не в предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям в целом, а в риске развития осложнений и коморбидных фенотипов в пределах синтропии сердечно-сосудистого континуума.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК (мтДНК), полиморфизм, сердечно-сосудистый континуум.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование частично поддержано грантом РФФИ № 16-04-01481-А.

Mitochondrial DNA polymorphism and cardiovascular continuum diseases

Golubenko M.V.^{1,2}, Salakhov R.R.², Shumakova T.V.¹, Buikin S.V.¹,
Makeeva O.A.¹, Nazarenko M.S.^{1,2,3}, Puzyrev V.P.^{1,3}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

² Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular diseases, Kemerovo, Russia

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Mitochondrial genome, encoding respiratory chain subunits, is characterized by high polymorphism level in human populations. In most studies for susceptibility genes for common diseases, including cardiovascular diseases, the analysis is limited to the nuclear genome. It was shown that particular mtDNA genotypes may differ by oxidative phosphorylation efficiency. Some associations of mtDNA polymorphisms with cardiovascular diseases have been found. According to our results and published data, we suggest that mtDNA effect on cardiovascular system does not manifest in predisposition to cardiovascular diseases themselves but rather in risk of complications and comorbidities in the cardiovascular continuum.

Key words: mitochondrial DNA (mtDNA), polymorphism, cardiovascular continuum.

Введение

Заболевания сердечно-сосудистой системы, объединяемые в сердечно-сосудистый континуум (ССК) [1], являются ведущей причиной заболеваемости и смертности взрослого населения. Оценки наследуемости болезней, входящих в ССК, достигают 65%. Однако многочисленные исследования, посвященные анализу ассоциаций полиморфизма генома человека с сердечно-сосудистыми заболеваниями, обычно выявляют не так уж много SNP, имеющих значимые эффекты. Так, в одном из наиболее крупных полногеномных ассоциативных исследований

(GWAS) для атеросклероза был выявлен сильный эффект всего одного SNP, для сахарного диабета 2 типа — трех SNP и для гипертонии — ни одного варианта [2]. Расхождения между оценками наследуемости и фактически выявляемым эффектом генов предрасположенности к многофакторным заболеваниям с использованием GWAS были обозначены как «упущенная наследуемость» [3]. Наряду с эпигенетическими изменениями, эпистазом и генно-средовыми взаимодействиями, одним из компонентов «упущенной наследуемости» может являться митохондриальный геном [4].

Особенности полиморфизма мтДНК при многофакторных заболеваниях

Митохондриальная ДНК (мтДНК), в отличие от ядерного генома, расположена в цитоплазме, характеризуется высоким числом копий в клетке, может реплицироваться в течение всего клеточного цикла (а не только в S-фазе), имеет более высокий темп мутирования по сравнению с ДНК хромосом, наследуется по материнской линии без рекомбинации с отцовской мтДНК. Вероятно, эти особенности и привели к тому, что полиморфизм мтДНК обычно не рассматривается в GWAS. В то время как в ядерных генах для каждого биаллельного SNP возможны три варианта генотипа, а различные SNP на одной хромосоме могут быть или не быть сцеплены друг с другом, в мтДНК все полиморфные сайты изначально находятся в полном неравновесии по сцеплению, и генотип почти всегда «гомозиготен» — гомоплазмичен, за исключением случаев гетероплазмии, которые довольно редки. Таким образом, методы анализа ассоциаций мтДНК с заболеваниями несколько отличаются от используемых при работе с ядерными генами.

Технологический переход от GWAS с использованием SNP-микрочипов к секвенированию полных экзотов методом массового параллельного секвенирования не изменил этой ситуации: большинство наборов для обогащения и подготовки экзомных ДНК-библиотек не содержат проб для мтДНК [5]. Таким образом, мтДНК в буквальном смысле является «упущенной наследственностью» в масштабных генетических исследованиях многофакторных заболеваний.

Следует отметить, что для мтДНК уже осуществлена та задача, которая стоит сейчас перед исследователями ядерного генома: подробная классификация и описание популяционного полиморфизма. Соответственно, при анализе ассоциаций с полиморфизмом мтДНК исследователи сталкиваются с проблемами, которые только намечаются в полноэкзомных и полногеномных работах: как среди большого количества вариантов найти действительно значимые и учесть их взаимодействие в одном гаплотипе.

Дизайн ассоциативного исследования «случай-контроль» предполагает сравнение частот генотипов между анализируемыми выборками. При исследовании мтДНК обычно рассматривают наиболее распространенные в популяции гаплогруппы или полиморфизм в отдельных гипервариабельных сайтах. При этом нужно заметить, что как со стороны фенотипа, так и со стороны генотипа в таких исследованиях имеет место «скрытая изменчивость». Так, самая частая у европейцев гаплогруппа H (около 40% в популяции) состоит из десятков субгаплогрупп. Вторая по распространенности среди европейцев гаплогруппа U «старше», чем H, и состоит из девяти отдельных гаплогрупп U1-U9 (в том числе гаплогруппа K является ветвью гаплогруппы U8). Гаплогруппы J и T имеют ряд общих аминокислотных замен. В каждой из таких филогенетических линий

в процессе микроэволюции сложился свой уникальный набор замен в различных генах мтДНК, в том числе миссенс-полиморфизмов, замен в генах рРНК, тРНК и в регуляторных участках мтДНК. В свою очередь, фенотипическая гетерогенность выборок также может быть очень высокой: «коронарный атеросклероз», «инфаркт миокарда», «артериальная гипертензия» являются общими фенотипами, генетическая основа которых гетерогенна.

В результате при проведении ассоциативного исследования «случай-контроль» можно получить значимые различия лишь в случае довольно сильного эффекта отдельного варианта. Более детальное генотипирование (вплоть до полной последовательности мтДНК), учет сцепления и гомоплазмии (повторных мутаций на разном генетическом фоне) может помочь выявить более слабый вклад в предрасположенность к многофакторным заболеваниям.

При этом ассоциации, найденные в одной популяции, могут не выявляться в другой, что объясняется географической дифференциацией полиморфизма мтДНК. Например, ассоциация варианта T16189C с сахарным диабетом 2 типа [6] подтверждается не во всех исследованиях [7], однако в европейских, азиатских и латиноамериканских популяциях этот полиморфизм связан с разными гаплогруппами — т.е. с различным «генетическим фоном».

В отношении фенотипа нужно также стремиться к большей однородности выборок. Одним из способов «уточнения» фенотипа может быть выделение подгрупп пациентов с определенным характером течения заболевания и сопутствующими заболеваниями в пределах ССК, а также сравнение подгрупп с наличием или отсутствием сопутствующего заболевания или осложнения. Для изучения подверженности к болезни лучше использовать не только популяционный контроль (большинство индивидов в популяции имеют предрасположенность к заболеваниям ССК), но и группы индивидов, здоровых в пожилом возрасте, а также долгожителей.

Полиморфизм митохондриальной ДНК и заболевания ССК

Используя подобный подход в наших исследованиях, мы выявили ассоциации полиморфизма мтДНК с некоторыми фенотипами ССК (таблица). В частности, при сравнении выборки, сформированной из образцов ДНК индивидов, умерших в возрасте до 55 лет по различным сердечно-сосудистым причинам, было показано, что гаплогруппа H1 ассоциирована с ранней смертью от сердечно-сосудистых заболеваний [8]. Такой же неблагоприятный эффект для гаплогруппы H1 был выявлен и в отношении риска повторных инфарктов миокарда, ишемических инсультов, прогрессирования сердечной недостаточности в течение года после перво-

го инфаркта миокарда [9]. В то же время, фактором риска для раннего инфаркта миокарда — в возрасте до 55 лет — являлись гаплогруппа U2e и замена T16189C, а гаплогруппа U5, наоборот, реже встречалась в группе пациентов с ранним инфарктом, но с другой стороны, она ассоциирована с таким неблагоприятным показателем как сниженная (<40%) фракция выброса левого желудочка [9]. Все субгаплогруппы H, кроме H1 были факторами риска для развития ишемической кардиомиопатии, по сравнению с популяционной выборкой [8]. Анализ полиморфизма мтДНК при артериальной гипертензии показал, что гаплогруппа T была ассоциирована с гипертрофией левого желудочка сердца, в то время как индивиды с гаплогруппой H были менее склонны к развитию гипертрофии [10]. Гаплогруппа J была более распространена у пожилых людей без клинически выраженного атеросклероза сонных артерий, по сравнению с пациентами, имевшими показания для удаления каротидных бляшек. Согласно последним нашим исследованиям, у больных с сахарным диабетом 2 типа обнаружено разнонаправленное изменение частот гаплогрупп J и T в зависимости от того, перенесли ли они инфаркт миокарда: гаплогруппа T встречалась главным образом в группе с инфарктом, а гаплогруппа J — в группе без инфаркта. В выборке пациентов с сахарным диабетом 2 типа без инфаркта миокарда в анамнезе частоты гаплогрупп J и T составили 18,8% и 3,03%, а в группе пациентов с сахарным диабетом, перенесших инфаркт миокарда — 2,86% и 15,71% соответственно. Показано, что полиморфизм мтДНК ассоциирован также с изменчивостью количественных признаков: гаплогруппа H и вариант 16519C связаны с индексом массы тела у больных с острым коронарным синдромом, а у пациентов с са-

харным диабетом 2 типа гаплогруппа H была ассоциирована с более высокими значениями глюкозы в крови натощак; выявлена ассоциация гаплогруппы U с толщиной комплекса интима-медиа сонных артерий, а U5 — со сниженной фракцией выброса левого желудочка, найдена ассоциация гаплогруппы H с уровнем холестерина и со значениями глюкозы в крови индивидов при поступлении в стационар [9,11]. Выявлена ассоциация полиморфизма мтДНК с изменчивостью липидного спектра и интервальных оценок ЭКГ в популяциях различного этнического происхождения [8, 12—14].

Интересно, что большинство ассоциированных с фенотипом гаплогрупп мтДНК распространены в популяции с частотой около 10% (H1 — 12%, T — 10%, J — 6%, U5 — 12%). Другая заметная особенность состоит в том, что для полиморфизма мтДНК значимые ассоциации выявляются, главным образом, не с основными заболеваниями ССК (инфаркт миокарда, атеросклероз, сахарный диабет 2 типа, гипертензия), а с их осложнениями, коморбидными фенотипами (например, инфаркт миокарда при сахарном диабете 2 типа, повторные инфаркты в течение года наблюдения и т.д.), а также с изменчивостью патогенетически значимых количественных признаков. Обращает на себя внимание и тот факт, что некоторые гаплогруппы мтДНК нельзя однозначно охарактеризовать как «благоприятные» или «неблагоприятные». В зависимости от фенотипа, они могут иметь либо «рисковый», либо «протективный» эффект: например, гаплогруппа U5. Гаплогруппа J, по нашим данным, при заболеваниях ССК является скорее «благоприятным» фактором, тогда как, например, для офтальмопатии Лебера и для синдрома Бругада это фактор риска [15, 16].

Таблица

Ассоциации полиморфизма мтДНК с фенотипами ССК

Гаплогруппа (маркер)	Ассоциированный фенотип	OR	Доверительный интервал для OR
H1	Смерть от сердечно-сосудистых заболеваний в возрасте до 55 лет	1,98	1,11—3,51
H1	Повторные сердечно-сосудистые "события" в течение года после инфаркта миокарда	5,29	1,81—15,47
U2e	Инфаркт миокарда в возрасте до 55 лет	— *	p = 0,004*
T16189C	Инфаркт миокарда в возрасте до 55 лет	2,22	1,26—3,92
U5	Инфаркт миокарда в возрасте до 55 лет	0,29	0,13—0,66
U5	Значение фракции выброса левого желудочка менее 40%	2,3	1,13—4,70
J	Атеросклероз сонных артерий	0,22	0,07—0,71
J	Инфаркт миокарда у больных диабетом 2 типа	0,22	0,05—0,98
T	Инфаркт миокарда у больных диабетом 2 типа	10,91	2,34—50,82
T	Гипертрофия левого желудочка при артериальной гипертензии	6,16	1,17—9,74
H	Гипертрофия левого желудочка при артериальной гипертензии	0,42	0,17—0,98
H(-H1)	Ишемическая кардиомиопатия	1,51	1,04—2,20

Примечание. * OR не был рассчитан из-за нулевой частоты маркера в одной из групп. Уровень значимости различий указан по точному критерию Фишера.

Оценка функциональной значимости популяционного полиморфизма митохондриальной ДНК

Известно, что гаплогруппы H и J различаются по эффективности окислительного фосфорилирования и продукции активных форм кислорода: H характеризуется более высокими значениями этих показателей, а J — более низкими. Это было показано с использованием цибридов — клеточных линий, которые имеют одинаковый ядерный геном, но отличаются своей мтДНК [17]. При сопоставлении гаплогруппы H и африканской супергаплогруппы L были выявлены различия в продукции АТФ и АФК, а также в уровне экспрессии генов различных сигнальных путей [18].

Клеточные линии с гаплогруппой T были более устойчивы к окислительному стрессу [19], а цибридные линии с гаплогруппой J обладали большей скоростью роста и более высокой выживаемостью при сублетальных дозах ультрафиолетового облучения [20]. У больных астенозооспермией с гаплогруппой T при изучении активности окислительного фосфорилирования было выявлено снижение эффективности работы первого комплекса на 23% и четвертого комплекса — на 29%, по сравнению с гаплогруппой H [21]. Также было показано, что гаплогруппа T чаще встречается у больных гипертрофической кардиомиопатией [22]. Таким образом, эта гаплогруппа может являться фактором, способствующим гипертрофии миокарда как при моногенном заболевании [22], так и при гипертонии [10], а при сахарном диабете 2 типа — фактором риска инфаркта миокарда (см. выше).

Полиморфизм T16189C, приводящий к образованию гомополимерного (цитозинового) тракта с гетероплазмией длины этого тракта, может влиять на связывание белка mtSSB и, следовательно, на число копий мтДНК [23]. Так как окислительный стресс является одним из важных факторов в развитии атеросклероза, такие различия между гаплогруппами могут вносить свой вклад в прогрессирующее атеросклероза и его осложнений. Однако механизм влияния генотипа мтДНК на фенотип сердечно-сосудистой системы, вероятно, более комплексный и не ограничивается простым изменением уровня свободных радикалов и запаса АТФ. Функция митохондрий является основной, жизненно важной для клетки, и снижение продукции АТФ и АФК может приводить к активации соответствующих биохимических путей, с целью компенсации недостающей функции.

Не следует забывать и о ключевой роли митохондрий в инициации апоптоза. Есть данные об ассоциации некоторых гаплогрупп мтДНК с числом копий мтДНК в клетке [17], а также с уровнем экспрессии и/или метилирования некоторых ядерных генов, в том числе связанных с функционированием митохондрий; при этом гаплогруппа J в большинстве случаев была ассоциирована со снижением экспрессии, по сравнению с гаплогруппой H [17]. Исследования на клеточных линиях и модельных животных показывают, что взаимное «соот-

ветствие» ядерного и митохондриального геномов имеет значение для выживаемости клеток в культуре, приживаемости стволовых клеток при трансплантации и даже для устойчивости к сердечно-сосудистым заболеваниям [24].

Таким образом, роль полиморфизма мтДНК в формировании предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям не ограничивается влиянием на функцию дыхательной цепи. Учитывая результаты наших исследований, можно говорить о том, что для сердечно-сосудистой системы эффект полиморфизма мтДНК на уровне фенотипа проявляется чаще не в предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям в целом, а в риске развития осложнений и коморбидных фенотипов в пределах синтропии ССК.

Список литературы

1. Dzaug VJ, Antman EM, Black HR, et al. The cardiovascular disease continuum validated: clinical evidence of improved patient outcomes: part II: Clinical trial evidence (acute coronary syndromes through renal disease) and future directions. *Circulation*. 2006;114(25):2871-2891.
2. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447(7145):661-678.
3. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009; 461(7265):747-753.
4. Wallace DC. Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2013;368(1622):20120267.
5. Pesole G, Allen JF, Lane N, et al. The neglected genome. *EMBO Reports*. 2012;13(6):473-474.
6. Poulton J, Luan J, Macaulay V, Hennings S, Mitchell J, Wareham NJ. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. *Hum Mol Genet*. 2002;11(13):1581-1583.
7. Saxena R, de Bakker PI, Singer K, et al. Comprehensive association testing of common mitochondrial DNA variation in metabolic disease. *Am J Hum Genet*. 2006;79(1):54-61.
8. Жейкова ТВ. Генетическая основа регуляции окислительного стресса: связь с продолжительностью жизни и ишемической болезнью сердца. Автореф. Дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук. Томск, 2013. 24 с.
9. Голубенко МВ, Салахов РР, Макеева ОА, и др. Ассоциации полиморфизма митохондриальной ДНК с инфарктом миокарда и прогностически значимыми признаками атеросклероза. *Молекулярная биология*. 2015; 49 (6):968-976.
10. Буйкин СВ, Голубенко МВ, Пузырев ВП. Участие «митохондриальных генов» в формировании гипертрофии левого желудочка при артериальной гипертонии. *Молекулярная биология*. 2010; 44(1):28-32.
11. Салахов РР, Макеева ОА, Кашталап ВВ, Барбараш ОЛ, Голубенко МВ. Ассоциации полиморфизма митохондриального генома с количественными признаками при инфаркте миокарда и сахарном диабете. *Медицинская генетика*. 2015; 14(10):21-24.
12. Фрейдин МБ, Пузырев ВП, Салюков ВБ, Голубенко МВ. Связь полиморфизма некодирующих областей митохондриального генома человека с изменчивостью уровня артериального давления и величин интервальных оценок ЭКГ.

Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999; 127(1):82-84.

13. Буйкин СВ, Голубенко МВ, Пузырев ВП. Полиморфизм регуляторного района мтДНК и функционирование сердечно-сосудистой системы у тувинцев. Сибирский консилиум. 2006; 49(2):48-53.

14. Буйкин СВ. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов митохондриального генома и гена митохондриальной гамма ДНК-полимеразы с фенотипами сердечно-сосудистой системы. Автореф. дисс.. канд. мед. наук. Томск, 2006. 22 с.

15. Мазунин ИО, Володько НВ, Стариковская ЕБ, Сукерник РИ. Митохондриальный геном и митохондриальные заболевания человека. Молекулярная биология. 2010; 44(5):755-772.

16. Stocchi L, Polidori E, Potenza L, et al. Mutational analysis of mitochondrial DNA in Brugada syndrome. Cardiovascular Pathology. 2016; 25:47-54.

17. Kenney MC, Chwa M, Atilano S, et al. Inherited mitochondrial DNA variants can affect complement, inflammation and apoptosis pathways: insights into mitochondrial-nuclear interactions. Human Molecular Genetics. 2014;23(13):3537-3551.

18. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, et al. Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European in-

herited mitochondrial DNA haplogroups: implications for population susceptibility to diseases. Biochim Biophys Acta. 2014;1842(2):208-219.

19. Mueller EE, Brunner SM, Mayr JA, Stanger O, Sperl W, Kofler B. Functional differences between mitochondrial haplogroup T and haplogroup H in HEK293 cybrid cells. PLoS One. 2012;7(12):e52367.

20. Malik D, Hsu T, Falatoonzadeh P, et al. Human retinal transmitochondrial cybrids with J or H mtDNA haplogroups respond differently to ultraviolet radiation: implications for retinal diseases. PLoS One. 2014;9(2):e99003.

21. Ruiz-Pesini E, Lapena AC, Diez-Sanchez C, et al. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. Am J Hum Genet. 2000;67(3):682-696.

22. Castro MG, Huerta C, Reguero JR, et al. Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy. Int J Cardiol. 2006;112(2):202-206.

23. Park KS, Chan JC, Chuang LM, et al. Study Group of Molecular Diabetology in Asia. 2008. A mitochondrial DNA variant at position 16189 is associated with type 2 diabetes mellitus in Asians. Diabetologia. 2008;51:602-608.

24. Dunham-Snary KJ, Ballinger SW. Mitochondrial-nuclear DNA mismatch matters. Science. 2015;349:1449-1450.

Генетические варианты, связанные с нарушениями когнитивных функций человека, при болезни Альцгеймера

Бочарова А.В.¹, Марусин А.В.¹, Макеева О.А.^{1,2}, Жукова И.А.³, Жукова Н.Г.³, Алифинова В.М.³, Степанов В.А.^{1,4}

¹ ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»
«Научно-исследовательский институт медицинской генетики», г. Томск, anna.bocharova@medgenetics.ru

² Центр клинических исследований «Неббиоло», Томск

³ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск

⁴ ФГАУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск

Проведено репликативное ассоциативное исследование в дизайне случай-контроль 30 однонуклеотидных полиморфных вариантов генов, показавших высокодостоверную ассоциацию с когнитивными функциями, болезнью Альцгеймера (БА) или шизофренией по данным полногеномных ассоциативных исследований и метаанализам. Была установлена статистически достоверная ассоциация полиморфного варианта rs12922317 гена *SNX29* с фенотипом БА, что в других работах не встречалось. Минорный аллель G rs12922317 гена *SNX29* достоверно чаще встречался среди больных БА по сравнению с контрольной группой (OR = 1,57, 95% CI 1,14–2,16, p = 0,006). В других работах была показана роль полиморфного маркера rs12922317 гена *SNX29* в развитии таких заболеваний, как шизофрения, В-клеточная лимфома яичка и эпителиальная овариальная карцинома.

Ключевые слова: когнитивные функции, болезнь Альцгеймера, полиморфизм, гены, MALDI-TOF масс-спектрометрия.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 16-15-00020.

Genetic markers of decline human cognitive functions in Alzheimer's disease

Bocharova A.V.^{1*}, Marusin A.V.¹, Makeeva O.A.^{1,2}, Zhukova I.A.³, Zhukova N.G.³, Alifirova V.M.³, Stepanov V.A.^{1,4}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMС, Tomsk, Russia

² Nebbiolo Centre for Clinical Trials, Tomsk, Russia

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

⁴ Tomsk State University, Tomsk, Russia

* Corresponding author: anna.bocharova@medgenetics.ru (Anna Bocharova)

We have held a replication associative study in case-control design of 30 SNPs of genes that showed association with cognitive functions or Alzheimer's disease or schizophrenia according to the data of GWAS. A statistically significant association of the polymorphic variant rs12922317 of *SNX29* gene with the Alzheimer's disease in the Russian population was established, which was not found in other studies. Minor allele G rs12922317 of *SNX29* gene was significantly more frequent among patients with the Alzheimer's disease compared with control group (OR = 1.57, 95% CI 1.14–2.16, p = 0.006), and according to GWAS this marker was associated with schizophrenia.

Key words: cognitive functions, Alzheimer's disease, polymorphism, genes, MALDI-TOF mass spectrometry.

Введение

Процесс рационального познания мира и взаимодействие с ним осуществляется с помощью сложных функций головного мозга, которые называются когнитивными (высшие психические, высшие корковые, познавательные) [1]. Любые процессы, связанные с информацией, получаемой из внешнего мира, относятся к когнитивным функциям. Выделяют несколько основных компонентов: восприятие информации (гнозис), анализ и обработка информации (интеллект), хранение информации (память), передача информации (речь), двигательные навыки (праксис), поддержание оптимального уровня психической активности (внимание).

Если какое-либо заболевание является причиной ухудшения хотя бы одной из этих функций по сравнению с исходным уровнем, то можно говорить о когнитивных нарушениях (КН) [2]. Следует отметить, что нарушения когнитивных функций являются наиболее частым проявлением неврологических заболеваний, многие из которых приводят к деменции [1]. Причинами КН могут быть заболевания, различные по этиологии и патогенезу. Когнитивные расстройства различают по степени тяжести. Наиболее частым видом тяжелых КН является деменция. В 75% случаев причинами деменций становятся болезнь Альцгеймера (БА), смешанная деменция или деменция с тельцами Леви. В основе неде-

ментных состояний, приводящих к умеренным и легким КН, могут быть нарушения сна и бодрствования, эмоциональные и другие психические нарушения, такие как шизофрения, мании, депрессии [2].

Риск развития КН увеличивается с преодолением человеком 65-летнего возраста, и с каждым годом количество страдающих от разных форм нарушений познавательных способностей возрастает. Это связано с тем, что в последние десятилетия во всем мире наблюдается из-

менение возрастной структуры популяций: с повышением средней продолжительности жизни населения увеличивается доля пожилых и старых индивидуумов. От этого увеличиваются расходы на медицинскую и социальную помощь для психических и неврологических больных. Большую часть подобных больных составляют люди с деменцией. В настоящее время в мире насчитывается более 36,5 млн чел., которые страдают от деменции, и большинство из этих случаев связаны с БА [3].

Таблица 1

Характеристика изученных генетических маркеров

ОНП	Ген	Аллели	Локализация	Хромосома (GRCh38.p2)	Ассоциации по GWAS [Источник]
rs10273775	<i>CNTNAP2</i>	A/G*	Инtron	7:147200311	БА [12]
rs1031381	<i>NCAPD3</i>	C*/T	Инtron	11:134218788	КФ [13]
rs10489202	<i>MPC2</i>	G*/T	Инtron	1:167933841	ШЗ [14]
rs11064768	<i>CCDC60</i>	A*/G	Инtron	12:119380704	ШЗ [15]
rs11191580	<i>NT5C2</i>	C/T*	Инtron	10:103146454	ШЗ [16]
rs12125971	<i>LOC105378889-PRMT6</i>	C*/T	Межген. участок	1:106921021	Интеллект [17]
rs12140439	<i>LOC101928778-LOC105371627</i>	A/C*	Межген. участок	1:177753772	ШЗ [18]
rs1261117	<i>TCF4</i>	C*/T	Инtron	18:55282426	ШЗ [18]
rs12922317	<i>SNX29</i>	A*/G	Инtron	16:11983775	ШЗ [19]
rs12989701	<i>LOC105373605</i>	A/C*	Инtron	2:127130409	БА [20]
rs138880	<i>BRD1</i>	A/C*	Инtron	22:49824963	ШЗ [18]
rs1466662	<i>DCHS2</i>	A/T*	Инtron	4:154426241	БА [21]
rs1532278	<i>CLU</i>	C*/T	Инtron	8:27608798	БА [22]
rs1635	<i>NKAPL</i>	G*/T	Миссенс	6:28259826	ШЗ [23]
rs16887244	<i>LSM1</i>	A*/G	Инtron	8:38173827	ШЗ [14]
rs16897515	<i>POM121L2</i>	A*/C	Миссенс	6:27310241	ШЗ [18]
rs17203055	<i>ARHGAP31</i>	A*/G	Инtron	3:119365484	ШЗ [18]
rs17512836	<i>TCF4</i>	C*/T	Инtron	18:55527730	ШЗ [24]
rs17594526	<i>TCF4</i>	C*/T	Инtron	18:55391007	ШЗ [25]
rs17693963	<i>GPR89P-TRV-AAC1-5</i>	A*/C	Межген. участок	6:27742386	ШЗ [16]
rs3826656	<i>CD33</i>	A/G*	Инtron	19:51223357	БА [26]
rs433598	<i>ACSM1</i>	C/T*	Инtron	16:20668884	ШЗ [27]
rs4420638	<i>APOC1 – APOC1P1</i>	A*/G	Межген. участок	19:44919689	Возрастные когнитивные нарушения [28]
rs472926	<i>CDON</i>	A/G*	Инtron	11:126035363	БА [29]
rs4765905	<i>CACNA1C</i>	C/G*	Инtron	12:2240418	ШЗ [16]
rs561655	<i>PICALM-FNTAP1</i>	A/G*	Межген. участок	11:86089237	БА [22]
rs6859	<i>PVRL2</i>	A*/G	3' UTR	19:44878777	БА [30]
rs7004633	<i>LOC105375629-LOC105375631</i>	A/G*	Межген. участок	8:88748082	ШЗ [16]
rs7341475	<i>RELN</i>	A*/G	Инtron	7:103764368	ШЗ [31]
rs7561528	<i>LOC105373605</i>	A/G*	Инtron	2:127132061	БА [21]

Примечание. * – обозначен предковый аллель; БА – болезнь Альцгеймера; КФ – когнитивные функции; ШЗ – шизофрения.

Каждый год в популяции регистрируется 5–7 миллионов новых случаев БА [4]. Существенное снижение качества жизни страдающих БА сказывается не только на самом пациенте, но и на его близких людях.

Приведенные выше данные указывают на важность изучения причин нарушений когнитивных функций. За последние несколько лет в мировой литературе появились работы, связанные с поиском общих генетических компонент заболеваний, которые приводят к нарушению когнитивных функций, например, БА и болезнь Паркинсона или пограничное расстройство личности, биполярное расстройство и шизофрения [5, 6].

БА является типичным многофакторным заболеванием с полигенной моделью развития [7, 8, 9]. То есть, инициация, возраст начала и прогрессирование заболевания регулируются не только генетической компонентой, но образ жизни и факторы окружающей среды оказывают значительное влияние на прогрессирование заболевания. БА занимает лидирующее положение по данным ВОЗ в списке причин, которые приводят к инвалидности и дезадаптации человека в повседневной жизни.

Задачей настоящей работы был поиск генетических маркеров БА у русских на основе репликативного ана-

Таблица 2

Распределение генотипов и частоты аллелей у больных БА и в контрольной группе

№	ОНП*	МА	Больные					Контроль				
			11	12	22	MAF	p	11	12	22	MAF	p
1	rs10273775	A	42	43	18	0,3834	0,2346	74	123	85	0,5195	0,0339
2	rs1031381	T	42	48	16	0,3773	0,7081	97	129	59	0,4333	0,1859
3	rs10489202	T	62	41	3	0,2216	0,2135	184	92	10	0,1958	0,7170
4	rs11064768	G	89	17	0	0,0801	0,3694	246	40	0	0,0699	0,2035
5	rs11191580	C	85	18	1	0,0961	0,9653	239	43	3	0,0859	0,5004
6	rs12125971	T	88	15	3	0,0990	0,0329	243	43	1	0,0783	0,5325
7	rs12140439	A	58	41	7	0,2594	0,9458	143	117	27	0,2979	0,6661
8	rs12922317	G	35	45	26	0,4575	0,1360	118	137	32	0,3501	0,4075
9	rs12989701	A	82	24	0	0,1132	0,1887	204	80	2	0,1468	0,0492
10	rs138880	C	69	30	7	0,2075	0,1506	177	98	12	0,2125	0,7335
11	rs1466662	A	45	49	12	0,3443	0,8068	129	114	42	0,3473	0,0468
12	rs1532278	T	37	58	11	0,3773	0,0905	106	145	36	0,3780	0,2077
13	rs1635	T	87	18	0	0,0857	0,3367	251	33	2	0,0646	0,4323
14	rs16887244	G	64	33	7	0,2259	0,3434	179	91	15	0,2122	0,4448
15	rs16897515	A	88	16	2	0,0943	0,2296	228	53	4	0,1070	0,6482
16	rs17203055	G	80	26	0	0,1226	0,1501	230	55	1	0,0996	0,2252
17	rs17512836	C	100	1	0	0,0049	0,9601	273	13	0	0,0227	0,6941
18	rs17693963	C	87	16	1	0,0865	0,7838	254	30	1	0,0561	0,9094
19	rs3826656	G	60	38	7	0,2476	0,7685	163	107	16	0,2430	0,7750
20	rs433598	T	46	48	12	0,3396	0,9219	110	141	35	0,3688	0,3197
21	rs4420638	G	71	32	2	0,1714	0,4557	206	68	5	0,1397	0,8220
22	rs472926	G	78	27	1	0,1367	0,4185	197	80	9	0,1713	0,8010
23	rs561655	G	56	36	14	0,3118	0,0455	122	128	35	0,3473	0,8732
24	rs6859	A	27	53	26	0,4952	0,9992	90	149	47	0,4248	0,2639
25	rs7004633	G	70	34	2	0,1792	0,3533	182	83	10	0,1872	0,8880
26	rs7341475	A	75	30	1	0,1509	0,2835	185	93	8	0,1905	0,3604
27	rs7561528	A	50	46	10	0,3113	0,9013	136	122	29	0,3135	0,8313

Примечание. МА — минорный (редкий) аллель. Численности генотипов: 11 — гомозиготы по частому аллелю, 12 — гетерозиготы, 22 — гомозиготы по редкому аллелю. MAF — частота минорного аллеля; p — достигнутый уровень значимости соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при РХВ. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые отклонения от РХВ. * — в таблице не приведены данные для rs1261117 и rs17594526 гена *TCF4*, rs4765905 гена *CACNA1C*, т.к. они показали значение параметра «call rate» меньше 90%.

Анализ ассоциаций генетических маркеров с БА в русской популяции

№	ОНП	Ген	МА	OR	95% CI	p-value
1	rs1031381	<i>NCAPD3</i>	T	0,79	0,57–1,10	0,16
2	rs10489202	<i>MPC2</i>	T	1,17	0,80–1,72	0,42
3	rs11064768	<i>CCDC60</i>	G	1,16	0,64–2,09	0,62
4	rs11191580	<i>NT5C2</i>	C	1,13	0,66–1,95	0,66
5	rs12140439	<i>LOC101928778</i> <i>-LOC105371627</i>	A	0,83	0,58–1,18	0,29
6	rs12922317	<i>SNX29</i>	G	1,57	1,14–2,16	0,006
7	rs138880	<i>BRD1</i>	C	0,97	0,66–1,43	0,88
8	rs1532278	<i>CLU</i>	T	1,00	0,72–1,38	0,99
9	rs1635	<i>NKAPL</i>	T	1,36	0,75–2,44	0,31
10	rs16887244	<i>LSM1</i>	G	1,08	0,74–1,59	0,68
11	rs16897515	<i>POM121L2</i>	A	0,87	0,51–1,48	0,61
12	rs17203055	<i>ARHGAP31</i>	G	1,26	0,77–2,07	0,35
13	rs17512836	<i>TCF4</i>	C	0,21	0,03–1,65	0,1
14	rs17693963	<i>GPR89P-TRV-AAC1-5</i>	C	1,59	0,87–2,90	0,13
15	rs3826656	<i>CD33</i>	G	1,03	0,71–1,48	0,89
16	rs433598	<i>ACSM1</i>	T	0,88	0,63–1,23	0,45
17	rs4420638	<i>APOC1</i>	G	1,27	0,83–1,96	0,27
18	rs472926	<i>CDON</i>	G	0,77	0,49–1,20	0,24
19	rs6859	<i>PVRL2</i>	A	1,33	0,97–1,82	0,08
20	rs7004633	<i>LOC105375629-LOC105375631</i>	G	0,95	0,63–1,43	0,8
21	rs7341475	<i>RELN</i>	A	0,76	0,49–1,16	0,2
22	rs7561528	<i>LOC105373605</i>	A	0,99	0,70–1,39	0,95

Примечание. МА – минорный (редкий) аллель, OR – отношение шансов для минорного (редкого) аллеля, p-value – уровень значимости OR, жирным шрифтом выделены уровни значимости <0,05.

лиза маркеров, выявленных в широкогеномных исследованиях БА, шизофрении и когнитивных функций.

Материалы и методы

Группу обследуемых составили 106 больных БА и 287 здоровых в отношении психоневрологических заболеваний пожилых индивидов контрольной группы русского происхождения. В состав группы больных вошли пациенты кафедры неврологии и нейрохирургии Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск) с диагнозом *болезнь Альцгеймера* (код G.30 по МКБ-10). Средний возраст больных составил $72,1 \pm 7,8$ года. Диагноз устанавливали в соответствии с критериями МКБ-10, DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, четвертое издание) и NINCDS/ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) [10, 11]. Все больные прошли стандартные психоневрологические обследова-

ния. В контрольную группу вошли индивиды, не имеющие в анамнезе психоневрологических заболеваний (средний возраст $70,8 \pm 5,3$ года). Исследование было одобрено биоэтическим комитетом НИИ медицинской генетики ТНИМЦ. При сборе материала от каждого участника исследования (или его представителя) было получено добровольное информированное согласие.

ДНК для генотипирования выделяли методом фенол-хлороформной экстракции из лейкоцитов венозной крови стандартным методом.

Для репликативного анализа ассоциаций нами было выбрано 30 однонуклеотидных генетических маркеров, для которых была выявлена высокодостоверная ($p \leq 5 \times 10^{-6}$); ассоциация с когнитивными функциями, или БА, или шизофренией по данным полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) или метаанализам [12–31]. Формирование мультиплекса для MALDI-TOF масс-спектрометрии проводилось с использованием Assay Design Suite v2.0 (<https://www.mysequenom.com/Tools>). В результате был сгенерирован мульти-

плекс, содержащий 30 однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) локализованных в 21 гене и 6 межгенных регионах. Краткая характеристика 30 ОНП, формирующих мультиплекс, представлена в табл. 1.

Генотипирование проводили методами мультиплексной ПЦР и масс-спектрометрии MALDI-TOF на платформе Sequenom MassArray 4 (Agena Bioscience, США), как описано ранее [32]. Экспериментальные исследования проведены в Центре коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ). Тестирование равновесия Харди—Вайнберга (РХВ) и расчёт ожидаемой гетерозиготности выполняли общепринятыми методами популяционной биометрии. Сравнение частот аллелей и генотипов в группах проводили с помощью критерия χ^2 . Силу ассоциаций оценивали с использованием показателя отношения шансов OR и его 95% доверительного интервала (95% CI).

Результаты и обсуждение

Три ОНП (*TCF4* rs1261117 и rs17594526, rs4765905 гена *SACNA1C*) были исключены из окончательного анализа в группах больных БА и контроле, потому что они показали значение параметра «call rate» (доля определенных генотипов из всех возможных) меньше 90%. Показатель «call rate» для других маркеров был выше 96%. Распределение генотипов по 3 локусам (*CNTNAP2* rs10273775, *LOC105373605* rs12989701, *DCHS2* rs1466662) не соответствовало РХВ в контрольной группе. В группе больных распределение генотипов по 2 маркерам (rs12125971 межгенного участка *LOC105378889-PRMT6*, rs561655 межгенного участка *PICALM-FNTAP1*) не соответствовало РХВ. Поэтому все пять генетических вариантов были исключены из дальнейшего анализа.

Небольшое отклонение от РХВ по локусам как в группе больных БА, так и в группе контроля может быть объяснено тем, что популяции не являются идеальными и на них действуют факторы популяционной динамики, эффекты которых могут быть разнонаправленны. В группе больных БА отклонение от РХВ может быть также связано с недостаточным количеством образцов в исследованной выборке. Общее количество локусов, в которых наблюдалось отклонение от РХВ, не превышает 10%.

Численности генотипов, частоты минорных аллелей и достигнутый уровень значимости соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при РХВ у больных БА и в контрольной группе представлены в табл. 2.

Для одного из 22 ОНП при сравнении исследованных выборок выявлена статистически значимая ассоциация с БА. Минорный аллель G rs12922317 гена *SNX29* достоверно чаще встречался среди больных БА по сравнению с контрольной группой (OR = 1,57, 95% CI 1,14—2,16, $p = 0,006$). Сравнение отношения шансов развития БА приведены в табл. 3.

Продуктом гена *SNX29* является белок, который относится к семейству сортирующих нексин. Это группа клеточных белков переноса, локализованных в цитоплазме, имеющих общий фосфолипид-связывающий участок. Белки этого семейства могут связывать специфические фосфолипиды и формировать мембранно-ассоциированные белковые комплексы через белок-белковые взаимодействия. Сортирующий нексин 29 присутствует во внеклеточных экзосомах и цитозоле и, по всей видимости, принимает участие в регуляции переноса через мембрану и сортировке белков. Высокий уровень экспрессии этого гена наблюдается в тканях почек, сердца, селезенки [33, 34].

По данным Borglum A.D. с соавторами, которые первыми обнаружили ассоциацию этого полиморфизма в GWAS, связанном с материнской инфекцией цитомегаловирусом у больных шизофренией, аллель G показал статистически достоверную взаимосвязь маркера rs12922317 гена *SNX29* с шизофренией (OR = 1,17, $p = 9,04 \cdot 10^{-7}$) [19]. В цитогенетической работе 2015 года Twa D.D. с соавторами выяснили, что в регионе, где находится ген *SNX29*, происходит перестройка, затрагивающая и соседние гены (*IGHG4*, *FLJ45248*, *RFX3*, *SMARCA2*). В результате этого увеличивается уровень белка-лиганда запрограммированной клеточной смерти (PDL), что приводит к развитию В-клеточной лимфомы яичка [35]. Этот белок является мембранным протеином надсемейства иммуноглобулинов и играет роль в клеточной дифференцировке иммунных клеток. В другой работе при анализе профиля экспрессии генов в эпителиальных клеточных линиях карциномы яичника ген *SNX29* был отмечен как дифференциально экспрессирующийся (DEG) и входил в группу потенциальных DEG, которые, возможно, играют важную роль в процессе метастазирования и химиорезистентности рака яичника [36]. Но данных по ассоциации этого гена с БА в литературе не представлено.

В заключение хочется отметить, что установленная в данной работе статистически достоверная связь аллеля G и генотипа GG полиморфного варианта rs12922317 гена *SNX29* с фенотипом БА у русских, возможно, является общим фактором риска для заболеваний, которые приводят к нарушениям когнитивных функций человека разной степени тяжести, таких, как шизофрения и БА.

Список литературы

1. Яхно НН. Деменции: руководство для врачей. 3-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2011. 272 с.
2. Яхно НН. Когнитивные расстройства в неврологической клинике. Неврол. журн. 2006;11:4-12.
3. Robinson M, Lee BY, Hane FT. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. J Alzheimers Dis. 2017;57(2):317-330. doi: 10.3233/JAD-161149.
4. Sosa-Ortiz AL, Acosta-Castillo I, Prince MJ. Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease. Arch Med Res. 2012;43:600-608.

5. Liu G, Bao X, Jiang Y et al. Identifying the Association Between Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Using Genome-Wide Association Studies and Protein-Protein Interaction Network. *Mol Neurobiol.* 2015;52:1629-1636. doi: 10.1007/s12035-014-8946-8.
6. Witt SH, Streit F, Jungkunz M et al. Genome-wide association study of borderline personality disorder reveals genetic overlap with bipolar disorder, major depression and schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 2017 Jun 20;7(6):e1155. doi: 10.1038/tp.2017.115.
7. Medway C, Morgan K. Review: The genetics of Alzheimer's disease; putting flesh on the bones. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40(2):97-105. doi: 10.1111/nan.12101.
8. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry.* 2015 Jan 1;77(1):43-51. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.05.006.
9. Lord J, Cruchaga C. The epigenetic landscape of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 2014 Sep;17(9):1138-40. doi: 10.1038/nn.3792.
10. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th ed. Washington: American Psychiatric Association; 2010.
11. McKhann G, Drachman D, Folstein M, et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984;34 (7):939-44. doi: 10.1212/wnl.34.7.939.
12. Logue MW, Schu M, Vardarajan BN et al. A comprehensive genetic association study of Alzheimer disease in African Americans. *Archives of Neurology.* 2011 Dec 01;68(12):1569-1579. doi: 10.1001/archneurol.2011.646.
13. Seshadri S, DeStefano AL, Au R et al. Genetic correlates of brain aging on MRI and cognitive test measures: a genome-wide association and linkage analysis in the Framingham Study. *BMC Medical Genetics.* 2007 Sep 19; 8 Suppl 1:S15. doi: 10.1186/1471-2350-8-S1-S15.
14. Shi Y, Li Z, Xu Q et al. Common variants on 8p12 and 1q24.2 confer risk of schizophrenia. *Nature Genetics.* 2011 Oct 30;43(12):1224-1227. doi: 10.1038/ng.980.
15. Kirov G, Zaharieva I, Georgieva L et al. A genome-wide association study in 574 schizophrenia trios using DNA pooling. *Mol Psychiatry.* 2009 Aug;14(8):796-803. doi: 10.1038/mp.2008.33.
16. Bergen SE, O'Dushlaine CT, Ripke S et al. Genome-wide association study in a Swedish population yields support for greater CNV and MHC involvement in schizophrenia compared with bipolar disorder. *Molecular Psychiatry.* Jun 2012 Jun 12;17(9):880-886. doi: 10.1038/mp.2012.73.
17. Loo SK, Shtir C, Doyle AE et al. Genome-wide association study of intelligence: additive effects of novel brain expressed genes. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry.* 2012 Feb 28;51(4):432-440.e2. doi: 10.1016/j.jaac.2012.01.006.
18. Aberg KA, Liu Y, Bukszar J et al. A comprehensive family-based replication study of schizophrenia genes. *JAMA Psychiatry.* 2013 Jun 01;70(6):573-581. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2013.288.
19. Buurglum A, Demontis D, Grove J et al. Genome-wide study of association and interaction with maternal cytomegalovirus infection suggests new schizophrenia loci. *Mol Psychiatry.* 2014;19:325-333.
20. Hu X, Pickering E, Liu YC et al. Meta-analysis for genome-wide association study identifies multiple variants at the BIN1 locus associated with late-onset Alzheimer's disease. *PloS one.* 2011 Feb 24;6(2):e16616. doi: 10.1371/journal.pone.0016616.
21. Kamboh MI, Barmada MM, Demirci FY et al. Genome-wide association analysis of age-at-onset in Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry.* 2012;17(12):1340-1346. doi: 10.1038/mp.2011.135.
22. Naj AC, Jun G, Beecham GW et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics.* 2011 Apr 03;43(5):436-441. doi: 10.1038/ng.801.
23. Yue WH, Wang HF, Sun LD et al. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for schizophrenia in Han Chinese at 11p11.2. *Nature Genetics.* 2011 Oct 30;43(12):1228-1231. doi: 10.1038/ng.979.
24. Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet.* 2011;43(10):969-976. doi: 10.1038/ng.940.
25. International Schizophrenia Consortium, Purcell SM, Wray NR et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature.* 2009 Jul 01;460(7256):748-752. doi: 10.1038/nature08185.
26. Bertram L, Lange C, Mullin K et al. Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *American Journal of Human Genetics.* 2008 Oct 630;83(5):623-632. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.10.008.
27. Athanasiu L, Mattingsdal M, Kahler AK et al. Gene variants associated with schizophrenia in a Norwegian genome-wide study are replicated in a large European cohort. *Journal of Psychiatric Research.* 2010 Feb 24;44(12):748-753. doi: 10.1016/j.jpsychires.2010.02.002.
28. He L, Kernogitski Y, Kulminkaya I et al. Pleiotropic Meta-Analyses of Longitudinal Studies Discover Novel Genetic Variants Associated with Age-Related Diseases. *Frontiers in Genetics.* 2016 Oct 13; 7:179.
29. Cummings AC, Jiang L, Velez Edwards DR et al. Genome-wide association and linkage study in the Amish detects a novel candidate late-onset Alzheimer disease gene. *Annals of Human Genetics.* 2012 Sep 01;76(5):342-351. doi: 10.1111/j.1469-1809.2012.00721.x.
30. Abraham R, Moskvina V, Sims R et al. A genome-wide association study for late-onset Alzheimer's disease using DNA pooling. *BMC Medical Genomics.* 2008 Sep 29;1:44. doi: 10.1186/1755-8794-1-44.
31. Shifman S, Johannesson M, Bronstein M et al. Genome-wide association identifies a common variant in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women. *PLoS Genetics.* 2008 Feb 01;4(2):e28. doi: 10.1371/journal.pgen.0040028.
32. Степанов ВА, Трифонова ЕА. Мультиплексное генотипирование однонуклеотидных полиморфных маркеров методом MALDI-TOF масс-спектрометрии: частоты 56 SNP в генах иммунного ответа в популяциях человека. *Молекуляр. биология.* 2013;(47):976-986. (Stepanov VA, Trifonova EA. Multiplex genotyping of single nucleotide polymorphisms by MALDI-TOF mass-spectrometry: frequencies of 56 SNP in immune response genes in human populations. *Mol. Biol. (Mosk.).* 2013;(47):952-962.)
33. Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2014 Feb;13(2):397-406. doi: 10.1074/mcp.M113.035600.
34. Szabo L, Morey R, Palpant NJ et al. Statistically based splicing detection reveals neural enrichment and tissue-specific induction of circular RNA during human fetal development. *Genome Biol.* 2015 Jun 16;16:126. doi: 10.1186/s13059-015-0690-5.
35. Twa DD, Mottok A, Chan FC et al. Recurrent genomic rearrangements in primary testicular lymphoma. *J. Pathol.* 2015;236(2):136-41. doi:10.1002/path.4522.
36. Zhu L, Hu Z, Liu J et al. Gene expression profile analysis identifies metastasis and chemoresistance-associated genes in epithelial ovarian carcinoma cells. *Med. Oncol.* 2015;32(1):426. doi: 10.1007/s12032-014-0426-5.

Ассоциация гена аполипопротеина E с вариабельностью когнитивных способностей пожилых людей

Марусин А.В.^{1*}, Макеева О.А.^{1,3}, Вагайцева К.В.^{1,2}, Бочарова А.В.¹,
Сваровская М.Г.¹, Салахов Р.Р.⁴, Степанов В.А.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

³ Центр клинических исследований «Неббиоло», г. Томск

⁴ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово

Физиологические изменения мозга при естественном старении и развитие деменции имеют общую генетическую основу, что делает актуальным поиск генетических вариантов, разграничивающих естественное снижение когнитивных способностей с возрастом и деменцией альцгеймеровского типа. Цель — поиск взаимосвязи двух полиморфных вариантов (rs429358 и rs7412) гена *APOE* и их белковых изоформ (apoE) с вариабельностью когнитивных функций пожилых людей, определяемых по общему баллу Монреальской шкалы оценки когнитивных функций (MoCA). Исследование выполнено на группе из 695 пожилых людей (177 мужчин и 518 женщин), у которых проведена оценка когнитивного статуса с помощью батареи тестов MoCA. Генотипирование осуществлено методом ПЦР в режиме реального времени с использованием TaqMan проб. Поиск ассоциаций генотипической изменчивости с признаком проведён непараметрическими методами Краскела — Уоллиса и медианного теста. Показано, что наибольшее влияние на риск пониженных когнитивных способностей в пожилом возрасте оказывают аллель rs429358*С (OR = 1,51; 95% CI 1,09 – 2,10; $\chi^2 = 6,66$; p = 0,01) и белковые гаплотипы $\epsilon 4/\epsilon 4 + \epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4$ (OR = 1,64; 95% CI (1,11 – 2,44); $\chi^2 = 6,76$; p = 0,009). Вероятно, выявленные ассоциации свидетельствуют о наличии общих генов и механизмов наследования деменции с нормальной вариабельностью когнитивных функций.

Ключевые слова: когнитивные способности, генетический полиморфизм, аполипопротеин E, ассоциации, подверженность, пожилые люди.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00020).

Association of apolipoprotein E gene polymorphism with cognitive abilities variability of elderly people

Marusin A.V.¹, Makeeva O.A.^{1,3}, Vagaytseva K.V.^{1,2}, Bocharova A.V.¹,
Swarovskaya M.G.¹, Salakhov R.R.⁴, Stepanov V.A.^{1,2}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk

² National Research Tomsk State University, Tomsk

³ Center for Clinical Research «Nebbiolo», Tomsk

⁴ Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo

Physiological changes in the brain with natural aging and the development of dementia have a common genetic basis, which makes it important to search for genetic variants that delineate the natural decline in cognitive abilities with age and dementia of the Alzheimer's type. Objective: the search for the relationship between two polymorphic variants (rs429358 and rs7412) APOE gene and their protein isoforms (apoE) with the variability of cognitive functions in the elderly, determined by Montreal Cognitive Assessment (MoCA) total score. The study was performed on a group of 695 elderly people (177 men and 518 women) tested by a battery of MoCA tests. Genotyping was carried out by real-time PCR using TaqMan probes. The analysis of genotypic variability associations with the nominal trait was performed by the Kruskal-Wallis and the median test nonparametric methods. It was shown that the rs429358*С allele carriers and protein isoforms $\epsilon 4/\epsilon 4 + \epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4$ carriers in comparison with the $\epsilon 3/\epsilon 3$ homozygous have the greatest risk of decreased cognitive abilities in old age (OR (95% CI) was 1.51 (1.09 – 2.10), $\chi^2 = 6.66$, p = 0.01 and OR = 1.64, 95% CI (1.11 – 2.44), $\chi^2 = 6.76$, p = 0.009, respectively). Probably, the revealed associations indicate to the presence of common genes and mechanisms for dementia and intellect with normal variability of cognitive functions inheritance.

Key words: cognitive abilities, genetic polymorphism, apolipoprotein E, associations, susceptibility, elderly people.

Введение

Аполипопротеин Е (apoE) является одним из ключевых белков метаболизма липопротеидов и холестерина, участвует в образовании и секреции липопротеинов [1]. Предполагается, что белок участвует в дифференцировке и росте клеток, а также в репарации и регенерации тканей [2].

Ген *APOE* (OMIM *107741) содержит 3 интрона и 4 экзона, расположен в участке 19q13.32, геномные координаты (GRCh38): 19:44,905,748-44,909,394. Методом изоэлектрофокусирования выявляются три изоформы apoE: apoE2, apoE3 и apoE4, которые отличаются аминокислотными заменами в положениях Cys112Arg и Arg158Cys и определяются двумя однонуклеотидными полиморфными вариантами (SNP) rs429358 и rs7412. Изоформы apoE2, -E3 и -E4, кодируются тремя аллелями: ε2 или *APOE*2* Cys112/Cys158 (rs429358*T/rs7412*T); ε3 или *APOE*3* Cys112/Arg158 (rs429358*T/rs7412*C) и ε4 или *APOE*4* Arg 112/Arg158 (rs429358*C/rs7412*C). Аллель ε3 наиболее распространен в мировых популяциях [3]. Теоретически возможный аллель Arg112/Cys158 (rs429358*C/rs7412*T) не наблюдается. С точки зрения эволюционной истории аллель *APOE*4* является предковым, а повышение частоты аллеля *APOE*3* произошло за последние 200 000 лет [4].

Corbo and Scacchi (1999) проанализировав распределение аллелей *APOE* в мире, отмечают, что аллель *APOE*3* является наиболее частым во всех группах людей, особенно в популяциях с давно развитой сельскохозяйственной экономикой, где частота аллеля составляет 0,849–0,898. Частота предкового аллеля *APOE*4* остается выше в популяциях пигмеев (0,407) и койсанов (бушменов) (0,370), аборигенов Малайзии (0,240) и Австралии (0,260), папуасов (0,368), некоторых коренных американцев (0,280) и саамов (0,1010), где все еще существует экономия питания или продовольственное снабжение скудно и доступно спорадически (по крайней мере, так было незадолго до публикации исследования). Частота *APOE*2* колеблется без видимых причин (0,145–0,02), он отсутствует у коренных американцев. Corbo и Scacchi (1999) предположили, что аллель *APOE*4*, благодаря своим функциональным свойствам, может быть «экономным» аллелем. Взаимодействие *APOE*4* с условиями окружающей среды (западный стиль питания, длительный период жизни), возможно, сделало этот вариант аллелем восприимчивости к болезням коронарных артерий и Альцгеймера. Отсутствие ассоциации *APOE*4* с любым из этих расстройств у африканцев, проживающих к югу от Сахары и наличие ассоциации у афроамериканцев, вероятно, подтверждает эту гипотезу [5].

К настоящему времени, на основании данных широкого геномных исследований ассоциаций (GWAS) и поиска ассоциаций с использованием анализа кандидатных генов, установлено, что полиморфные варианты *APOE* являются факторами риска сердечно-сосудистых забо-

леваний, болезни Альцгеймера (БА), вносят вклад в феномен долгожительства [6–11].

Недавние исследования, проведенные в НИИ медицинской генетики (г. Томск), показывают, что генетические основы интеллекта, когнитивных функций, поведенческих (БА) и психических (шизофрения) расстройств частично пересекаются [12–14]. Предполагается, что физиологические изменения мозга при естественном старении и развитие деменции имеют общую генетическую основу, что делает актуальным поиск генетических вариантов, разграничивающих естественное снижение когнитивных способностей с возрастом и деменцией альцгеймеровского типа.

Монреальская шкала оценки когнитивных функций (MoCA, от англ. Montreal Cognitive Assessment) была разработана как средство быстрой оценки при умеренной когнитивной дисфункции. Она оценивает различные когнитивные сферы: внимание и концентрацию, исполнительные функции, память, язык, зрительно-конструктивные навыки, абстрактное мышление, счет и ориентацию. Время для проведения MoCA составляет примерно 10 минут. Максимально возможное количество баллов — 30; 26 баллов и более считается нормальным (цит. по [15, 16]). В недавнем исследовании Davis D.H.J. с соавт. при анализе использования MoCA для диагностики БА и других форм деменции показана высокая чувствительность (>94%) и низкая специфичность (<66%) данного подхода. Авторы заключают, что накопленного к настоящему времени общего качества и количества информации недостаточно, чтобы давать рекомендации о клинической полезности теста MoCA для выявления слабоумия в разных условиях [17].

Цель исследования — поиск взаимосвязи двух полиморфных вариантов (rs429358 и rs7412) гена *APOE* и их белковых гаплотипов (apoE) с вариабельностью когнитивных функций пожилых людей, определяемых по общему баллу MoCA.

Материалы и методы

Исследование выполнено на группе из 695 пожилых людей (177 мужчин и 518 женщин), у которых проведена оценка когнитивного статуса с помощью батареи тестов MoCA [18]. Данные о выборке сведены в табл. 1. Возраст в выборке варьировал от 57 до 90 лет. Не выявлено межполовых отличий по суммарному баллу MoCA, возрасту, систолическому и диастолическому давлению, частоте сердечных сокращений.

Наблюдаются различия мужчин и женщин по росту, весу, индексу массы тела (ИМТ) и уровню образования (количеству лет, потраченных на образование в годах). При этом по ИМТ различия отмечены не только для средних значений, но и для дисперсий признака у мужчин и женщин по Лэвене-тесту ($p = 0,007$). Для того чтобы учесть возможные влияния межполовой изменчиво-

сти по ИМТ и уровню образования, были использованы непараметрические методы анализа связи суммарного балла МоСА с генетической вариабельностью *APOE*.

Выделение ДНК проводили фенол-хлороформным методом. Генотипирование осуществлено методом ПЦР в режиме реального времени с использованием TaqMan проб фирмы Applied Biosystems (США) по протоколу производителя.

Проверка соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди—Вайнберга (РХВ) выполнена с использованием критерия χ^2 К. Пирсона [19]. Поиск ассоциаций генотипической изменчивости с общим показателем когнитивных функций (МоСА) проводили непараметрическими методами Краскела — Уоллиса и медианного теста.

При раздельном исследовании SNP rs429358 и rs7412 использовано четыре вида анализа наследуемости:

а) кодоминантный, когда оба аллеля (1, 2) влияют на фенотип (тестируются три генотипа в двухаллельной системе, 11 : 12 : 22);

б) доминантный — минорный (редкий) аллель в гомо- и гетерозиготном состоянии тестируется против распространенного аллеля (11 : 12+22);

с) рецессивный — редкий аллель в гомозиготном состоянии тестируется против распространенного аллеля в гомо- и гетерозиготном состоянии (11+12 : 22);

д) сверхдоминирование — гомозиготы против гетерозигот (11+22 : 12).

Расчёты проведены в пакете статистических программ «Statistica 6.0». Принят 5% уровень значимости.

Анализ ассоциаций белковых генотипов apoE с МоСА осуществлён по 6 вариантам:

1) все 6 возможных генотипов ($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 4$);

2) носители аллеля (-ей) $\epsilon 2$ против всех остальных ($\epsilon 2/\epsilon 2 + \epsilon 2/\epsilon 3 + \epsilon 2/\epsilon 4 : \epsilon 3/\epsilon 3 + \epsilon 4/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4$);

3) носители аллеля (-ей) $\epsilon 4$ против всех остальных ($\epsilon 4/\epsilon 4 + \epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4 : \epsilon 2/\epsilon 2 + \epsilon 2/\epsilon 3 + \epsilon 3/\epsilon 3$);

4) гомозиготы $\epsilon 3/\epsilon 3$ против всех остальных ($\epsilon 3/\epsilon 3 : \epsilon 4/\epsilon 4 + \epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4 + \epsilon 2/\epsilon 2 + \epsilon 2/\epsilon 3$);

5) гомозиготы $\epsilon 3/\epsilon 3$ против носителей аллеля (-ей) $\epsilon 2$ ($\epsilon 3/\epsilon 3 : \epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 2/\epsilon 2 + \epsilon 2/\epsilon 3$);

6) гомозиготы $\epsilon 3/\epsilon 3$ против носителей аллеля (-ей) $\epsilon 4$ ($\epsilon 3/\epsilon 3 : \epsilon 4/\epsilon 4 + \epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4$).

Расчёт отношения шансов (OR) и 95% доверительно-го интервала (95% CI) по дизайну случай-контроль выполнен путём сравнения двух групп со значениями общего балла МоСА выше или равным медиане ($Me \geq 23$) и ниже медианы ($Me < 23$) [20].

Результаты и обсуждение

Частоты и количество аллелей, генотипов, соответствие их распределения РХВ, ожидаемая гетерозиготность полиморфных вариантов rs429358 и rs7412 гена *APOE*, а также средние, медианные, минимальные и максимальные значения суммы баллов теста МоСА для генотипов представлены в табл. 2. Наблюдается близкое к статистически значимому отклонение частот генотипов от РХВ по полиморфному варианту rs7412 за счёт недостатка гетерозигот (отклонение наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой $D = -0,065 \pm 0,046$; $p = 0,088$). Возможно, это обусловлено стохастическими причинами, вследствие низкой частоты аллеля T — 7,5%.

В табл. 3 показаны результаты раздельного анализа связи полиморфных вариантов rs429358 и rs7412 с общим баллом МоСА при тестировании четырёх вариантов наследования: кодоминантный, доминантный, рецессивный и сверхдоминирование.

Наиболее высокая статистически значимая ассоциация обнаружена для rs429358 при аутосомно-доминант-

Таблица 1

Общие данные о структуре выборки

№	Признак	Мужчины (177)	Женщины (518)	Всего (695)	p
1	Возраст (лет)	71,7 ± 6,0	71,8 ± 5,6	71,8 ± 5,7	0,782
2	Рост (см)	170,9 ± 6,6	157,8 ± 6,3	161,2 ± 8,6	<10 ⁻⁶
3	Вес (кг)	80,0 ± 13,5	73,3 ± 13,2	75,0 ± 13,6	<10 ⁻⁶
4	ИМТ	27,3 ± 4,1	29,4 ± 4,9	28,9 ± 4,8	10 ⁻⁶
5	СД	140,9 ± 20,7	141,7 ± 21,9	141,5 ± 21,6	0,695
6	ДД	80,2 ± 12,8	79,3 ± 12,1	79,6 ± 12,3	0,434
7	ЧСС	71,4 ± 10,8	72,3 ± 9,8	72,1 ± 10,1	0,326
8	Ур. обр. (лет)	14,3 ± 3,2	13,0 ± 3,1	13,3 ± 3,1	10 ⁻⁶
9	МоСА	21,8 ± 4,2	22,2 ± 3,8	22,1 ± 3,9	0,184

Примечание. В таблице приведены данные однофакторного дисперсионного анализа (ОФДА) межгрупповых отличий мужчин и женщин. В скобках указан объём выборки, показаны средние значения и стандартные отклонения признака. Ур. обр. — общее количество лет, потраченных на получение образования в годах; p — достигнутый уровень значимости F критерия Фишера для ОФДА.

ном типе наследования по обоим тестам (табл. 3). У носителей генотипа ТТ среднее значение и стандартное отклонение суммы баллов МоСА составило $22,37 \pm 3,79$ (Me = 23), а у носителей генотипов СС + СЕ — $21,39 \pm 4,21$ (Me = 22). Это свидетельствует о снижении

когнитивных способностей пожилых людей, носителей аллеля С, в среднем на один балл.

Отношение шансов (OR) и 95% доверительный интервал (95% CI) имеют сниженные когнитивные способности (Me < 23) в пожилом возрасте для носителей geno-

Таблица 2

Общая характеристика полиморфных вариантов rs429358 и rs7412 гена APOE и значения суммы баллов теста МоСА для генотипов (N = 695)

Генотип/аллель	Количество	%	Hexp	χ^2	p	МоСА, среднее	Me (Min – Max)
rs429358							
Генотип ТТ	530	76,26				22,37	23 (7 – 30)
Генотип СТ	151	21,73	22,44	0,70	0,403	21,40	22 (6 – 30)
Генотип СС	14	2,01				21,21	22 (14 – 27)
Аллель Т	1211	87,12					
Аллель С	179	12,88					
rs7412							
Генотип СС	598	86,04				22,09	23 (6 – 30)
Генотип СТ	90	12,95	13,84	2,90	0,088	22,53	23 (14 – 30)
Генотип ТТ	7	1,01				20,86	22 (11 – 25)
Аллель С	1286	92,52					
Аллель Т	114	7,48					

Примечание. Медианные (Me), минимальные (Min) и максимальные (Max) значения суммы баллов теста МоСА; χ^2 , p – значения критерия и достигнутый уровень значимости соответствия РХВ.

Таблица 3

Анализ связи полиморфных вариантов rs429358 и rs7412 с общим баллом МоСА

Полиморфизм	CoD		AD		AR		OD	
	K-W	me	K-W	me	K-W	me	K-W	me
rs429358	0,017	0,016	0,005	0,013	0,328	0,040	0,009	0,064
rs7412	0,658	0,776	0,731	0,693	0,462	0,501	0,566	0,835

Примечание. В таблице приведены достигнутые уровни значимости ассоциаций генотипической изменчивости двух полиморфных вариантов APOE с МоСА по тесту Краскела–Уоллиса (K-W) и медианному тесту (me). Анализ выполнен для четырёх вариантов наследования: кодоминатный (CoD), аутомно-доминантный (AD), аутомно-рецессивный (AR) и сверхдоминирование (OD). Полужирным шрифтом выделены достигнутые уровни значимости менее 5%.

Таблица 4

Общая структура выборки по генотипам apoE и значениям общих баллов МоСА

№	Генотип	Количество	%	МоСА	Me (Min – Max)
1	$\epsilon 3/\epsilon 3$	453	65,18	$22,36 \pm 3,82$	23 (7 – 30)
2	$\epsilon 3/\epsilon 4$	131	18,85	$21,24 \pm 4,35$	22 (6 – 29)
3	$\epsilon 2/\epsilon 3$	70	10,07	$22,56 \pm 3,48$	23 (14 – 29)
4	$\epsilon 4/\epsilon 4$	14	2,01	$21,21 \pm 3,87$	22 (14 – 27)
5	$\epsilon 2/\epsilon 4$	20	2,88	$22,45 \pm 3,41$	22 (17 – 30)
6	$\epsilon 2/\epsilon 2$	7	1,01	$20,86 \pm 4,67$	22 (11 – 25)
7	Все	695	100	$22,13 \pm 3,91$	23 (6 – 30)

Примечание. В таблице приведены численности и частоты 6 генотипов apoE, средние значения, стандартные отклонения, медианы, минимальные и максимальные значения суммарного балла МоСА.

типов СС и СТ составляют 1,59 и 1,10–2,30 ($\chi^2 = 6,77$; $p = 0,009$). Для аллеля rs429358*С OR (95% CI) равен 1,51 (1,09 – 2,10; $\chi^2 = 6,66$; $p = 0,01$).

Для полиморфного варианта rs7412 не выявлено статистически значимых ассоциаций с общим баллом МоСА ни по одному варианту наследования признака.

Анализ ассоциаций белковых генотипов apoE выполнен по 6 вариантам (см. разд. «Материалы и методы»). В табл. 4 представлены средние значения, стандартные отклонения, медианы, минимальные и максимальные значения суммарного балла МоСА и численности всех 6 возможных генотипов apoE.

Не показано статистически значимой ассоциации 6 генотипов apoE со значениями суммарного балла МоСА ни по методу Краскела — Уоллиса ($p = 0,096$), ни по медианному тесту ($p = 0,104$). Однако параметрическим методом ОФДА Р. Фишера получено значение близкое к статистически значимому ($F = 2,17$; $p = 0,056$). При этом дисперсии признака в группах гомогенны по тесту Лавене ($p = 0,361$). То есть, различия обусловлены средними значениями признака в группах, а не разбросом внутригрупповых данных.

Из 4 таблицы видно, что минимальное среднее значение суммарного балла МоСА, минимумы минимального и максимального значений теста (11–25) показаны для генотипа $\epsilon 2/\epsilon 2$. Не выявлено статистически значимой связи данного белкового варианта при тестировании OR снижения когнитивных способностей против всех остальных генотипов.

Анализ носителей аллеля $\epsilon 2$ против всех остальных генотипов ($\epsilon 2/\epsilon 2 + \epsilon 2/\epsilon 3 + \epsilon 2/\epsilon 4 : \epsilon 3/\epsilon 3 + \epsilon 4/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4$) также не показал статистически значимой ассоциации (по Краскелу — Уоллису $p = 0,731$; по медианному тесту $p = 0,693$). Ранее было показано, что изоформа APOE $\epsilon 2$ приводит к наследственной гиперхолестеролемии III типа (OMIM 67347) [21], гипертриглицеридемии и алкогольному циррозу печени с ранним проявлением [22], инвалидизацией (нарушением инструментальной деятельности) у мужчин [23].

Обнаружена ассоциация аллеля $\epsilon 4$ с риском снижения когнитивных способностей в пожилом возрасте ($\epsilon 4/\epsilon 4 + \epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4 : \epsilon 2/\epsilon 2 + \epsilon 2/\epsilon 3 + \epsilon 3/\epsilon 3$; $p = 0,005$ и $0,013$ для Краскела — Уоллиса и медианного тестов соответственно). Носители аллеля $\epsilon 4$ обладают в среднем пониженным значением суммарного балла МоСА. Этот аллель является предрасполагающим к инфаркту миокарда [8], БА [9, 24], неблагоприятен для достижения возраста долгожительства в абхазской популяции [10], и в то же время его носители проявляют сниженные когнитивные способности в пожилом возрасте ($21,39 \pm 4,21$ и $22,37 \pm 3,79$ у носителей $\epsilon 4$ против остальных генотипов соответственно).

В среднем повышенные когнитивные способности показаны у носителей наиболее распространенного генотипа $\epsilon 3/\epsilon 3$ (65,18%) по сравнению со всеми остальными

ми ($22,36 \pm 3,82$ и $21,71 \pm 4,04$; $p = 0,028$ и $0,021$ для Краскела — Уоллиса и медианного тестов, соответственно). У индивидов, не являющихся носителями генотипа $\epsilon 3/\epsilon 3$, OR иметь сниженные когнитивные способности в пожилом возрасте составляет 1,39 при 95% CI 1,00–1,92 ($\chi^2 = 4,23$; $p = 0,040$).

Далее было проанализировано, какие аллели apoE по сравнению с $\epsilon 3/\epsilon 3$ оказывают большее влияние на риск сниженных когнитивных способностей в пожилом возрасте (варианты 5 и 6, см. разд. «Материалы и методы»).

В результате тестирования генотипа $\epsilon 3/\epsilon 3$ против носителей $\epsilon 2$ ($\epsilon 3/\epsilon 3 : \epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 2/\epsilon 2 + \epsilon 2/\epsilon 3$) не выявлено статистически значимой ассоциации ($p = 0,782$ и $0,370$ для Краскела — Уоллиса и медианного тестов соответственно). Показано, что носительство аллеля $\epsilon 4$ в большей степени повышает риск пониженных когнитивных способностей в пожилом возрасте ($\epsilon 3/\epsilon 3 : \epsilon 4/\epsilon 4 + \epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4$; $p = 0,005$ и $0,013$ для Краскела — Уоллиса и медианного тестов соответственно; OR = 1,64; 95% CI (1,11–2,44); $\chi^2 = 6,76$; $p = 0,009$).

Как и в настоящем исследовании, негативный эффект на скорость восприятия и эпизодическую память у носителей аллеля $\epsilon 4$ выявлен в популяционной выборке из 2694 пожилых индивидов (60–102 года) без деменции [25]. Кроме того, в этом исследовании более высокий возраст ассоциирован с более сильным генетическим эффектом APOE на общие когнитивные способности (global cognition). Однако этот эффект взаимодействия был частично обусловлен наличием доклинических случаев деменции в изученной выборке. При исключении будущих случаев деменции, влияние APOE на эпизодическую память и глобальное мышление было ослаблено. Авторы предполагают, что часть эффектов APOE на эффективность когнитивной деятельности в старости может быть обусловлена процессами, связанными с деменцией.

Тем не менее, данные о влиянии аллеля $\epsilon 4$ на когнитивные способности пожилых людей без деменции противоречивы. Так, не было обнаружено влияния данного аллеля на кратко- и долгосрочную эпизодическую память, скорость восприятия, внимание и исполнительные функции в выборке 213 человек без деменции (>60 лет) из Бразилии [26].

В другом, австрийском исследовании двух групп пожилых людей с умеренными когнитивными нарушениями и здорового контроля (131 и 764 человека) на протяжении 3 лет при сравнении носителей аллеля $\epsilon 4$ с остальными генотипами выявлено, что в здоровой группе контроля в течение 36 месяцев наблюдается умеренное ускорение спада параметра вербальной эпизодической памяти. В группе с умеренными когнитивными нарушениями обнаружен повышенный спад когнитивных способностей по целому ряду когнитивных задач, предположительно отражающих ранние когнитивные признаки БА. Учитывая длительный продромальный период

этого заболевания, авторы делают вывод, что полученные данные воздействия $\epsilon 4$ -фенотипа в большей мере объясняются периодом, предшествующем БА с поздним началом. То есть, возрастное снижение когнитивных способностей (cognitive ageing) не зависит от аллеля $\epsilon 4$ [27].

Таким образом, при изучении вклада аллеля $\epsilon 4$ *APOE* в снижение когнитивных способностей в пожилом возрасте к настоящему времени нельзя сделать однозначного вывода о его природе. Либо он обусловлен накапливающимися процессами развития деменции, либо так называемой «доброкачественной старческой забывчивостью» или, иными словами, физиологическими инволютивными изменениями, представляющими собой вариант возрастной нормы.

Для российской популяции также показано влияние аллеля $\epsilon 4$ *APOE* у родственников больных БА как на когнитивные способности (на уровне тенденции), так и на особенности характера в пределах клинической нормы [28]. При проведении сравнительного анализа частоты и характера психических нарушений когнитивного и некогнитивного спектра у 110 детей и 24 sibсов пациентов с БА в зависимости от генотипа apoE была установлена более высокая частота носителей аллеля $\epsilon 4$ среди родственников 1-й степени родства лиц с БА по сравнению с российской популяцией. Не обнаружено статистически значимых различий в частоте синдрома мягкого когнитивного снижения (МСИ), психоорганического синдрома и депрессивных реакций дезадаптации у родственников пациентов с БА в зависимости от Apo-генотипа. Частота признаков, свидетельствующих о конституциональной недостаточности когнитивного функционирования, не имела статистически значимой ассоциации с наличием аллеля $\epsilon 4$, однако выявлена тенденция к их большей частоте у носителей $\epsilon 4$ -аллеля. В группе детей личностная акцентуация по возбудимому и тревожно-мнительному типу статистически значимо ассоциировалась с генотипом $\epsilon 4$ /*, тогда как нормотимический тип личности и реакции раздражительной слабости — с его отсутствием. В группе sibсов статистически достоверная корреляция с $\epsilon 4$ /* установлена только для низкого уровня успеваемости в школе [цит. по: 28].

Заключение

Таким образом, в ходе проведённого анализа взаимосвязи двух полиморфных вариантов (rs429358 и rs7412) гена *APOE* и с вариабельностью когнитивных функций пожилых людей, определяемых по общему баллу MoCA, показано, что наибольшее влияние на риск пониженных когнитивных способностей в пожилом возрасте оказывают аллель rs429358*C и белковые гаплотипы $\epsilon 4/\epsilon 4 + \epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4$.

Вероятно, выявленные ассоциации свидетельствуют о перекрывающейся (общей) генетической природе на-

следования психотических расстройств личности, деменции и интеллекта с «доброкачественными возрастными когнитивными нарушениями».

Список литературы

1. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanded role in cell biology. *Science*. 1988;240:622-630.
2. Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, et al. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron*. 1993;11:575-580.
3. <http://omim.org/entry/107741>
4. Fullerton, SM, Clark AG, Weiss KM, et al. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 2000;67:881-900.
5. Corbo, RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world: is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann. Hum. Genet.* 1999;63:301-310.
6. Zhang C, Pierce BL. Genetic susceptibility to accelerated cognitive decline in the US Health and Retirement Study. *Neurobiol Aging*. 2014 Jun;35(6):1512.e11-8. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.021. Epub 2013 Dec 26.
7. Soerensen M, Dato S, Tan Q, et al. Evidence from case-control and longitudinal studies supports associations of genetic variation in APOE, CETP, and IL6 with human longevity. *Age (Dordr)*. 2013 Apr;35(2):487-500. DOI: 10.1007/s11357-011-9373-7. Epub 2012 Jan 12.
8. Konialis C, Spengos K, Iliopoulos P, et al. The APOE E4 Allele Confers Increased Risk of Ischemic Stroke Among Greek Carriers. *Adv Clin Exp Med*. 2016 May-Jun;25(3):471-8. DOI: 10.17219/acem/38841.
9. Han Z, Huang H, Gao Y, Huang Q. Functional annotation of Alzheimer's disease associated loci revealed by GWAS. *PLoS One*. 2017 Jun 26;12(6):e0179677. DOI: 10.1371/journal.pone.0179677. eCollection 2017.
10. Спицын ВА, Макаров СВ, Квеквескири КБ, Самохин АС, Бец ЛВ, Бычкова ЛС, Спицына НХ. К генетическому исследованию феномена долгожительства на примере анализа абхазской популяции; Полиморфизм APOE. *Медицинская генетика*. 2015;14(1):32-35.
11. Салахов РР, Макеева ОА, Голубенко МВ, Барбараш ОЛ, Пузырев ВП. Ассоциации полиморфизма генов TOMM40 и APOE с количественными фенотипами сердечно-сосудистой системы в популяции русских Сибирского региона. *Медицинская генетика*. 2016;15(5):24-27.
12. Степанов ВА., Бочарова АВ, Марусин АВ и др. Репликативный анализ ассоциаций генетических маркеров когнитивных признаков с болезнью Альцгеймера в Российской популяции. *Молекулярная биология*. 2014;48(6):952-962
13. Степанов ВА, Бочарова АВ, Садуакасова КЗ и др. Репликативное исследование подверженности шизофрении с ранним началом у казахов. *Генетика*, 2015;51(2):227-235
14. Бочарова АВ, Степанов ВА, Марусин АВ и др. Анализ ассоциаций генетических маркеров шизофрении и ее когнитивных эндотипов. *Генетика*. 2017;53(1):100-108.
15. <https://newpsyhelp.ru/index.php/clinical-scales/135-moca.html>
16. Nasreddine ZS, Phillips NA., Bedirian V, et al. The Montreal Cognitive Assessment (MoCA): A Brief Screening Tool For Mild Cognitive Impairment. *J Am Geriatr Soc* 2005;53(4):695-696. DOI: 10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x. PMID: 15817019.
17. Davis DHJ, Creavin ST, Yip JLY, et al. Montreal Cognitive Assessment for the diagnosis of Alzheimer's disease and other de-

mentias. Cochrane Database of Systematic Reviews 2015, Issue 10. Art. No.: CD010775. DOI: 10.1002/14651858.CD010775.pub2.

18. Makeeva O, Markova V, Zhukova I, et al. Montreal Cognitive Assessment (MoCA) population-based study of Russian elderly. *Alzheimer's and Dementia*. 2012;8(4):S773.

19. Вейр Б. Анализ генетических данных. М.: Мир, 1995. 400 с.

20. Cornfield J A Method for Estimating Comparative Rates from Clinical Data. Applications to Cancer of the Lung, Breast, and Cervix. *Journal of the National Cancer Institute*. 1951;11:1269-1275.

21. <http://omim.org/entry/617347>

22. Hernandez-Nazara ZH, Ruiz-Madrigal B, Martinez-Lopez E, Roman S, Panduro A. Association of the epsilon 2 allele of APOE gene to hypertriglyceridemia and to early-onset alcoholic cirrhosis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008 Apr;32(4):559-566. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2007.00607.x. Epub 2008 Jan 30.

23. Kulminski A, Ukraintseva SV, Arbeev KG, et al. Association between APOE epsilon 2/epsilon 3/epsilon 4 polymorphism and disability severity in a national long-term care survey sample. *Age Age-*

ing. 2008 May;37(3):288-93. DOI: 10.1093/ageing/afn003. Epub 2008 Feb 4.

24. <http://omim.org/entry/104310>

25. Laukka EJ, Lovden M, Herlitz A, et al. Genetic effects on old-age cognitive functioning: a population-based study. *Psychol Aging*. 2013 Mar;28(1):262-74. DOI: 10.1037/a0030829. Epub 2012 Dec 31.

26. Quintas JL1, Souza VC, Henriques AD, et al. Lack of association between apolipoprotein E genotypes and cognitive performance in the non-demented elderly. *Psychogeriatrics*. 2014 Mar;14(1):11-6. DOI: 10.1111/psyg.12029. Epub 2013 Oct 7.

27. Albrecht MA1, Szoek C2, Maruff P3, Savage G4, et al. Longitudinal cognitive decline in the AIBL cohort: The role of APOE ε4 status. *Neuropsychologia*. 2015 Aug;75:411-9. DOI: 10.1016/j.neuropsychologia.2015.06.008. Epub 2015 Jun 20.

28. Селезнева НД, Гаврилова СИ, Рошина ИФ, Коровайцева ГИ. АРОЕ-генотип и психические нарушения когнитивного и некогнитивного спектра у родственников 1-й степени родства пациентов с болезнью Альцгеймера. *Психиатрия*. 2013;57(1):13-23.

Выявление генетической предрасположенности к латентному течению туберкулезной инфекции

Бабушкина Н.П.* , Брагина Е.Ю., Гараева А.Ф., Гончарова И.А.,
Цитриков Д.Ю., Гомбоева Д.Е., Рудко А.А., Фрейдин М.Б.

ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» Научно-исследовательский институт медицинской генетики, г. Томск, Россия
nad.babushkina@medgenetics.ru

Туберкулез является значимой медико-социальной проблемой в связи с широкой распространенностью, высокой степенью инвалидизации и смертности населения. После инфицирования *M. tuberculosis* у подавляющего большинства развивается латентная туберкулезная инфекция (ЛТБИ), адекватно оценить истинную распространенность которой (по оценкам ВОЗ — это около 30% населения) практически невозможно, поскольку диагностику данного состояния проводят лишь у детей и ВИЧ-инфицированных. Целью настоящего исследования был поиск генетических маркеров, ассоциированных с ЛТБИ. У 70 пациентов с ЛТБИ и 445 индивидов из контрольной выборки изучено 62 однонуклеотидных полиморфизма (SNPs). Ассоциации с ЛТБИ выявлены для трех маркеров: rs2505675 ($p_{perm} = 0,020$), rs958617 ($p_{perm} = 0,019$), rs6676375 ($p_{perm} = 0,021$). С использованием MB-MDR выявлены информативные для оценки риска развития ЛТБИ межлокусные комбинации генотипов, характеризующие возможные межгенные (эпистатические) взаимодействия. Получено 4 двухлокусных ($p < 0,01$) и 5 трехлокусных статистически значимых моделей ($p < 0,001$), включающих 14 SNPs. Детальное рассмотрение полученных моделей позволило для каждой межлокусной комбинации получить от одного до трех сочетаний генотипов, предрасполагающих к развитию ЛТБИ, значения OR для которых составляют от 1,97 до 15,66. Полученные результаты указывают на выраженную роль эпистатических взаимодействий генов при ЛТБИ.

Ключевые слова: латентная туберкулезная инфекция, SNP, генетическая предрасположенность

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ №15-15-00074.

Identification of genetic predisposition to latent tuberculosis infection

Babushkina N.P.* , Bragina E.Yu., Garaeva A.F., Goncharova I.A.,
Tsitrikov D.Yu., Gomboeva D.E., Rudko A.A., Freidin M.B.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Institute of Medical Genetics, Tomsk
* Corresponding author: nad.babushkina@medgenetics.ru

Tuberculosis is a significant medical and social problem due to the high prevalence, high degree of disability and mortality. Latent tuberculosis infection (LTBI) develops in the majority of cases after infection of *M. tuberculosis*. It is almost impossible to estimate exactly the prevalence LTBI (according to WHO — it is about 30% of population), because this condition diagnoses only in children and HIV-infected people. The aim of our study was to determine the genes associated with LTBI. 62 SNPs were analyzed in 70 LTBI patients and 445 healthy donors. Associations with LTBI were identified for three markers: rs2505675 ($p_{perm} = 0.020$), rs958617 ($p_{perm} = 0.019$), rs6676375 ($p_{perm} = 0.021$). Interlocus combinations of genotypes characterizing possible intergenic (epistatic) interactions were revealed for the risk assessment of LTBI by MB-MDR. Four two-locus statistically significant models ($p < 0.01$) and 5 — three-locus models ($p < 0.001$) were obtained including 14 SNPs. Detailed consideration of obtained models allowed for each inter locus combination to get from one to three combinations of genotypes predisposing to the development of LTBI, the OR values for which are from 1.97 to 15.66. Our results indicate that epistatic interactions might play an important role in LTBI.

Key words: latent tuberculosis infection, SNP, genetic predisposition

Введение

Туберкулез (ТБ) является значимой медико-социальной проблемой в связи с широкой распространенностью, высокой степенью инвалидизации и смертности населения. После контакта с *M. tuberculosis* инфицирование происходит у 80–90% индивидов (причем наиболее часто — в детском возрасте). По оценкам ВОЗ в настоящее время ТБ инфицировано около трети населения Земли. Развитие после инфицирования активной

формы ТБ зависит от ряда факторов, наиболее важным из них является иммунный статус индивида. У подавляющего большинства инфицированных развивается латентная туберкулезная инфекция (ЛТБИ) — состояние, при котором бактерии в организме присутствуют, вызывая положительные реакции на туберкулезные аллергены, но полностью отсутствуют клинические и рентгенологические признаки заболевания. То есть, ЛТБИ характеризуется наличием стойкого иммунного ответа на

попавшие ранее в организм антигены *M. tuberculosis*. Примерно у 10% лиц с ЛТБИ в дальнейшем все же развивается активная форма ТБ, причем у 5% заболевание появляется в первый год после инфицирования, и еще у 5% — на протяжении всей жизни [1, 2]. У 90% лиц с ЛТБИ активная форма не развивается, то есть, возможно, что их индивидуальные иммунологические особенности, детерминируемые генетическими факторами, позволяют сдерживать развитие активной формы ТБ. Тем не менее, для профилактики развития клинических проявлений в группах высокого риска (дети до 5 лет и ВИЧ-инфицированные) проводится мониторинг появления новых случаев ЛТБИ с их дальнейшим лечением (с эффективностью 60–90%) [3]. Риск развития серьезных побочных эффектов от лекарственных препаратов (в частности, гепатотоксических эффектов), высокая стоимость лечения, невысокая надежность существующих тестов, этические проблемы делают нецелесообразными диагностику и лечение ЛТБИ у всего населения. Так, в нашей стране практически не проводят диагностику ЛТБИ у взрослых, и адекватно оценить истинную распространенность данной формы носительства *M. tuberculosis* практически невозможно [4–6]. Поэтому, несмотря на широкую распространенность в популяциях, ЛТБИ остается мало изученным состоянием, особенно с точки зрения генетической детерминации стойкого иммунного ответа к *M. tuberculosis*. Целью настоящего исследования был поиск генетических маркеров, ассоциированных с ЛТБИ.

Материалы и методы

Обследовано 70 индивидов с ЛТБИ, включая 38 мальчиков ($9,6 \pm 3,3$ года) и 32 девочки ($8,9 \pm 3,5$ года). Диагностика проводилась специалистами ОГБУЗ «Томский фтизиопульмонологический медицинский центр». У всех обследованных выявлен выраженный туберкулиновый ответ, свидетельствующий об инфицировании *M. tuberculosis*; диаскинтест проводился троим. У 13 детей в анамнезе установлено наличие контакта с больными легочным ТБ, у 12 из них и еще у двоих обследованных имеют место случаи ТБ в семье. Со времени постановки диагноза у всех обследованных прошло не менее двух лет. Контрольная группа представлена 445 здоровыми индивидами без бронхолегочной патологии (средний возраст мужчин составил $41,5 \pm 16,7$ года, женщин — $38,3 \pm 17,2$ года). Специальных исследований на наличие ЛТБИ в контрольной группе не проводилось, что делает ее сопоставимой с популяционными выборками при исследовании широко распространенных заболеваний. Включенные в исследование индивиды из обеих выборок представляют славянское население г. Томска, преимущественно (>95%) русское. От всех обследованных получено информированное согласие.

Были проанализированы 62 SNP, для которых либо ранее было показано наличие ассоциаций с ТБ при про-

ведении GWAS, либо имеющих высокий прогностический потенциал в отношении ТБ, показанный с использованием биоинформационных подходов. Генотипирование осуществлялось методами MALDI-TOF масс-спектрометрии, ПЦР-ПДРФ-, SNaPshot-, и HRM-анализов с использованием оборудования ЦКП НИИ медицинской генетики ФГБНУ Томский НИМЦ РАН «Медицинская геномика».

Для анализа ассоциаций генетических маркеров с ЛТБИ использовали логистическую регрессию с включением пола в качестве коварианты. Возраст не включали в анализ в связи с коллинеарностью возраста и патологического состояния в регрессионной модели: все исследуемые пациенты с ЛТБИ были детьми, поэтому их сравнение с контрольной группой старшего возраста автоматически приводит к тому, что возраст становится сильным статистически значимым фактором, маскируя при этом реальный эффект генотипов. Учитывая, что фенотипические эффекты исследуемых генетических вариантов *a priori* неизвестны, анализ проведен для трех вариантов: аддитивного, доминантного и рецессивного. Для выбора наилучшей модели использовали информационный критерий Акаике (AIC), модель с минимальным значением принимали за наилучшую. Анализ проводили в программной среде R.

Из анализа были исключены варианты с частотой редкого аллеля <5%, уровнем генотипирования индивидов <80% и отклонением от равновесия Харди—Вайнберга в группе контроля (с поправкой Бонферрони). После применения этих фильтров из анализа были исключены 17 из 62 полиморфных вариантов. Для исключения ложноположительных результатов использовали пермутационный тест ($N = 1000$); регрессионные модели считали статистически значимыми при $p < 0,05$ для пермутационного p -значения.

Для выявления наиболее информативных комбинаций полиморфных вариантов проводили анализ эпистатических взаимодействий между сочетаниями SNPs методом Model-based Multifactor Dimensionality Reduction (MB-MDR) с последующей оценкой диагностической ценности полученных комбинаций путём расчета величин отношения шансов, чувствительности и специфичности, показателя AUC (площадь под ROC-кривой) [7]. Были протестированы двух- и трехлокусные комбинации. Для двухлокусных комбинаций далее анализировали модели с величиной $p \leq 0,01$, для трехлокусных — с $p \leq 0,0001$. Для каждой тестируемой комбинации выбирали вариант, соответствующий максимальному значению статистики Вальда, и затем определяли экспериментальный p -уровень с использованием пермутационного теста.

Отношение шансов (с 95%-ным доверительным интервалом) для ассоциированных аллелей, генотипов и сочетаний генотипов рассчитывалось стандартными методами, для низкополиморфных локусов — с использованием критерия Фишера.

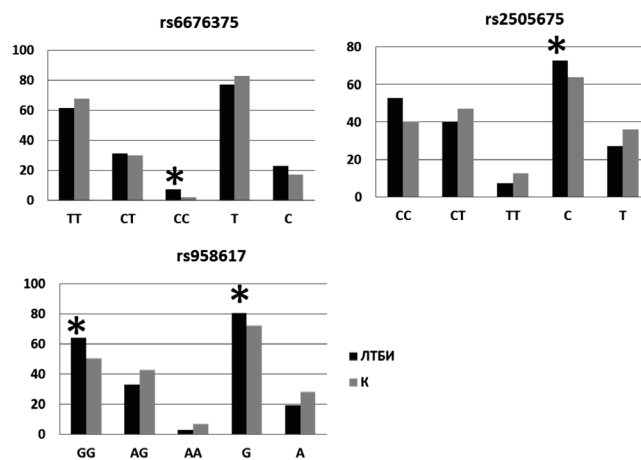
Результаты и обсуждение

Анализ ассоциаций был проведен для 45 SNPs, прошедших фильтры (частота редкого аллеля >5%, уровень генотипирования индивидов >80%, соответствие равновесию Харди—Вайнберга). Ассоциации с ЛТБИ выявлены для трех маркеров: rs2505675 ($p_{\text{перм}} = 0,020$), rs958617 ($p_{\text{перм}} = 0,019$), rs6676375 ($p_{\text{перм}} = 0,021$). Ассоциированными с риском ЛТБИ в томской выборке являются генотип CC rs6676375 (OR = 3,84 (CI: 1,30—11,33), $\chi^2 = 4,18$, $p = 0,041$, для критерия Фишера $p_f = 0,031$); аллель C rs2505675 (OR = 1,52 (CI: 1,00—2,31), $\chi^2 = 3,93$, $p = 0,047$), а также аллель G (OR = 1,63 (CI: 1,02—2,60), $\chi^2 = 4,24$, $p = 0,040$) и генотип GG (OR = 1,76 (CI: 1,01—3,07), $\chi^2 = 4,03$, $p = 0,045$) rs958617 (рисунок). Ранее были показаны ассоциации данных SNPs с ТБ в группе больных из ЮАР (капские малайцы) [8]. Все три маркера находятся в некодирующей ДНК: rs2505675 является интронным вариантом в гене некодирующей РНК *GMDS-AS1 (LOC100508120)* в хромосомном регионе бp25.2, два других SNPs локализованы в межгенных последовательностях: rs6676375 в хромосомном регионе 1q43 и rs958617 — в 4q21.1.

Для выявления информативных для оценки риска развития ЛТБИ межлокусных комбинаций генотипов, характеризующих возможные межгенные (эпистатические) взаимодействия, был использован непараметрический метод МВ-MDR.

Для ЛТБИ получено 4 двухлокусных ($p < 0,01$) и 5 — трехлокусных ($p < 0,001$) статистически значимых моделей, включающих как два из ассоциированных с ЛТБИ полиморфных варианта, так и 12 SNPs, ассоциаций которых с ЛТБИ методом логистической регрессии выявлено не было (табл. 1). Значения AUC для полученных моделей не превышают 0,61, во всех случаях получены высокие величины показателя специфичности (от 0,76 до 1) и низкие (от 0,032 до 0,46) величины показателя чувствительности.

Детальное рассмотрение полученных моделей позволило для каждой межлокусной комбинации получить от



Распределение частот аллелей и генотипов ассоциированных с ЛТБИ полиморфных вариантов. * — аллели/генотипы риска.

одного до трех сочетаний генотипов, предрасполагающих к развитию ЛТБИ (табл. 2). Обращает на себя внимание, что два (rs6455894 и rs12211969) из 14 SNPs, образующих ассоциированные с ЛТБИ межлокусные комбинации генотипов, локализованы в одном гене (*PACRG*), а еще шесть полиморфных вариантов участвуют в формировании более чем одного межгенного сочетания генотипов. Так, rs2273061 задействован в двух двухлокусных моделях и одной трехлокусной, rs2837857 и rs3915165 — в трех трехлокусных, rs10956514 — в двух трехлокусных, rs6676375 и rs17217757 в двухлокусной и в трехлокусной моделях.

Из этих SNPs rs6676375 локализован в межгенном регионе, rs2837857 — в гене *DSCAM*, кандидатном для синдрома Дауна (кодирует клеточную адгезивную молекулу Ig-надсемейства) и экспрессирующимся исключительно в тканях головного мозга и в сердце на ранних этапах его развития [9]. Соответственно, можно предположить, что каждый из этих полиморфных вариантов не маркирует ген, непосредственно вовлеченный в развитие разных

Таблица 1

Статистически значимые MDR-модели для ЛТБИ

Модель	OR	SE	SP	AUC	$p_{\text{перм}}$
rs958617 / rs2273061	2,7	0,46	0,76	0,61	0,007
rs6676375 / rs17217757	16,9	0,071	1	0,53	0,007
rs6455894 / rs12211969	3,77	0,17	0,95	0,56	0,008
rs1819084 / rs2273061	2,65	0,41	0,79	0,6	0,009
rs3915165 / rs712039 / rs1799983	5,23	0,23	0,95	0,59	<0,001
rs3915165 / rs2837857 / rs160441	5,43	0,25	0,94	0,59	<0,001
rs3915165 / rs2837857 / rs10956514	3,24	0,22	0,92	0,57	<0,001
rs7821565 / rs2837857 / rs2273061	0,263	0,032	0,89	0,46	<0,001
rs6676375 / rs17217757 / rs10956514	4,97	0,26	0,93	0,6	<0,001

Примечание. OR — отношение шансов; SE — чувствительность; SP — специфичность; AUC, площадь под диагностической кривой; $p_{\text{перм}}$ — p-значение для пермутационного анализа.

Предрасполагающие к развитию ЛТБИ межлокусные комбинации генотипов

Межлокусная комбинация	Рисковое сочетание	OR	95% CI	χ^2	p	p _i
rs6455894/rs12211969	CC/AG	3,67	1,36–9,70	7,32	0,007	0,007
rs6676375/rs17217757	CC/GC	13,04	2,18–99,34	11,25	0,0008	0,002
rs6676375/rs17217757/rs10956514	CT/GG/AA	3,3	1,48–7,28	9,45	0,002	–
	CC/GC/AG	15,66	2,27–108,02	8,38	0,0038	0,008
rs3915165/rs712039/rs1799983	GT/CT/GG	4,68	1,67–12,91	10,19	0,0014	0,0025
	GG/TT/GT	3,5	1,21–10,14	–	–	0,04
rs3915165/rs2837857/rs160441	GT/CC/CC	3,99	1,46–10,68	8,27	0,004	0,0051
	GT/CT/CT	5,31	1,57–17,6	8,53	0,0035	0,0054
rs3915165/rs2837857/rs10956514	GT/CC/AA	4,17	1,69–10,14	11,25	0,0008	0,0015
	GT/CT/AG	4,6	1,54–13,48	8,64	0,0033	0,0048
rs7821565/rs2837857/rs2273061	TT/CC/CT	1,97	1,04–3,71	4,37	0,037	–
	CT/CC/CC	2,7	1,09–6,52	4,76	0,029	0,028
	CT/CT/CT	2,83	1,14–6,87	5,23	0,022	0,025
rs1819084/rs2273061	CC/CT	2,65	1,46–4,79	11,29	0,0008	–
rs958617/rs2273061	GG/CT	2,7	1,51–4,83	12,3	0,00045	–

форм ТБ, а, вероятно, находится в одной группе сцепления с геном, задействованным в механизмах иммунного ответа. Остальные SNPs находятся в генах, для которых показана вовлеченность в иммунные процессы — напрямую или опосредованно. Так, продукт гена *ASAP1* (rs10956514) участвует в формировании цитоскелета, в дендритных клетках с пониженным уровнем экспрессии этого гена показаны нарушения как структуры внутриклеточного матрикса, так и миграции этих клеток [10]. В определении пути клеточной дифференцировки Т-лимфоцитов триггерами являются белки Notch-1 и GATA-3 [11], а, следовательно, вовлечены и гены *JAG1* (rs2273061), кодирующий лиганд Notch1-рецептора [12], и *ZFPM2* (rs17217757), кодирующий транскрипционный фактор, модулирующий активность GATA-1 и других транскрипционных факторов семейства GATA [13].

Ген *CD80* кодирует мембранный рецептор В-лимфоцитов, моноцитов, дендритных клеток, индуцирующий пролиферацию Т-лимфоцитов и продукцию цитокинов в ответ на стимуляцию микробными компонентами [14]. Функция гена *PACRG* не вполне ясна, он включен в большие шаперонные комплексы, связан с убиквитин-зависимой системой протеолиза. Промоторный регион, регулирующий экспрессию локализованных «голова к голове» генов *PACRG* и *PARK2* (мутации в котором приводят к болезни Паркинсона в молодом возрасте), ассоциирован с лепрой [15].

Таким образом, полученные результаты указывают на выраженную роль эпистатических взаимодействий генов при ЛТБИ, потенциально определяющих специфический статус иммунной системы, позволяющий сдерживать активность *M. tuberculosis*, что выражается в отсутствии выраженных клинических проявлений ТБ при наличии бактерий в организме.

Список литературы

1. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению латентной туберкулезной инфекции у детей // под редакцией профессора Аксеновой ВА. 2013. 10 с.
2. Руководство по ведению пациентов с латентной туберкулезной инфекцией. ВОЗ. 2015. 40 с.
3. Lobue P, Menzies D Treatment of latent tuberculosis infection: an update. *Respirology* 2010;(15):603-622.
4. Зорина ММ, Филимонов ПН, Фелькер ИГ, Мальцев АВ Оценка распространенности латентной туберкулезной инфекции у сотрудников противотуберкулезного учреждения Туберкулез и болезни легких. 2014;(5):66-68.
5. Истомина ЕВ Диагностика латентной туберкулезной инфекции у сотрудников противотуберкулезного учреждения. Медицинский альянс. 2015;(2):47-55
6. Слащева ДМ, Брынза НС, Решетникова ЮС Обоснование актуальности изучения течения латентной туберкулезной инфекции у детского населения Тюменской области. Университетская медицина Урала. 2016;(3):38-40.
7. Mahachie JJM, Van Lishout F, Van Steen K Model-Based Multifactor Dimensionality Reduction to detect epistasis for quantitative traits in the presence of error-free and noisy data. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(6):696-703. doi: 10.1038/ejhg.2011.17.
8. Chimusa ER, Zaitlen N, Daya M et al. Genome-wide association study of ancestry-specific TB risk in the South African Coloured population. *Hum Mol Genet.* 2014;23(3):796-809. doi: 10.1093/hmg/ddt462
9. Barlow GM, Chen X-N, Shi ZY et al. Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene. *Genet. Med.* 2001;(3):91-101.
10. Curtis J, Luo Y, Zenner HL et al. Susceptibility to tuberculosis is associated with variants in the *ASAP1* gene encoding a regulator of dendritic cell migration. *Nat Genet.* 2015;47(5):523-527. doi:10.1038/ng.3248
11. Вшивкова ОС, Мелешко АН Роль транскрипционного фактора *Ikargos* в нормальном гемопоэзе и лейкогенезе: биологические и клинические аспекты. Успехи молекулярной онкологии. 2015;2(1):013-026. doi:10.17650/2313-805X.2015.2.1.013-026

12. Fernandez-Sanchez V, Pelayo R, Flores-Guzman P et al. In vitro effects of stromal cells expressing different levels of Jagged-1 and Delta-1 on the growth of primitive and intermediate CD34(+) cell subsets from human cord blood. *Blood Cells Mol Dis.* 2011;47(4):205-213. doi: 10.1016/j.bcmd.2011.08.003.
13. Holmes M, Turner J, Fox A et al. hFOG-2, a novel zinc finger protein, binds the co-repressor mCtBP2 and modulates GATA-mediated activation. *J. Biol. Chem.* 1999;(274):23491-23498.
14. Takeda K, Kaisho T, Akira S Toll-Like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21:335-76. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126
15. Mira MT, Alcais A, Van Thuc N et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature.* 2004;427:636-640. doi:10.1038/nature02326

Эволюционно-генетический анализ роли регуляторных участков гена *NDRG1* в формировании структуры наследственной предрасположенности к преэклампсии в популяциях различного этнического происхождения

Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Степанов В.А.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, vika.serebrova@medgenetics.ru

Регуляторные однонуклеотидные полиморфные варианты (rSNP) представляют большой интерес для исследователей, поскольку играют значимую роль в развитии различных патологических состояний человека путем изменения уровня экспрессии кандидатных генов, однако относятся к наименее изученной функциональной группе SNP. Целью данного исследования было изучение генетической компоненты преэклампсии (ПЭ) по системе rSNP нового гена-кандидата *NDRG1* и выявление роли естественного отбора в ее формировании. В представленной работе изучено четыре rSNP. Исследование проводилось в различных этнических группах (русские, якуты и буряты). Полученные данные показали ассоциацию с развитием ПЭ трех rSNP гена *NDRG1*: rs12678229, rs2227262 и rs3802252. Выявлено действие слабого отрицательного отбора для rs2227262. Результаты исследования могут свидетельствовать о значимой роли rSNP нового гена-кандидата *NDRG1* в формировании вариабельности уровня экспрессии плацентарной ткани при физиологично протекающей беременности и ПЭ.

Ключевые слова: преэклампсия, регуляторный однонуклеотидный полиморфный вариант (rSNP), ассоциативное исследование, плацента, транскриптом, естественный отбор.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-04-01467). Экспериментальные исследования проведены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ).

Evolutionary-genetic analysis of the role of regulatory regions in *NDRG1* gene in the formation of the hereditary predisposition structure to preeclampsia in different ethnic groups

Serebrova V.N.*, Trifonova E.A., Stepanov V.A.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Regulatory single nucleotide polymorphisms (rSNPs) are of substantial interest, because they play a significant role in the development of human pathology by altering the level of candidate genes expression. However they represent the least studied group of single nucleotide polymorphisms (SNPs). The purpose of this research was to study preeclampsia (PE) genetics components via the regulatory polymorphic variants of the new *NDRG1* candidate gene and to detect the role of natural selection in its formation. In this work, we analyzed four rSNPs. Three ethnic group have been studied (Yakut, Russian, Buryat). We have detected significant associations of PE with three rSNPs *NDRG1* gene: rs12678229, rs2227262 and rs3802252. We demonstrated the effect of weak negative selection for rs2227262. The results of this study provide evidence for a significant role of the new *NDRG1* candidate gene in the variability of the placental tissue expression between normal pregnancy and PE.

Keywords: preeclampsia, regulatory single-nucleotide polymorphisms (rSNPs), association study, placenta, transcriptome, natural selection.

Введение

Результаты молекулярно-генетических исследований свидетельствуют о том, что генофонд современного человека отражает историю адаптации к изменениям окружающей среды во время доисторических миграций за пределы Африки и, как правило, является специфичным для отдельных регионов. Изучение адаптивных из-

менений в человеческом геноме, возникших в условиях новой среды обитания, необходимо для понимания процессов формирования генетического разнообразия в современных популяциях, оценки роли их фенотипических проявлений в развитии болезней и здоровья современного человека, а также может рассматриваться в качестве способа обнаружения «упущенной наследуемости» при многофакторных заболеваниях (МФЗ) [1–3].

В представленной работе эволюционный подход к анализу генетической архитектуры МФЗ конкретизирован в отношении преэклампсии (ПЭ), которая из-за отсутствия в настоящее время предсказательных биомаркеров и эффективной фармакологической терапии признана одним из наиболее тяжелых гипертензивных расстройств беременности, определяющих высокую частоту материнской и перинатальной заболеваемости и смертности [4]. Поскольку плацента играет ведущую роль в этиопатогенезе ПЭ, все большее внимание исследователей направлено на изучение транскриптома плацентарной ткани при ПЭ и физиологично протекающей беременности, что позволило на сегодняшний день выявить ряд новых генов-кандидатов данной патологии в популяциях различного этнического происхождения [5, 6]. Было показано, что регуляция экспрессии кандидатных генов отчасти обеспечивается полиморфными вариантами, располагающимися в регуляторных последовательностях генов (rSNP) [7, 8], которые также играют значимую роль в развитии различных патологических состояний человека [8]. Определенный интерес в контексте ведущей роли плаценты в развитии ПЭ представляет эволюционный подход к анализу генетической архитектуры данной патологии по системе генов, вовлеченных в молекулярные процессы, происходящие в плацентарной ткани. Важно отметить, что развитие ПЭ характерно прежде всего для человека, однако имеются редкие сообщения о возникновении данной патологии у обезьян: горилл, шимпанзе, макак [9].

В данной работе была поставлена цель — охарактеризовать генетическую архитектуру ПЭ по системе rSNP нового гена-кандидата *NDRG1*, показавшего дифференциальную экспрессию в плацентарной ткани при ПЭ и физиологично протекающей беременности [6, 10, 11] и выявить роль естественного отбора в ее формировании.

Материалы и методы

В исследование было включено 1270 женщин, принадлежащих к трем этническим выборкам: якуты из г. Якутск (группа больных ПЭ, N = 217 чел., контрольная группа, N = 210 чел.), буряты из г. Улан-Удэ (группа

больных ПЭ, N = 140 чел., контрольная группа, N = 205 чел.), русские из г. Томск (группа больных ПЭ, N = 195 чел., контрольная группа, N = 303 чел.). Группа больных ПЭ включала пациенток с умеренной и тяжелой степенью ПЭ. Диагноз *преэклампсия* установлен врачами-акушерами в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Контрольная группа представлена женщинами с физиологично протекавшей беременностью и родами, а также отсутствием неблагоприятного акушерского анамнеза. Материал был собран на базе МАУЗ «Родильный дом №4» и ОГАУЗ «Областной перинатальный центр» г. Томска, Перинатального центра РБ №4 г. Якутска и ГБУЗ «Республиканский перинатальный центр» г. Улан-Удэ.

Поиск наиболее значимых rSNP гена *NDRG1* проводили с использованием онлайн ресурса «RegulomeDB». Критерием отбора служили значения «score» равные 1 и 2, характеризующие степень доказательности регуляторности каждого полиморфного варианта исследуемого гена. В результате было выявлено 44 rSNP, из них 27 rSNP оказались полиморфными (частота редкого аллеля более 5% по результатам проекта «1000 геномов»). Для дальнейшего анализа были выбраны 4 rSNP, которые вошли в состав мультиплекса (табл. 1) [12]. Генотипирование проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, как описано ранее [13], последовательности праймеров доступны по запросу.

Соответствие распределения частот аллелей и генотипов равновесию Харди—Вайнберга (PXB) проверяли по критерию χ^2 . Парное сравнение частот аллелей и генотипов между исследуемыми группами проводили с использованием критерия χ^2 с поправкой Йейтса или точного критерия Фишера. Для оценки ассоциированности rSNP с ПЭ вычисляли отношение шансов (OR) и его 95%-ный доверительный интервал (95% CI). Обнаружение сигналов естественного отбора на макроэволюционном уровне проводилось в эволюционной линии парвотряда Catarrhini (человек, шимпанзе, орангутан, макака) с использованием онлайн ресурса «INSIGHT», основанного на методе комбинации межвидовой дивергенции и внутривидового разнообразия [14].

Таблица 1

Характеристика исследуемых rSNP гена *NDRG1*

rSNP	Локализация rSNP		Значение "score"	Аллели	ПА
	в гене	на хромосоме			
rs12678229	Интрон	133262775	1f	A/G	G
rs2227262	Интрон	133247931	2b	C/T	C
rs2977559	Интрон	133247165	1f	A/G	A
rs3802252	Интрон	133293282	1f	C/T	T

Примечание. Значение «score» базы данных «RegulomeDB», характеризующее степень доказательности регуляторности SNP, обозначено цифровыми и буквенными символами; Наибольшими регуляторными свойствами обладают rSNP со значением «score» равным 1a (регуляторные свойства уменьшаются с увеличением цифрового значения и в алфавитном порядке). Локализация rSNP определена согласно данным базы NSBI. ПА — предковый аллель.

Проведение настоящего исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Результаты исследования

В обследованных этнических выборках все исследуемые rSNP гена *NDRG1* оказались полиморфными. Отклонение от PХВ было выявлено в группе контроля (русские — rs2227262; якуты — rs2227262, rs3802252; буряты — rs2977559), с учетом поправки Бонферрони ни одно из отклонений от PХВ не достигало порогового уровня значимости ($p = 0,0125$). В табл. 2 представлены результаты распределения частот аллелей изученных rSNP в исследуемых этнических выборках.

В якутской популяции ассоциация с развитием ПЭ показана для двух rSNP: rs2227262 и rs3802252. Так, для rs2227262 наблюдается статистически значимое повышение частоты генотипа ТТ ($p = 0,01$, OR = 0,09; CI:0,01—0,73) и аллеля Т ($p = 0,01$, OR = 0,60; CI:0,40—0,90) в контрольной группе, что указывает на их протективные свойства. В то же время, показано статистически значимое повышение частоты аллеля С ($p = 0,01$, OR = 1,66; CI:1,11—2,48) в группе больных ПЭ. Для rs3802252 при ПЭ характерно статистически значимое повышение частоты встречаемости аллеля Т ($p = 0,02$, OR = 1,37; CI:1,05—1,80) и снижение частоты встречаемости аллеля С ($p = 0,02$, OR = 0,73; CI:0,55—0,96) при сравнении с физиологично протекающей беременностью. В этнической выборке бурятов статистически значимое повышение частоты генотипа

GG ($p = 0,04$, OR = 1,93; CI:1,10—3,41) и аллеля G ($p = 0,02$, OR = 1,45; CI:1,06—1,97), а также снижение частоты аллеля А ($p = 0,02$, OR = 0,69; CI:0,51—0,94) rs12678229 наблюдалось в группе больных ПЭ. В этнической выборке русских не было установлено статистически значимых различий при сравнении группы больных с ПЭ и контрольной группы.

При оценке влияния естественного отбора на исследуемые rSNP среди представителей эволюционной линии парвотряда Catarrhini (человека, шимпанзе, орангутана, макаки) не было обнаружено действия сильного очищающего и положительного отбора; было показано действие слабого очищающего отбора для rs2227262 (табл. 3), что свидетельствует о консервативности данного полиморфного варианта среди представителей изученной эволюционной линии, благодаря удержанию производного аллеля в популяции на низком уровне. Примечательно, что в этнической выборке якутов для rs2227262 при ПЭ наблюдается значимое повышение частоты предкового аллеля С, в то время как производный аллель Т и генотип ТТ обладают протективными свойствами.

Обсуждение

В представленной работе был проведен эволюционно-генетический анализ роли rSNP нового гена-кандидата *NDRG1* в формировании структуры наследственной предрасположенности к ПЭ. Анализ распределения частот аллелей и генотипов 4-х rSNP исследуемого гена показал статистически значимую ассоциацию с развитием

Таблица 2

Распределения частот (%) аллелей rSNP в исследуемых группах

rSNP	ПА	Обследованные группы					
		ПЭ			Контроль		
		Буряты	Русские	Якуты	Буряты	Русские	Якуты
rs12678229	G	50	58	44	41	59	48
rs2227262	C	86	86	89	86	84	84
rs2977559	A	40	43	40	40	45	38
rs3802252	T	48	44	60	48	45	52

Примечание. ПА — предковый аллель.

Таблица 3

Роль действия естественного отбора по изученным rSNP гена *NDRG1*

rSNP	ПА	Вид отбора	Уровень значимости
rs12678229	G	Не выявлено сигналов действия естественного отбора	—
rs2227262	C	Слабый очищающий отбор	$p < 0,01$
rs2977559	A	Не выявлено сигналов действия естественного отбора	—
rs3802252	T	Не выявлено сигналов действия естественного отбора	—

Примечание. ПА — предковый аллель.

ПЭ для трех rSNP: rs12678229 в этнической выборке бурятов; rs2227262 и rs3802252 в этнической выборке якутов. Поиск сигналов естественного отбора в эволюционной линии парвотряда Catarrhini выявил действие слабого очищающего отбора, направленного на rSNP rs2227262.

Ген *NDRG1* впервые выявлен благодаря анализу транскриптома плацентарной ткани [6, 10, 11]. Примечательно, что на сегодняшний день отсутствуют данные о роли его SNP в развитии ПЭ. Продуктом гена является цитоплазматический белок суперсемейства гидролаз, участвующий в различных биологических процессах: клеточной пролиферации и дифференцировке, гормональном ответе. При воздействии стресса, например, гипоксии, белок *NDRG1* может играть цитопротективную роль в нормальных здоровых клетках [15]. Важно отметить, что среди семейства белков *NDRG* именно изоформа *NDRG1* наиболее активно экспрессируется в плаценте во втором и третьем триместрах беременности, преимущественно в синцитиотрофобласте [16]. Показано, что повышенный уровень экспрессии гена *NDRG1* в условиях гипоксии способствует дифференцировке и уменьшению степени повреждения клеток трофобласта [17], что согласуется с результатами нескольких исследований транскриптома плацентарной ткани, которые демонстрируют повышение уровня экспрессии гена *NDRG1* при ПЭ [6, 10, 11].

Результаты недавних исследований свидетельствуют о том, что в линии предков человекообразных обезьян происходит увеличение инвазивных свойств плаценты. Так, например, для семейств Cercopithecoidea (мартышка, макака и др.) и Hylobatidae (гиббон) характерны малая глубина инвазии трофобласта и отсутствие ремоделирования спиральных артерий на более глубоких уровнях миометрия. В то же время, для представителей подсемейства Hominae (человека, шимпанзе, гориллы, орангутана) характерны глубокая инвазия трофобласта и ремоделирование спиральных артерий, проходящее в миометрии [18]. Выявленное в нашем исследовании действие слабого очищающего отбора свидетельствует о консервативном характере регуляторного полиморфного варианта rs2227262 в ряду представителей эволюционной линии парвотряда Catarrhini. Такой тип отбора способствует удержанию производных аллелей на низком уровне. Примечательно, что ассоциация с развитием ПЭ для данного полиморфного варианта показана в этнической выборке якутов для предкового аллеля С, в то время как производный аллель Т обладает протективными свойствами. Можно предположить, что предковый аллель С регуляторного полиморфного варианта rs2227262 обеспечивает необходимый уровень экспрессии гена *NDRG1* в условиях гипоксии при неглубокой инвазии трофобласта, однако для представителей семейства Hominae ее уровень может быть недостаточным, поскольку вследствие увеличения инвазивных свойств плаценты клетки трофобласта чаще подверга-

ются действию гипоксии, что приводит к их повреждению и, как, следствие к развитию ПЭ.

В представленной работе показана статистически значимая ассоциация с развитием ПЭ трех rSNP гена *NDRG1* в этнических группах бурятов и якутов, что может свидетельствовать о важной роли регуляторных полиморфных вариантов в формировании вариативности уровня экспрессии плацентарной ткани при ПЭ и физиологично протекающей беременности, а также о возможном вкладе слабого очищающего отбора в формирование наследственной предрасположенности к данной патологии беременности по rs2227262 в этнической выборке якутов. Для более полного понимания роли rSNP нового гена-кандидата *NDRG1* и вклада естественного отбора в формирование структуры наследственной предрасположенности к ПЭ необходимо расширить список изучаемых rSNP, увеличить объем исследуемых выборок, а также включить дополнительные этнические выборки.

Список литературы

1. Степанов ВА. Эволюция генетического разнообразия и болезни человека. Генетика. 2016;52(7):852-864.
2. Saeb AT, Al-Naqeb D. The Impact of Evolutionary Driving Forces on Human Complex Diseases: A Population Genetics Approach. Scientifica (Cairo). 2016;doi:10.1155/2016/2079704.
3. Scheinfeldt LB, Tishkoff SA. Recent human adaptation: genomic approaches, interpretation and insights. Nat.Rev.Genet. 2013;14(10):692-702.
4. Tannetta D, Sargent I. Placental disease and the maternal syndrome of preeclampsia: missing links? Curr.Hypertens.Rep. 2013;15(6):590-599.
5. Louwen F, Muschol-Steinmetz C, Reinhard J, et al. A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in preeclampsia. Oncotarget. 2012;3(8):759-773.
6. Трифонова ЕА, Габидулина ТВ, Ершов НИ, и др. Характеристика транскриптома плацентарной ткани у женщин с физиологической беременностью и преэклампсией. Acta Naturae. 2014;6(2):77-90.
7. Антонцева ЕВ, Брызгалов ЛО, Матвеева МЮ, и др. Поиск регуляторных SNPs, связанных с развитием рака толстой кишки, в генах APC и MLH1. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011;15(4):644 — 652.
8. Jones BL, Swallow DM. The impact of cis-acting polymorphisms on the human phenotype. Hugo J. 2011;5(1-4):13-23.
9. Elliot M.G. Oxidative stress and the evolutionary origins of preeclampsia. J.Reprod.Immunol. 2016;114:75-80.
10. Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, et al. Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction. Reprod.Biol.Endocrinol. 2011;doi:10.1186/1477-7827-9-107.
11. Sitras V, Paulssen RH, Gronaas H, et al. Differential placental gene expression in severe preeclampsia. Placenta. 2009;30(5):424-433.
12. Сереброва ВН, Трифонова ЕА, Габидулина ТВ, и др. Выявление новых маркеров предрасположенности к преэклампсии путем анализа регуляторных участков генов, демонстрирующих дифференциальную экспрессию в плацентарной ткани. Молекулярная биология. 2016;50(5):870-879.
13. Степанов ВА, Трифонова ЕА. Мультиплексное генотипирование однонуклеотидных полиморфных маркеров методом масс-спектрометрии MALDI-TOF: частоты 56 SNP в генах

иммунного ответа в популяциях человека. Молекулярная биология. 2013;47(6):976-986.

14. Gronau I, Arbiza L, Mohammed J, et al. Inference of natural selection from interspersed genomic elements based on polymorphism and divergence. *Mol.Biol.Evol.* 2013;30(5):1159-1171.

15. Ellen TP, Ke Q, Zhang P, et al. NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states. *Carcinogenesis.* 2008;29(1):2-8.

16. Choi SJ, Oh SY, Kim JH, et al. Increased expression of N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1) in placentas from

pregnancies complicated by intrauterine growth restriction or preeclampsia. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2007;196(1):45.e1-7.

17. Chen B, Nelson DM, Sadovsky Y. N-Myc downregulated gene 1 (NdrG1) modulates the response of term human trophoblasts to hypoxic injury. *J.Biol.Chem.* 2006;281(5):2764-2772.

18. Crosley EJ, Elliot MG, Christians JK. Placental invasion, preeclampsia risk and adaptive molecular evolution at the origin of the great apes: evidence from genome-wide analyses. *Placenta.* 2013;34(2):127-132.

Связь генетической структуры популяций человека с географическими и климатическими параметрами

Попович А.А.^{1*}, Вагайцева К.В.^{1,2}, Бочарова А.В.¹, Степанов В.А.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, г. Томск, Россия, e-mail: anastasia.cherednichenko@medgenetics.ru

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Популяции человека проживают в различных условиях среды обитания, которые требуют адаптации, особенно к экстремальным средовым факторам. Действие адаптивной эволюции отражается и на генетической структуре популяций человека. В настоящем исследовании был проведен анализ вариабельности 25 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), связанных с адаптацией к холодному климату, в мировых популяциях. Показано влияние климатических и географических факторов на генетическое разнообразие популяций человека. Выявлен рост генетического разнообразия по изученным маркерам от Африки по мере расселения современного человека по земному шару. Вероятно, высокая частота аллелей, ассоциированных с адаптацией к климату, в некоторых популяциях человека может быть объяснена в рамках гипотезы канализации/деканализации геном-феномных отношений в ходе расселения современного человека.

Ключевые слова: естественный отбор, генетическое разнообразие, популяции человека, однонуклеотидные полиморфные маркеры.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-02442 с привлечением научно-исследовательского оборудования ЦКП «Медицинская геномика» при НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Relationship between the genetic structure of human populations and geographical and climatic parameters

Popovich A.A.¹, Vagaitseva K.V.^{1,2}, Bocharova A.V.^{1*}, Stepanov V.A.^{1,2}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,

e-mail: anastasia.cherednichenko@medgenetics.ru

² National Research Tomsk State University

Human populations live in different environmental conditions that require adaptation, especially to extreme environmental factors. The action of adaptive evolution is also reflected on human populations' genetic constitution. The study highlights the variability analysis of 25 SNPs single nucleotide polymorphisms (SNP) related to adaptation to a cold climate, as well as influence of climatic and geographical factors on the genetic diversity of human populations. The growth of the genetic diversity among the studied markers from Africa according to a modern human's displacement around the earth identified. Probably, the variability of alleles associated with adaptation to climate in some populations could be explained in the framework of the hypothesis of canalization/decanalization of genome-phenome relationships under natural selection during modern human dispersion.

Key words: natural selection, genetic diversity, human populations, single nucleotide polymorphisms.

Введение

Современный человек появился в Восточной Африке и был приспособлен к проживанию в условиях жаркого и влажного экваториального и субэкваториального климата. После выхода из Африки в процессе миграции популяции человека заселили другие регионы, в том числе и регионы континентального и арктического климата, к которым относится территория Северной Евразии, в частности Сибирь. Согласно археологическим данным современный человек достиг территории Сибири приблизительно 45—40 тыс. лет назад [1].

Исследования генома человека с использованием результатов таких крупных международных проектов, как НарМар, «1000 геномов» и HGDP значительно расширили представление об изменчивости генофондов популя-

ций в пространстве и времени в процессе расселения человека по земному шару. Исследование генетической адаптации ведется в течение длительного времени, в частности, накоплен большой объем информации о генетических различиях между популяциями ойкумены [2, 3]

Наиболее значимые связи с параметрами окружающей среды показали генетические маркеры, ассоциированные с пигментацией кожи, иммунозависимыми заболеваниями, участвующие в энергетическом обмене [4, 5]. Однако роль адаптивной эволюции в формировании генетических характеристик популяций человека, проживающих на территории Северной Евразии, изучена слабо. Длительная приспособительная эволюция генофонда популяций Сибири и Дальнего Востока могла привести к формированию устойчивых адаптивных

комплексов. Ряд недавних исследований показывает, что сибирские популяции характеризуются интенсивностью энергетического метаболизма, высоким кровяным давлением, устойчивостью к температурному шоку, что, вероятно, отразилось и на генетической структуре данных популяций [6, 7].

Таким образом, цель данного исследования заключается в анализе генетического разнообразия популяций Северной Евразии совместно с мировыми популяциями и в выявлении связи генетической структуры с географическими и климатическими параметрами.

Материалы и методы

В рамках настоящей работы были изучено 17 популяционных выборок Северной Евразии из биобанка коллекции НИИ медицинской генетики ТНИМЦ РАН «Биобанк населения Северной Евразии»: русские (121 чел.), карелы (48 чел.), вепсы (47 чел.), удмурты (95 чел.), коми (69 чел.), узбеки (53 чел.), киргизы южные (47 чел.), киргизы северные (48 чел.), ханты (95 чел.), кеты (48 чел.),

тувинцы (48 чел.), буряты (95 чел.), эвенки (47 чел.), якуты (102 чел.), нивхи (95 чел.), коряки (89 чел.), чукчи (95 чел.). Дополнительно в исследование были включены данные по 20 популяционным группам из проектов «1000 геномов» и HGDP. Популяции принадлежат к таким регионам, как Африка (ишаны, гамбийцы, лухья, менде, йоруба, пигмеи Биака, манденка), Ближний Восток (белуджи, бедуины, брахуи, бурушо, друзы, хазарейцы, калашы, макраны, мозабиты, палестинцы, патаны), Восточная Азия (китайцы из Сишунбаньяна-Дайского автономного округа, китайцы из Пекина, южные китайцы, японцы, вьеты), Восточная Европа (русские, карелы, вепсы, удмурты, коми), Западная Европа (финны, британцы, иберийцы, тосканцы, французы, баски, сардинцы), Индостан (бенгальцы, индийцы из Гуджарата, индийцы телугу, пенджабцы, ланкийские тамилы, синдхи), Океания (меланезийцы, папуасы), Дальний Восток (чукчи, коряки, нивхи), Сибирь (ханты, кеты, тувинцы, буряты, эвенки, якуты), Средняя Азия (киргизы южные, киргизы северные), Америка (перуанцы, каритиана, майя, пима и суруи).

Таблица 1

Характеристика полиморфных генетических маркеров, выбранных для исследования

SNP	Ген	Позиция в гене	Замена
rs10158579	LEPR	Интрон	С/Т
rs10464475	TRC-GCA13-1 / TRY-GTA11-1	Межгенная область	С/Т
rs10899013	POLD3	Интрон	С/Т
rs11202656	LOC105378415 / LOC105378416	Межгенная область	С/Т
rs1171279	LEPR	Интрон	С/Т
rs12203649	LOC102724168	Интрон	А/Г
rs17002034	MKL1	Интрон	Г/Т
rs2370985	RNU1-96P / RPS27P11	Межгенная область	А/Г
rs2846063	GRAMD1B	Интрон	А/С
rs312783	LRP5	Интрон	С/Т
rs3811787	UCP1	Вблизи 5'- конца гена	Г/Т
rs3827382	MKL1	Интрон	А/Г
rs4745450	OTX2P1 / LOC105376091	Межгенная область	С/Т
rs4753404	RPL7AP57 / FAT3	Межгенная область	А/Г
rs546803	LRP5	Интрон	С/Т
rs5759333	MPPED1	Интрон	А/Г
rs659366	UCP2	Вблизи 5'- конца гена	С/Т
rs7113533	LOC100287896 / LOC105369386	Межгенная область	А/Г
rs7225574	RPTOR	Интрон	Г/Т
rs7874982	LOC100129601 / OTX2P1	Межгенная область	А/С
rs7925747	POLD3	Интрон	С/Т
rs8136867	MAPK1	Интрон	А/Г
rs8541	PHACTR1	3' UTR	С/Т
rs854889	AMIGO2	3' UTR	А/С
rs9350204	ID4 / RPL29P17	Межгенная область	А/С

Полиморфные генетические маркеры, включенные в анализ, показали действие естественного отбора, согласно данным литературы, и/или принадлежат генам, связанным с устойчивостью к холоду, а именно вовлечены в такие процессы, как регуляция мышечных сокращений, терморегуляция, регуляция артериального давления, метаболизм липидов и др. [5, 8–10]. Таким образом, было выбрано 25 SNP (табл. 1). Генотипирование проведено методом масс-спектрометрии MALDI-TOF.

Анализ корреляции частот аллелей, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности с климато-географическими параметрами осуществлен с использованием корреляции Спирмена (R) в программе Statistica. Для исследования ге-

нетического разнообразия рассчитывали ожидаемую гетерозиготность, так как в небольших по объему выборках генотипы и наблюдаемая гетерозиготность по случайным причинам могут отклоняться от генеральных величин [11].

Результаты и обсуждение

Изученные генетические маркеры являются полиморфными в исследованных популяциях и характеризуются существенной вариабельностью показателей гетерозиготности отдельно по каждому локусу (от 0,0 до 0,5). Не обнаружено накопления числа статистически значимых отклонений от равновесия Харди–Вайнберга ($p < 0,05$) и в популя-

Таблица 2

Значения корреляции частот аллелей исследованных генетических маркеров и средней гетерозиготности с климатическими и географическими параметрами

Полиморфизм	Абсолютная широта	Абсолютная долгота	Среднегодовая температура	Температура наиболее холодного месяца	Температура наиболее теплого месяца	Разброс температур	Среднее количество осадков	Средняя относительная влажность
rs10158579	0,602	0,401	-0,658	-0,632	-0,637	0,525	-0,009	0,286
rs10464475	-0,691	-0,257	0,552	0,655	0,362	-0,709	0,332	0,017
rs10899013	0,726	-0,031	-0,630	-0,710	-0,475	0,705	-0,388	0,001
rs11202656	0,472	0,155	-0,389	-0,501	-0,242	0,554	-0,237	-0,128
rs1171279	-0,635	-0,394	0,571	0,580	0,544	-0,521	0,097	-0,279
rs12203649	-0,654	-0,333	0,670	0,754	0,418	-0,766	0,357	-0,063
rs17002034	-0,602	-0,514	0,678	0,734	0,409	-0,739	0,300	-0,082
rs2370985	-0,663	-0,145	0,616	0,697	0,394	-0,729	0,425	0,103
rs2846063	-0,852	-0,068	0,773	0,820	0,646	-0,754	0,282	-0,143
rs312783	0,384	0,652	-0,380	-0,484	-0,237	0,537	-0,155	0,025
rs3811787	0,715	-0,164	-0,517	-0,527	-0,442	0,448	-0,350	0,153
rs3827382	-0,620	-0,510	0,692	0,749	0,431	-0,753	0,296	-0,098
rs4745450	-0,620	-0,372	0,497	0,633	0,300	-0,688	0,296	0,103
rs4753404	-0,739	-0,285	0,664	0,742	0,511	-0,713	0,214	-0,044
rs546803	0,369	0,501	-0,291	-0,355	-0,271	0,367	-0,196	0,261
rs5759333	-0,763	-0,092	0,660	0,738	0,531	-0,704	0,391	-0,043
rs659366	-0,097	-0,308	0,278	0,211	0,264	-0,201	-0,112	-0,294
rs7113533	-0,620	-0,531	0,552	0,605	0,407	-0,633	0,289	-0,102
rs7225574	-0,441	-0,554	0,552	0,498	0,464	-0,427	-0,012	-0,312
rs7874982	-0,584	-0,372	0,442	0,600	0,183	-0,701	0,439	0,204
rs7925747	-0,618	-0,524	0,550	0,602	0,414	-0,626	0,279	-0,107
rs8136867	-0,470	-0,547	0,426	0,476	0,381	-0,490	0,018	-0,186
rs8541	-0,552	-0,395	0,512	0,618	0,327	-0,671	0,198	-0,019
rs854889	-0,751	-0,187	0,737	0,810	0,567	-0,756	0,399	0,038
rs9350204	-0,580	-0,490	0,504	0,643	0,260	-0,736	0,447	0,159
He25	0,696	0,291	-0,578	-0,715	-0,343	0,774	-0,401	-0,147
Ho25	0,711	0,271	-0,604	-0,735	-0,371	0,770	-0,406	-0,131

Примечание. В ячейках представлен коэффициент корреляции Спирмена (R), выделены ячейки, где уровень значимости составил меньше 0,05. He25 и Ho25 — средние ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготности.

циях, и отдельно по генетическим маркерам. Частота большинства исследованных SNP достоверно связана с абсолютной широтой, абсолютной долготой, среднегодовой температурой, температурой наиболее холодного и теплого месяцев, разбросом температур (табл. 2). Накопление числа значимых корреляций с климатическими и географическими параметрами, вероятно, обусловлено принципом отбора генетических маркеров для анализа.

В меньшей степени связаны с изменением климатических и географических параметров маркеры rs11202656, расположенный в межгенной области (LOC105378415 и LOC105378416 (нехарактеризованный LOC105378415 и LOC105378416)), и rs659366 — вблизи гена UCP2 (митохондриальный разобщающий белок 2). Полиморфизм rs11202656 показал ассоциацию с шизофренией, а rs659366 — с ожирением в нескольких исследованиях [12—14]. Продукт гена UCP2 является важным регулятором энергетического баланса [15].

На уровне всей системы маркеров выявлена связь средней гетерозиготности по 25 локусам с 7 климато-географическими параметрами. Относительно отдельных регионов показано низкое внутрипопуляционное разнообразие на территории Африки ($H_e = 0,214$; $H_o = 0,211$), Океании ($H_e = 0,213$; $H_o = 0,219$) и Америки ($H_e = 0,236$; $H_o = 0,244$), в то время как высокое генетическое разнообразие наблюдается в популяциях Северной Евразии (Средняя Азия ($H_e = 0,390$; $H_o = 0,388$) и Сибирь ($H_e = 0,393$; $H_o = 0,397$)). Уровень генетического разнообразия 17 популяций Северной Евразии составляет 0,372 (H_e) и 0,372 (H_o) и превосходит таковой в мировых популяциях ($H_e = 0,315$; $H_o = 0,317$).

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о связи генетической структуры популяций с переменными окружающей среды (климат и география). Низкий уровень генетического разнообразия характерен для групп, проживающих на территории с жарким экваториальным и субэкваториальным климатом (Африка, Америка и Океания), и постепенно возрастает в популяциях Северной Евразии. Однако, согласно результатам других исследований по условно-нейтральным маркерам, внутрипопуляционное генетическое разнообразие снижается по мере удаления от территории происхождения современного человека в Восточной Африке в связи с процессами миграции, генетического дрейфа и относительной изоляцией малочисленных популяций [16, 17].

Увеличение генетического разнообразия от Африки к популяциям Северной Евразии было ранее показано нами при исследовании полиморфных генетических маркеров, ассоциированных с иммунозависимыми фенотипами [18]. Данная закономерность лежит в русле гипотезы канализации/деканализации геном-феномных отношений, согласно которой, древние африканские популяции были приспособлены к определенным условиям среды обитания, вероятно, действовавшим как канализирующий фак-

тор. Расселение человека за пределы тропической Африки в регионы с другими условиями окружающей среды, вероятно, способствовало снижению действия направленного отбора на адаптивные для популяций Африки аллели генов и увеличению частоты альтернативных аллелей, а также корреляции частот аллелей генетических маркеров с климато-географическими факторами.

Список литературы

1. Goebel T. Pleistocene human colonization of siberia and peopling of the Americas: an ecological approach. *Evol. Anthropol.* 1999;8:208-227.
2. Алексеева Т.И. Адаптации человека в различных экологических нишах Земли (биологические аспекты). Курс лекций М.: МНЭПУ, 1998. 280 с.
3. Балановская Е.В., Рычков ЮГ Генофонд человека на этапах освоения ойкумены: адаптивная эволюция и геногеография. Человек заселяет планету Земля. Глобальное расселение гоминид. М.: 1997. 228-297 с.
4. Hancock AM, Witonsky DB, Gordon AS et al. Adaptations to climate in candidate genes for common metabolic disorders. *PLoS Genet.* 2008;4(2):e32.
5. Hancock AM, Witonsky DB, Alkorta-Aranburu G et al. Adaptations to climate-mediated selective pressures in humans. *PLoS Genet.* 2011;7(4):e1001375.
6. Bjerregaard P, Dewailly E, Young TK et al. Blood pressure among the Inuit (Eskimo) populations in the Arctic. *Scand. J. Public. Health.* 2003;31(2):92-99.
7. Snodgrass JJ, Leonard WR, Sorensen MV et al. The influence of basal metabolic rate on blood pressure among indigenous Siberians. *Am. J. Phys. Anthropol.* 2008;137(2):145-155.
8. Cardona A, Pagani L, Antao T et al. Genome-wide analysis of cold adaptation in indigenous Siberian populations. *PLoS One.* 2014;9(5):e98076.
9. Lappalainen T, Salmela E, Andersson PM et al. Genomic landscape of positive natural selection in Northern European populations. *Eur. J. Hum. Genet.* 2010;18(4):471-478.
10. Rasmussen M, Li Y, Lindgreen S et al. Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature.* 2010;463(7282):757-762.
11. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М: Наука, 1991;271 с.
12. Chen P, Avramopoulos D, Lasseter VK et al. Fine mapping on chromosome 10q22-q23 implicates Neuregulin 3 in schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 2009;84(1):21-34.
13. Martinez-Hervas S, Mansego ML, de Marco G. Polymorphisms of the UCP2 gene are associated with body fat distribution and risk of abdominal obesity in Spanish population. *Eur. J. Clin. Invest.* 2012;42(2):171-178.
14. Baturin AK, Sorokina EY, Pogozheva AV. The study of the association of polymorphism rs659366 gene UCP2 c obesity and type 2 diabetes among residents of the Moscow Region. *Vopr. Pitan.* 2015;84(1):44-49.
15. Oguzkan-Balci S, Col-Araz N, Nacak M. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) gene polymorphisms are associated with childhood obesity and related metabolic disorders. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2013;26(3-4):277-283.
16. Степанов ВА. Геномы, популяции, болезни: этническая геномика и персонализированная медицина. *Acta naturae.* 2010;2(4):18-34.
17. Rosenberg NA, Kang JT. Genetic Diversity and Societally Important Disparities. *Genetics.* 2015;201(1):1-12.
18. Степанов ВА Эволюция генетического разнообразия и болезни человека. *Генетика.* 2016;52(7):852-864.

Аутосомные реципрокные транслокации: пренатальная селекция, сегрегация и оценка эмпирического риска рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом при семейном носительстве

Шилова Н.В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», г. Москва, e-mail: nvsh05@mail.ru

Аутосомные реципрокные транслокации (АРТ), являются наиболее частой структурной хромосомной перестройкой. Носители АРТ имеют повышенный риск рождения детей с хромосомным дисбалансом, который может варьировать от низкого до высокого в зависимости от характеристик транслокации и типа патологической мейотической сегрегации. Целью исследования являлся анализ пренатальной селекции, мейотической сегрегации и оценка эмпирического риска рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом у 49 носителей АРТ. Оценка пахитенной диаграммы проводилась для каждой транслокации на основании количественных характеристик мейотического квадриллента. Наблюдаемый и ожидаемый хромосомный дисбаланс при всех типах патологической сегрегации оценивался в процентах от гаплоидной длины аутосом. Оценка жизнеспособности плодов и потенциальных зигот с хромосомным дисбалансом проводилась с использованием модели, основанной на измерении хромосомных сегментов дистальнее точек разрывов и определении относительного размера хромосомного дисбаланса. Установлена тенденция к преимущественной пренатальной селекции зигот вследствие альтернативного типа сегрегации АРТ. Показано, что анализ количественных характеристик квадриллента и пахитенной диаграммы позволяет оценить тип патологической мейотической сегрегации, приводящей к наименьшему хромосомному дисбалансу, и риск формирования несбалансированных гамет. Определено, что оценка жизнеспособности зигот, основанная на сопоставлении относительного размера несбалансированных хромосомных сегментов, может быть дополнительным этапом при установлении повторного риска рождения ребенка с хромосомной патологией у носителей АРТ. В 80% случаев транслокаций риск рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом расценивается как низкий. Мейотическая сегрегация хромосом у носителей АРТ происходит с преимущественным формированием и последующей пренатальной селекцией зигот вследствие альтернативного, непатологического типа сегрегации. Для каждой транслокации необходимо проводить оценку наиболее вероятного типа патологической сегрегации и жизнеспособности плодов или новорожденных. Эмпирический риск не может быть использован как единственный и решающий фактор при оценке повторного риска рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом.

Ключевые слова: аутосомные реципрокные транслокации, мейотическая сегрегация, хромосомный дисбаланс, жизнеспособность зигот, эмпирический риск.

Автор декларирует отсутствие конфликта интересов.

Autosomal reciprocal translocations: prenatal selection, segregation and assessment of empirical risks for reciprocal translocation carriers of having a liveborn child with chromosome imbalance

Shilova N.V.

Federal State Budgetary Institution «Research centre for Medical Genetics», Moscow, Russia, e-mail: nvsh05@mail.ru

Autosomal reciprocal translocations are among the most frequent chromosomal rearrangements in man. Though phenotypically normal, the carrier of reciprocal translocation may be at increased risk of having a child with multiple malformations and mental retardation due to malsegregation at meiosis resulting in gametes with chromosome imbalance. An accurate estimate of the probability of this event is understandably desirable. Aim. The aim of this investigation was an analysis of prenatal selection, meiotic segregation and assessment of empirical risks for reciprocal translocation carriers of having a liveborn child with unbalanced karyotype on 49 reciprocal translocation carriers. Materials and Methods. The pachytene diagrams were analyzed for each translocation taking in account the exact lengths of the chromosomes involved. The observed and most probable unbalanced segments were evaluated using the Chromosome Imbalance Size-Viability Model and Surface of Viable Unbalances consisting of the measurement of chromosomal segments distal to the breakpoints expressed in percentage of haploid autosomal length — %HAL. Results. The tendency to preferential prenatal selection of zygotes is established due to the 2:2 alternate segregation. It is shown that the analysis of quantitative characteristics of quadrivalent and pachytene diagram allows to estimate the type of malsegregation producing the smallest imbalance and the risk of formation of unbalanced gametes. Evaluation of viability of zygotes may be an additional step in establishing of the recurrence risks. In 80% of cases the risk of a viable child with a chromosomal imbalance is regarded as low. Conclusions. Meiotic segregation of chromosomes in carriers of autosomal reciprocal translocations occurs with preferential formation and subsequent prenatal selection of zygotes due to alternate segregation. It is necessary to assess segregation giving the smallest imbalance and viability of the imbalance. Empirical risk was not found to be useful as a discriminating risk predictor in individual genetic counselling.

Key words: autosomal reciprocal translocation, meiotic segregation, chromosome imbalance, viability of the imbalance, empirical risk.

Введение

Аутосомные реципрокные транслокации (АРТ) являются наиболее частой структурной хромосомной перестройкой и встречаются в популяции с частотой 0,08—0,3% [1]. Сбалансированные транслокации наблюдаются в кариотипе одного из супругов в 0,6% случаев при бесплодии и в 9,2% случаев привычного невынашивания беременности [2]. Подавляющее большинство носителей реципрокных транслокаций фенотипически нормальны, но имеют повышенный риск рождения детей с хромосомным дисбалансом, спонтанного прерывания беременности и бесплодия.

Развитие зиготы вследствие патологической сегрегации АРТ определяется характером хромосомного дисбаланса (ХД). В некоторых случаях этот дисбаланс препятствует нормальной имплантации зиготы, приводит к очень ранней гибели эмбриона при нераспознанной беременности (скрытый аборт), а также к неразвивающейся беременности и спонтанному аборту. В других случаях ХД совместим с дальнейшим развитием зиготы и эмбриона, но приводит к рождению детей с множественными врожденными пороками развития (МВПР) и/или аномалиями развития. Как правило, ХД определяется как частичная трисомия, так и частичная моносомия по хромосомным сегментам, участвующим в транслокации, что обуславливает «фенотипический гибрид». ХД, совместимый с выживаемостью зиготы, является минимальным при любом типе патологической сегрегации, поэтому в случае транслокационного носительства очень важно определить, какой тип сегрегации, приводящий к наименьшему ХД, наиболее вероятен для каждой индивидуальной транслокации.

С внедрением, развитием и широким использованием методов пренатальной цитогенетической диагностики (ПЦД) существует возможность мониторинга всех последующих беременностей в семьях с носительством АРТ. Семейные пары, в которых один из супругов является носителем реципрокной транслокации, принимают результаты ПЦД и консультирования с большой обеспокоенностью, поскольку уже имели психологическую травму вследствие репродуктивных потерь и/или рождения ребенка с умственной отсталостью и/или МВПР. Генетическая информация о судьбе потомства в таких семьях крайне важна.

Риски формирования зигот с ХД у носителей АРТ значительно варьируют от транслокации к транслокации. Эти риски будут зависеть от наиболее вероятного для каждой конкретной транслокации типа патологической сегрегации, приводящей к формированию несбалансированных гамет и вероятной жизнеспособности несбалансированных зигот, эмбрионов, плодов или новорожденных [3].

В отличие от моногенных болезней, для которых можно рассчитать риск рождения больных детей, особенности мейотической сегрегации хромосомных перестроек и, в частности, АРТ, не позволяют применить

простую математическую модель, позволяющую обеспечить точную оценку риска для носителей хромосомных перестроек. Классическим подходом в оценке повторного риска является эмпирическая модель, полученная при анализе расширенных родословных семей с носительством транслокаций и оценке частоты живорожденных потомков с несбалансированным кариотипом, что позволяет установить индивидуальный риск хромосомного дисбаланса у потомков [4]. Но, к сожалению, подавляющее большинство транслокаций являются уникальными в силу бесконечного разнообразия точек разрывов на хромосомах, в связи с чем такие данные получить крайне затруднительно. Поэтому стратегия оценки риска при семейном носительстве хромосомных перестроек, в том числе АРТ, такова, что, если семья достаточно большая по численности и имеется точная информация о репродуктивном анамнезе, фенотипе и кариотипе как можно большего количества членов семьи, то определяют эмпирические цифры риска, в противном случае используют обобщенные популяционные данные [5].

Целью настоящего исследования является анализ пренатальной селекции, мейотической сегрегации и оценка эмпирического риска рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом у 49 носителей АРТ. Задачи работы состояли в исследовании факторов, влияющих на сегрегационное поведение квадριвалента и риск формирования зигот с ХД у носителей АРТ.

Материалы и методы

Ультразвуковое исследование плода экспертного уровня и инвазивные диагностические процедуры проводили в Центре пренатальной диагностики при клиническом родильном доме № 27 г. Москвы (заведующая — д.м.н., профессор Юдина Е.В.). Приготовление препаратов из культуры лимфоцитов пуповинной крови, полученной после кордоцентеза, и культуры лимфоцитов периферической крови, дифференциальное GTG-окрашивание метафазных хромосом проводилось по стандартным протоколам. Кариотип указан в соответствии с международной цитогенетической номенклатурой (ISCN 2013).

Оценка предполагаемой и наблюдаемой патологической мейотической сегрегации проводилась для каждой транслокации на основании количественных характеристик пахитенных диаграмм Длины центрических и транслоцированных сегментов хромосом, а также длины отдельных хромосом измерялись в млн п.н. в соответствии с положением о цитогенетических бэндах на физической карте генома человека (assembly 19) геномного браузера UCSC. Наблюдаемый и ожидаемый ХД в виде частичной трисомии и/или частичной моносомии при всех типах патологической сегрегации оценивался в процентах гаплоидной длины аутосом (%HAL) с испо-

льзованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010.

Пример расчета %HAL для района 4q31-qter:

$$\frac{\text{длина } 4q31 - \text{qter (млн п.н.)}}{\text{длина хромосомы 4 (млн п.н.)}} \times \text{длина хромосомы 4 от длины всех аутосом (\%)} =$$

$$= \frac{42,7}{191,2} \times 6,63 = 1,48\%$$

Оценка пахитенных диаграмм и возможных типов патологической сегрегации в каждом отдельном случае АРТ проводилась по стандартным критериям [6] при использовании программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010.

Для оценки жизнеспособности зигот при наблюдаемом и ожидаемом хромосомном дисбалансе использовали модели «размер ХД — выживаемость» (Chromosome Imbalance Size-Viability Model) и «поверхность жизнеспособных дисбалансов» (Surface of Viable Unbalances) [7, 8].

Результаты и обсуждение

ПЦД проведена в 51 случае при носительстве 49 АРТ одним из супругов. Результаты пренатального цитогенетического исследования, кариотипы носителей АРТ, тип мейотической сегрегации и тип регистрации транслокации (повод для проведения цитогенетического исследования в семье) представлены в табл. 1.

В 70,6% случаев (36/51) у плода был выявлен нормальный или сбалансированный кариотип вследствие альтернативного типа мейотической сегрегации родительской транслокации, причем сбалансированный кариотип диагностирован в 2 раза чаще, чем нормальный. 29,4% (15/51) плодов имели несбалансированный кариотип вследствие патологической сегрегации в гаметогенезе родителя-носителя транслокации, среди которых в 12 случаях хромосомный дисбаланс у плода обусловлен совместным-1 типом сегрегации, в 2 случаях — совместным-2 типом сегрегации и в 1 случае — сегрегацией 3:1 с третичной трисомией. Таким образом, в собственной выборке АРТ отмечается явная тенденция к преимущественной пренатальной селекции зигот вследствие альтернативного, непатологического, типа сегрегации, что, в целом, отражает тенденцию к расхождению гомологичных центромер к противоположным полюсам при клеточном делении [9—11].

Риски формирования зигот с ХД у носителей АРТ значительно варьируют от транслокации к транслокации. Эти риски зависят от наиболее вероятного для каждой конкретной транслокации типа патологической сегрегации, приводящей к формированию несбалансированных гамет и вероятной жизнеспособности несбалансированных зигот, эмбрионов, плодов или новорожденных [12]. В свою очередь, эти вероятности зависят от

хромосом, вовлеченных в транслокацию, и размеров центрического и транслоцированного сегментов.

В каждом из 49 случаев выявленных АРТ проведена сравнительная оценка предполагаемой и наблюдаемой патологической сегрегации. Ключевыми количественными характеристиками являлись: соотношения суммарных длин центрических (ЦС) и транслоцированных сегментов (ТС), соотношение длин минимального ЦС и максимального ТС, соотношение длин минимального ЦС и минимального ТС, сравнительное отношение длин обоих ЦС к длине короткого плеча хромосомы 9 без учета размера прицентромерного гетерохроматина, а также участие в транслокации акроцентрических хромосомы 9 [6, 13].

На основании характеристики пахитенных диаграмм проведена сравнительная оценка предполагаемой и наблюдаемой патологической сегрегации в каждом случае АРТ (табл. 1). Как видно из представленных данных, для подавляющего большинства транслокаций характерна совместная-1 патологическая сегрегация (39/49). Во всех случаях, когда был известен факт регистрации случаев с несбалансированным кариотипом в семье, ожидаемая патологическая сегрегация соответствовала наблюдаемой, приводящей к определенному хромосомному дисбалансу. Обращает на себя внимание случай 29 — t(7;14)(q31;q11.1). Это единственная реципрокная транслокация, в которой сумма ЦС практически равна сумме ТС (126,8 млн п.н. и 123,5 млн п.н. соответственно). По этому формальному признаку оценки пахитенной диаграммы невозможно определить наиболее вероятный тип патологической сегрегации. Конфигурация квадриллента очень необычная: квадриллент сильно асимметричный, точки разрывов не терминальны. Данная реципрокная транслокация характеризуется наличием очень короткого ЦС и присутствием центромерного гетерохроматина в центре квадриллента (рис. 1).

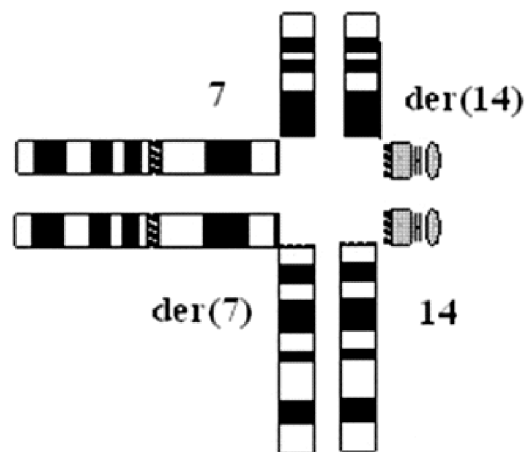


Рис. 1. Мейотический квадриллент при t(7;14). В центре квадриллента — короткие плечи и прицентромерный гетерохроматин длинного плеча хромосомы 14.

Такие цитогенетические характеристики негативно влияют на рекомбинацию, поскольку образование хиазмы затруднено в центральном регионе транслокационного креста, представленного гетерохроматинными районами акроцентрических хромосом [14]. Если учесть, что среднее число хиазм, происходящих в одном хромосомном сегменте определяется как отношение «длина сегмента (млн п.н.)/50» [15], то вероятность кроссинговера в коротких сегментах крайне мала, а в районах прицентромерного гетерохроматина равна 0. Без рекомбинации в этих районах хромосом невозможно поддержание конфигурации квадριвалента после профазы I [16] и хромо-

сомы будут вступать в метафазу I мейоза как два независимых бивалента с последующей сегрегацией по альтернативному или совместному-1 типам с равновероятным соотношением сбалансированных и несбалансированных гамет и, следовательно, высоким риском (50%) последующего формирования зигот с ХД. Действительно, анализ образцов спермы, полученных от мужчин-носителей реципрокных транслокаций, показал, что при транслокациях с подобными характеристиками сегрегация происходит с преимущественным формированием гамет по альтернативному (около 55%) и совместному (около 45%) типам [14].

Таблица 1

Сегрегация, тип регистрации 49 АРТ, оценка повторного риска и типов патологической сегрегации, приводящих к наименьшему ХД, на основании характеристик транслокационного квадριвалента

№ п/п	Реципрокная транслокация	Каритип плода	Паттерн сегрегации	Тип регистрации	Риск (%)	ЦС1	ТС1	ЦС2	ТС2	Патологическая сегрегация	
										Ожидаемая	Выявленная
1	t(1;2)(p22;p15)	46,XY,t(1;2)(p22;p15)mat	альт (сб)	ПД	Нет	160,9	88,4	181,9	61,3	совм-1	—
2	t(1;5)(q44;p15.1)	46,XY,t(1;5)(q44;p15.1)mat	альт (сб)	МВПР	?	246,4	2,9	165,9	15,0	совм-1	совм-1 *
3	t(1;11)(q43;q21)	46,XY,der(1)t(1;11)(q43;q21)pat	совм-1	ПД	1,3	243,7	5,6	97,2	37,8	совм-1	совм-1
4	t(1;11)(q44;p11.2)	46,XX,der(1)t(1;11)(q44;p11.2)pat	совм-1	ПД	Нет	246,4	2,9	91,5	43,5	совм-1	совм-1
5	t(1;12)(p32;q24.2)	46,XY,t(1;12)(p32;q24.2)mat	альт (сб)	МВПР	4,45	193,2	56,1	118,1	15,8	совм-1	совм-1 *
6	t(1;14)(q42;q32)	46,XY,der(14)t(1;14)(q42;q32)mat	совм-1	МВПР	0,5	230,7	18,6	85,3	5,9	совм-1	совм-1 совм-1*
7	t(2;3)(q21;p21)	46,XY,t(2;3)(q21;p21)mat	альт (сб)	ПД	Нет	135,1	108,1	153,8	44,2	совм-1	—
8	t(2;4)(p25;q31)	46,XX,t(2;4)(p25;q31)mat	альт (сб)	МВПР	Нет	231	12,2	148,5	42,7	совм-1	?
9	t(2;11)(p23.3;p15.5)	46,XX,der(11)t(2;11)(p23.3;p15.5)pat	совм-1	МВПР	5,7	219,2	24	132,2	2,8	совм-1	совм-1, совм-1*
10	t(2;21)(q34;q21)	46,XX,t(2;21)(q34;q21)mat	альт (сб)	МВПР	6,9	215,3	27,9	13,1	24,1	3:1	3:1*
11	t(3;4)(q13.2;q31.1)	46,XY,t(3;4)(q13.2;q31.1)pat	альт (сб)	ПД	Нет	113,5	84,5	141,5	49,7	совм-1	—
12	t(3;4)(q28;q31)	46,XX	альт (N)	МВПР	нет	187,9	10,1	148,5	42,7	совм-1	?
13	t(3;12)(q25.1;p13.3)	46,XY	альт (N)	МВПР	нет	152,1	45,9	123,8	10,1	совм-1	совм-1*
14	t(3;14)(q13.3;q23)	46,XX,t(3;14)(q13.3;q23)mat	альт (сб)	ПД	3,0	119	79	46	45,2	3:1	—
15	t(4;5)(q31;p15.3)	46,XY	альт (N)	МВПР	0,4	146,8	44,4	176,4	4,5	совм-1	?
16	t(4;19)(p15.2;p13.2)	46,XX	альт (N)	МВПР	5%	169,9	21,3	52,2	6,9	совм-1	?
17	t(4;22)(q23;q12)	46,XX,t(4;22)(q23;q12)pat	альт (сб)	ПД	0,4	101,1	90,1	17,4	21,7	3:1	—
18	t(5;6)(q14;p12.2)	46,XX,t(5;6)(q14;p12.2)mat	альт (сб)	ПД	3,0	82,8	98,1	119,3	51,8	совм-1	—

Таблица 1 (продолжение)

№ п/п	Реципрокная транслокация	Каритип плода	Паттерн сегрегации	Тип регистрации	Риск (%)	ЦС1	ТС1	ЦС2	ТС2	Патологическая сегрегация	
										Ожидаемая	Выявленная
19	t(5;6)(p15.1;p25.1)	46,XY	альт (N)	МВГР	?	165,9	15	166,9	4,2	совм-1	совм-1*
20	t(5;9)(q33;p22)	46,XY,t(5;9)(q33;p22) mat	альт (сб)	СА-1	3,9	155,7	25,2	109,4	16,6	совм-1	—
21	t(5;10)(p14;p14)	46,XY,der(5)t(5;10)(p14;p14) pat	совм-1	ПД	9,4	157,6	23,3	123,3	12,2	совм-1	совм-1
22	t(5;12)(p13.3;q21)	46,XX,der(5)t(5;12)(p13.3;q21) mat	совм-1	ПД	0,75	152	28,9	86,7	47,2	совм-1	совм-1
23	t(5;15)(q31;q24)	46,XY,t(5;15)(q31;q24) pat	альт (сб)	ПД-	1,35	139,5	41,4	66,5	27,3	совм-1	—
24	t(5;18)(q33;q22.3)	47,XXX,t(5;18)(q33;q22.3) mat	альт (сб)	ПД	3,9	155,7	25,2	73,1	5,0	совм-1	—
25	t(5;20)(p12;q13.3)	46,XY	альт (N)	МВГР	3,3	138,4	42,5	46,4	16,6	совм-1	совм-1*
26	t(6;21)(q15;q21)	46,XY,t(6;21)(q15;q21) mat	альт (сб)	МВГР	3,0	88	83,1	13,1	24,1	совм-2, 3:1	?
27	t(7;9)(p22;q22)	46,XX,t(7;9)(p22;q22) mat	альт (сб)	СА-1, НБ-1	Нет	151,8	7,3	81,4	44,6	совм-1	—
28	t(7;9)(q35;p13)	46,XY,der(7)t(7;9)(q35;p13) mat	совм-1	ПД	3,1	147,9	11,2	89,7	36,3	совм-1	совм-1
29	t(7;14)(q31;q11.1)	46,XX,t(7;14)(q31;q11) mat	альт (сб)	МВГР	0,4	123,8	35,3	3	88,2	неопр	?
30	t(7;17)(p12;p11)	46,XX,t(7;17)(p12;p11) mat	альт (сб)	МВГР	1,4	108,6	50,5	57,2	24,0	совм-1	?
31	t(8;9)(q22;q21.2)	46,XX,t(8;9)(q22;q21.2) mat	альт (сб)	ПД	0,4	101,6	44,8	65,9	60,1	совм-1	—
32	t(8;10)(q22;p13)	46,XY,t(8;10)(q22;p13) pat	альт (сб)	СА-1	5,6	101,6	44,8	123,3	12,2	совм-1	—
		46,XX	альт (N)	МВГР	2,6						
33	t(8;11)(p23;q21)	46,XY	альт (N)	СА-4	1,3	140,2	6,2	97,2	37,8	совм-1	совм-1*
34	t(8;11)(q22;q14)	46,XX	альт (N)	ПД	11,8	101,6	44,8	88,3	46,7	совм-1	—
35	t(9;12)(p12;q24.3)	46,XX,der(12)t(9;12)(p12;q24.3) mat	совм-1	СА-2, НБ-1,	?	85	41	125,9	8,0	совм-1	совм-1
36	t(10;14)(q11.2;q13)	46,XY,+der(10)t(10;14)(q11.2;q13),-14 mat	совм-2	МВГР	14,0	46,1	89,4	20,5	70,7	совм-2, 3:1	совм-2
		46,XX	альт (N)	МВГР							
37	t(10;18)(q25.1;q23)	46,XX,der(18)t(10;18)(q25.1;q23) mat	совм-1	СА-2	14,0	111,9	23,6	75,6	2,5	совм-1	совм-1 совм-1*
38	t(10;18)(q26.2;p11.2)	46,XX,der(18)t(10;18)(q26.2;p11.2) mat	совм-1	ПД	7,0	130,6	4,9	69,6	8,5	совм-1	совм-1 совм-1*
39	t(11;13)(p13;q33)	46,XX	альт (N)	Бесплодие 1	Нет	104	31	90,7	8,2	совм-1	—
40	t(11;18)(q25;q21)	46,XX,der(11)t(11;18)(q25;q21) pat	совм-1	МВГР	2,9	130,8	4,2	56,2	21,9	совм-1	совм-1
41	t(11;20)(q13.3;q13.1)	46,XY,t(11;20)(q13.3;q13.1) pat	альт (сб)	МВГР	Нет	70,4	64,6	46,4	16,6	совм-1	—
42	t(11;20)(q23.3;p11.2)	46,XX,t(11;20)(q23.3;p11.2) pat	альт (сб)	МВГР	2,5	121,2	13,8	41,7	21,3	совм-1	совм-1*
43	t(11;22)(q23.3;q11.2)	47,XY,+der(22)t(11;22)(q23.3;q11.2) mat	3:1 с третичной трисомией	ПД	3,7	121,2	13,8	11,3	27,8	3:1	3:1 3:1*

№ п/п	Реципрокная транслокация	Каритип плода	Паттерн сегрегации	Тип регистрации	Риск (%)	ЦС1	ТС1	ЦС2	ТС2	Патологическая сегрегация	
										Ожидаемая	Выявленная
44	t(11;22)(q23.3;q11.2)	46,XY,t(11;22)(q23.3;q11.2) mat	альт (сб)	ПД	3,7	121,2	13,8	11,3	27,8	3:1	3:1
45	t(14;21)(q21;q21)	46,XX,+der(14)t(14;21)(q21;q21),-21 pat	совм-2	СА-3	?	27,40	63,8	13,1	24,1	совм-2, 3:1	совм-2
46	t(15;18)(q24;q21)	46,XX,der(15)t(15;18)(q24;q21) mat	совм-1	ПД	1,35	59,4	27,3	56,2	21,9	совм-1	совм-1
47	t(15;20)(q11.1;p11.2)	46,XX,t(15;20)(q11.1;p11.2) mat	альт (сб)	ПД	10,3	3,2	83,5	41,7	21,3	совм-2, 3:1	—
48	t(15;20)(q21;p12)	46,XY,(15;20)(q21;p12) mat	альт (сб)	ПД-	1,35	37,1	49,6	53,8	9,2	совм-1	—
49	t(18;20)(q22.1;q11.2)	46,XX,t(18;20)(q22.1;q11.2)pat	альт (сб)	МВПР	Нет	61,6	16,50	34,4	28,6	совм-1	?

Примечание. альт (N) — сегрегация по альтернативному типу с нормальным каритипом; альт (сб) — сегрегация по альтернативному типу со сбалансированным каритипом; совм-1 — патологическая сегрегация по совместному-1 типу; совм-2 — патологическая сегрегация по совместному-2 типу; МВПР — рождение ребенка с множественными врожденными пороками развития в анамнезе (* — ХД установлен); ПД — пренатальная диагностика; СА — спонтанный аборт; НБ — неразвивающаяся беременность; ЦС1 — длина центрического сегмента 1 (млн п.н.); ЦС2 — длина центрического сегмента 2 (млн п.н.); ТС1 — длина транслоцированного сегмента 1 (млн п.н.); ТС2 — длина транслоцированного сегмента 2 (млн п.н.). При участии в транслокации акроцентрических хромосом и хромосомы 9 размеры ЦС и ТС указаны с коррекцией по размеру структурного гетерохроматина (исключены из измерения); * — зарегистрирован несбалансированный каритип у больного ребенка или плода в предыдущей беременности; — — не зарегистрировано детей или предыдущих беременностей плодом с несбалансированным каритипом; риск ? — описаны единичные случаи, что не позволяет оценить цифры риска [17]; ? — исследование каритипа у ребенка или плода с МВПР в предыдущей беременности не проводилось

Оценка жизнеспособности как плодов с выявленным ХД, так и потенциальных зигот с наиболее вероятным дисбалансом вследствие патологической сегрегации для каждой транслокации проводилась с использованием классической модели «размер ХД — выживаемость» и «поверхность жизнеспособных дисбалансов», основан-

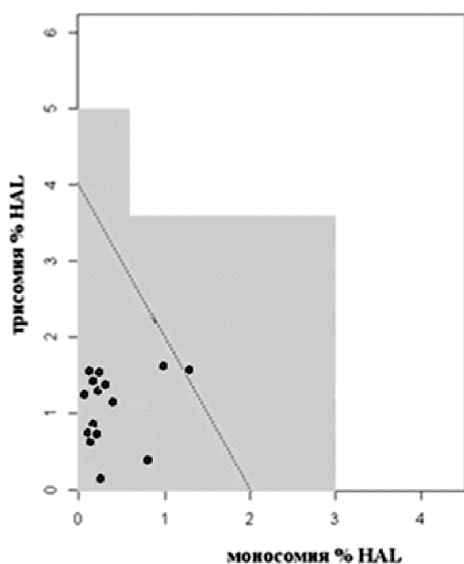


Рис. 2. Распределение относительного размера наблюдаемого ХД у 15 плодов с несбалансированным каритипом.

ной на измерении хромосомных сегментов дистальнее точек разрывов и определении относительного размера ХД.

Случаи наблюдаемого ХД у плода и оценка жизнеспособности при данном дисбалансе представлены в табл. 2 и на рис. 2 («треугольник выживаемости» ограничен линией, соединяющей значения 4% по оси y и 2% по оси x; «поверхность жизнеспособных дисбалансов» представляет область, выделенную серым цветом).

Во всех случаях наблюдаемого ХД у плода относительный размер этого дисбаланса был наименьшим из всех возможных вариантов такой сегрегации и укладывался в область «выживаемости», что свидетельствует об *in utero* жизнеспособности плодов вплоть до их рождения.

Значения всех возможных случаев ХД (% HAL) в зависимости от типа сегрегации были нанесены на графики, объединяющие две модели — «треугольник выживаемости» и «поверхность жизнеспособных дисбалансов». При анализе графиков «выживаемости», построенных для 8 базовых вариантов патологической сегрегации каждой из 49 транслокаций установлено, что в одном из 49 случаев (8,1%) (№ 7 в табл. 1 t(2;3)(q21;p21) при всех вариантах сегрегации зиготы не будет жизнеспособными. Относительный размер ХД при основных вариантах патологической мейотической сегрегации представлен в табл. 3.

Квадривалент является умеренно симметричным, а транслокация характеризуется как не имеющая терминальных точек разрывов с предпочтительной сегрегацией по совместно-1 типу. По данным Anton E. с соавт., у мужчин-носителей АРТ, при которых формируется мейотический квадривалент с подобной характеристикой, отмечается высокая частота гамет вследствие альтернативной и совместной-1 сегрегации ($44,9 \pm 2,5\%$ и $36,5 \pm 1,9\%$ соответственно) [14]. Однако при оценке жизнеспособности зигот, оказалось, что при данной транслокации зиготы, сформированные вследствие патологической совместно-1 сегрегации, являющейся предпочтительной, нежизнеспособны. Действительно,

транслокация у 27-летней женщины-носителя выявлена случайно при проведении ПЦД при первой зарегистрированной беременности по поводу обнаружения при УЗИ плода мягкого эхографического признака — гиперэхогенного образования в легком. Беременность закончилась рождением здорового ребенка. Не исключено, что у женщины имели место случаи нераспознанной беременности с ранней элиминацией нежизнеспособных зигот.

Таким образом, любая беременность у женщины-носительницы этой транслокации при сегрегации по альтернативному типу будет заканчиваться рождением ребенка с нормальным или сбалансированным кариоти-

Таблица 2

Размер наблюдаемого ХД в 15 случаях несбалансированного кариотипа у плода вследствие патологической сегрегации родительских АРТ

№ п/п	Кариотип плода	%HAL трисомия	%HAL моносомия
1	46,XY,der(1)t(1;11)(q43;q21)pat	1,31	0,19
2	46,XX,der(1)t(1;11)(q44;p11.2)pat	1,51	0,10
3	46,XY,der(14)t(1;14)(q42;q32)mat	0,65	0,20
4	46,XX,der(11)t(2;11)(p23.3;p15.5)pat	0,83	0,10
5	46,XY,der(5)t(5;10)(p14;p14)pat	0,42	0,81
6	46,XX,der(5)t(5;12)(p13.3;q21)mat	1,64	1,00
7	46,XY,der(7)t(7;9)(q35;p13)mat	1,26	0,39
8	46,XX,der(12)t(9;12)(p12;q24.3)	1,42	0,28
9	46,XY,+der(10)t(10;14)(q11.2;q13) mat,-14	1,60	1,27
10	46,XX,der(18)t(10;18)(q25.1;q23)mat	0,82	0,09
11	46,XX,der(18)t(10;18)(q26.2;p11.2)mat	0,17	0,30
12	46,XX,der(11)t(11;18)(q25;q21)pat	0,76	0,15
13	47,XY,+der(22)t(11;22)(q23.3;q11.2)mat	1,29	0,00
14	46,XX,+der(14)t(14;21)(q21;q21)pat,-21	1,51	0,83
15	46,XX,der(15)t(15;18)(q24;q21)mat	0,76	0,95

Таблица 3

Относительный размер ХД (%HAL) при базовых вариантах патологической мейотической сегрегации t(2;3)(q21;p21)

Тип сегрегации	Хромосомный дисбаланс	% HAL	
		Трисомия	Моносомия
2:2			
Совместная-1	Трисомия ТС1, моносомия ТС2	3,75	1,53
	Моносомия ТС1, трисомия ТС2	1,53	3,75
Совместная-2	Трисомия ЦС1, моносомия ЦС2	4,69	5,34
	Моносомия ЦС1, трисомия ЦС2	5,34	4,69
3:1			
С третичной трисомией	Трисомия ЦС1, ТС2	6,22	
	Трисомия ТС1, ЦС2	9,09	
С третичной моносомией	Моносомия ТС1, ЦС2		9,09
	Моносомия ЦС1, ТС2		6,22

пом; при патологической сегрегации — все зиготы нежизнеспособны. Следовательно, в данном случае проведение ПЦД нецелесообразно, поскольку риск прерывания беременности вследствие инвазивной процедуры превышает риск рождения больного ребенка.

Оценка жизнеспособности зигот, основанная на сопоставлении относительного размера несбалансированных хромосомных сегментов, может быть дополнительным этапом при оценке повторного риска рождения ребенка с хромосомной патологией при семейном носительстве АРТ. В случаях АРТ, которые сегрегируют с образованием гамет, из которых возможно формирование только нежизнеспособных зигот, ПЦД не целесообразна. Этот факт особенно важен в современных условиях отчетливой тенденции снижения толерантности к любым пренатальным потерям, в том числе и вследствие проведения инвазивной диагностической процедуры. Если же формирование жизнеспособных зигот возможно хотя бы в одном из ожидаемых вариантов патологической сегрегации АРТ, независимо от типа ее регистрации, вопрос о ПЦД должен обсуждаться при оценке риска рождения ребенка с ХД.

Риск рождения ребенка с несбалансированным кариотипом представлен на основе эмпирических данных при односегментном дисбалансе для сегрегации 2:2 по совместному-1, совместному-2 типам или сегрегации 3:1 [17]. В отдельных случаях приведены значения эмпирического риска для хромосом с конкретными точками разрыва (табл. 1). Оценить значения повторного риска рождения жизнеспособного ребенка с ХД на основе эмпирических данных оказалось возможным только в 45 случаях АРТ. Из них в 36 случаях (80%) этот риск оценивается как низкий (0—5%), в 6 случаях (13,3%) — как средний (5—10%) и только в 3 случаях (6,7%) — как высокий (более 10%). Таким образом, в подавляющем большинстве случаев (80%) риск рождения жизнеспособного ребенка с ХД вследствие патологической сегрегации АРТ расценивается как низкий, что согласуется с литературными данными [18].

Оценка эмпирического повторного риска в 31 случае при наличии МВПП у ребенка (плода) с учетом случайного выявления ХД при проведении ПЦД показала, что в 16,1% случаев (5/31) риск не повышен, в 48,4% случаев (15/31) является низким, в 25,8% случаев (8/31) — средним, в 9,7% случаев (3/31) высоким. В 14 случаях транслокаций, при семейном носительстве которых не было зарегистрировано рождения детей с МВПП и/или ХД, такой риск оценивается как нулевой в 28,6% случаев (4/14), как низкий — в 57,1% случаев (8/14), как средний — в 7,15% случаев (1/14) и как высокий также в 7,15% случаев (1/14). В обеих группах, как при наличии ХД у потомков, так и при его отсутствии, отмечаются транслокации с различными рисками. При этом в первой группе, при наличии МВПП у ребенка (плода), частота транслокаций со средним и высоким риском оказалась в 2,5 раза выше, чем во второй (не зарегистри-

рованы случаи рождения детей с МВПП и/или ХД). Эти данные подтверждают тот факт, что, хотя и отмечается тенденция низкого повторного риска рождения жизнеспособного ребенка при семейном носительстве АРТ, зарегистрированных по поводу привычного невынашивания беременности, эмпирический риск не может быть использован как единственный и решающий фактор при оценке повторного риска рождения жизнеспособного ребенка с ХД [17].

Так, например, в случае 47 (табл. 1), когда $t(15;20)(q11.1;p11.2)$ материнского происхождения была зарегистрирована по поводу трех спонтанных аборт и при ПЦД при четвертой беременности у плода выявлен нормальный кариотип, можно было предположить *a priori* низкий риск рождения жизнеспособного ребенка с несбалансированным кариотипом. Тем не менее, эмпирический риск в данном случае является высоким (10,3%) что подтверждается фактом формирования жизнеспособных зигот при потенциально возможной патологической сегрегации.

С другой стороны, некоторые транслокации, зарегистрированные по поводу МВПП у ребенка (плода) и имеющие *a priori* средний и высокий риски, актуально оцениваются как транслокации, не имеющие повторного риска рождения жизнеспособного ребенка с ХД (случаи 8, 12, 13, 49 в табл. 1).

Также показательным является случай 29 — $46,XX,t(7;14)(q31;q11.1)$, который уже обсуждался ранее. Если подходить к формальной оценке риска рождения ребенка с несбалансированным кариотипом, то на основании популяционных данных он рассматривается как низкий, что противоречит теоретическим и эмпирическим данным сегрегационного поведения квадрилента, определяющего высокий риск формирования зигот с ХД.

Таким образом, поскольку факты рождения детей с несбалансированным кариотипом отмечаются в семьях с различными априорными рисками, в тех случаях, когда эмпирический риск для носителей конкретной реципрокной транслокации рассчитан как низкий, необходимо обсуждать вопрос о проведении пренатальной диагностики при последующих беременностях при совокупной оценке всех факторов, влияющих на сегрегационное поведение мейотического квадрилента. Полученные данные по оценке эмпирического риска рождения жизнеспособного ребенка с ХД показывают, что такой риск зачастую низкий. Поэтому родители должны быть информированы о высокой вероятности благоприятного исхода будущих беременностей.

Выводы

Таким образом, мейотическая сегрегация хромосом у носителей АРТ происходит с преимущественным формированием и последующей пренатальной селекцией зигот вследствие альтернативного, непатологического,

типа сегрегации, отражая тенденцию к расхождению гомологичных центромер к противоположным полюсам при клеточном делении. При подобном, альтернативном, типе сегрегации зиготы со сбалансированным кариотипом (транслокационные гетерозиготы) образуются в 2 раза чаще, что способствует накоплению aberrантного пула гамет (цитогенетический аспект мейотического дрейфа). Риск формирования несбалансированного кариотипа у плода вследствие патологической мейотической сегрегации при носительстве АРТ, установленных по поводу рождения ребенка с хромосомным дисбалансом и/ или МВПР оказался в 2,5 раза выше, чем при носительстве АРТ, установленных по поводу невынашивания беременности.

Поскольку риски формирования зигот с ХД у носителей АРТ значительно варьируют от транслокации к транслокации, для каждой АРТ необходимо проводить оценку наиболее вероятного типа патологической сегрегации и жизнеспособности плодов или новорожденных. В случаях АРТ, которые сегрегируют с образованием гамет, из которых возможно формирование только нежизнеспособных зигот, проведение ПЦД не является целесообразным из-за того, что риск прерывания беременности вследствие проведения инвазивной процедуры превышает риск рождения больного ребенка.

Хотя отмечается тенденция низкого повторного риска рождения жизнеспособного ребенка при семейном носительстве АРТ, зарегистрированных по поводу привычного невынашивания беременности, эмпирический риск не может быть использован как единственный и решающий фактор при оценке повторного риска. При оценке повторного риска рождения жизнеспособного ребенка с ХД у носителей АРТ помимо эмпирического риска необходимо учитывать пахитенную конфигурацию квадривалента, относительный размер ХД и потенциальную жизнеспособность зигот.

Список литературы

1. Kochhar P, Ghosh P. Reproductive outcome of couples with recurrent miscarriage and balanced chromosomal abnormalities. *J. Obstet. Gynecol. Res.* 2013;39: 113-120.
2. Vozdova M, Kasikova K, Oracova E. et al. The effect of the swim-up and hyaluronan-binding methods on the frequency of abnormal spermatozoa detected by FISH and SCSA in carriers of balanced chromosomal translocations. *Hum. Reprod.* 2012;27:930-937.
3. Armstrong S, Goldman A, Speed R. et al. Meiotic studies of a human male carrier of the common translocation, t(11;22), suggest postzygotic selection rather than preferential 3:1 M1 segregation as the cause of the liveborn offsprings with an unbalanced translocation. *Am. J. Hum. Genet.* 2000;67:601-609.
4. Midro A, Stengel-Rutkowski S, Stene J. Experiences with risk estimates for carriers of chromosomal reciprocal translocations. *Clin. Genet.* 1992; V. 41:113-122.
5. Van Derwerken D. Bayesian assessment of genetic risk in families with a balanced translocations. *J. Genet. Counsel.* 2015;24:541-547.
6. Jalbert P, Sele B, Jalbert H. Reciprocal translocations: a way to predict the mode of imbalanced segregation by pachytene-diagram drawing. A study of 151 human translocations. *Hum. Genet.* 1980;55:209-222.
7. Daniel A. Structural differences in reciprocal translocations. *Hum. Genet.* 1979;51:171-182.
8. Cohen O, Cans C, Mermet M. et al. Viability threshold for partial trisomies and monosomies. A study of 1,159 viable unbalanced reciprocal translocations. *Hum. Genet.* 1994; 93:188-194.
9. Scriven P, Flinter F, Khalaf Y. et al. Benefits and drawbacks of preimplantation genetic diagnosis (PGD) for reciprocal translocations: lessons from a prospective cohort study. *Eur. J. Hum. Genet.* 2013;21:1035-1041.
10. Vozdova M., Oracova E, Kasikova K et al. Balanced chromosomal translocations in men: relationships among semen parameters, chromatin integrity, sperm meiotic segregation and aneuploidy. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2013;30:391.
11. Zhang Y, Zhu S, Wu J. et al. Quadrivalent asymmetry in reciprocal translocation carriers predict meiotic segregation patterns in cleavage stage embryos. *Reproduct. Biomed. Online.* 2014;29(4):490-498.
12. Armstrong S, Goldman A, Speed R. et al. Meiotic studies of a human male carrier of the common translocation, t(11;22), suggest postzygotic selection rather than preferential 3:1 M1 segregation as the cause of the liveborn offsprings with an unbalanced translocation. *Am. J. Hum. Genet.* 2000;67:601-609.
13. Cans C, Cohen O, Mermet M. et al. Human reciprocal translocations: is the imbalanced mode at birth predictable? *Hum. Genet.* 1993;21:228-232.
14. Anton E, Vidal F, Blanco J. Reciprocal translocations: tracing their meiotic behavior. *Genet. Med.* 2008;10:730-738.
15. Faraut T, Mermet M, Demongeot J. et al. Cooperation of selection and meiotic mechanisms in the production of imbalances in reciprocal translocations. *Cytogenet. Cell Genet.* 2000;88:15-21.
16. Petronczki M, Siomos M, Nasmyth K. Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell.* 2003;112:423-440.
17. Chromosome abnormalities and genetic counseling. Oxford monographs of medical genetics no. 6, Gardner RJ, Sutherland GR, Shaffer LG (eds); Int. Oxford press 2012.
18. Aguilar J, Bacallao-Guerra J, Bacallao-Gallestey J et al. Estimating the risk for unbalanced chromosomal aberrations in the offspring from translocation-carrying parents. *Biotechnologia Aplicada.* 2011;28:156-160.

Неслучайное распределение кариотипов эмбрионов у женщин с привычным невынашиванием беременности

Никитина Т.В.^{1*}, Жигалина Д.И.², Саженова Е.А.¹, Толмачева Е.Н.¹, Скрыбин Н.А.¹, Лебедев И.Н.¹

¹ НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

* e-mail: t.nikitina@medgenetics.ru

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) — это потеря двух и более беременностей подряд, затрагивающая до 5% супружеских пар в популяции. Средняя частота хромосомных аномалий у спонтанных абортусов человека составляет около 50%, и если считать возникновение хромосомных аномалий случайным событием, то, независимо от кариотипа первого выкидыша, последующий в половине случаев должен быть цитогенетически нормальным. Целью данной работы было определить, существует ли закономерная повторяемость хромосомной конституции у спонтанных абортусов от одной супружеской пары. Прокариотипировано 108 случаев повторной гибели эмбриона в 51 семье. Кариотип абортусов был получен с использованием комбинации нескольких методов: стандартного цитогенетического анализа, сравнительной геномной гибридизации (CGH), флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (aCGH) (73, 29, 3 и 3 образца соответственно). Среди обследованных женщин 35% (18/51) были здоровы, а 59% (30/51) имели заболевания женской половой сферы, ассоциированные с ПНБ. Отношение шансов (OR) потери второго эмбриона с таким же кариотипом (нормальным или аномальным), как и у первого абортуса, составило 6,98 (95% CI: 2,04–23,88; $p = 0,0013$). У 19 женщин из 51 (37%) все погибшие зародыши были с нормальным кариотипом, причем у 7 из этих женщин не было выявлено патологии, обуславливающей невынашивание беременности. Оба выкидыша с аномалиями кариотипа имели 35% (18/51) женщин, из них у 6 женщин аномалии эмбрионов представляли собой повторные трисомии по различным хромосомам (гетеротрисомии), еще в одной семье оба абортуса имели трисомию 16. Одиннадцать случаев повторной гибели эмбрионов оказались сочетанием различных типов аномалий. Средний возраст женщин с двумя трисомными выкидышами оказался выше, чем у женщин с двумя выкидышами с различными типами аномалий ($33,1 \pm 3,45$ и $28,7 \pm 5,78$ года соответственно, $p = 0,025$). Вероятность того, что последующий абортус будет иметь такой же кариотип (нормальный или аномальный), что и предыдущий, повышена. Повторные выкидыши с нормальным кариотипом могут быть обусловлены наличием у женщин этиологических факторов невынашивания, не диагностируемых стандартными методами обследования. Некоторые пациентки с повторными трисомиями абортусов, возможно, имеют более высокий риск хромосомного нерасхождения, чем другие женщины в том же возрасте. Сочетание у абортусов от одной женщины аберраций различных типов скорее всего случайно: маловероятно, чтобы наличие конкретного типа аномалии могло быть связано с повышенным риском возникновения другого типа аномалий, так как их формирование обусловлено различными механизмами.

Ключевые слова: невынашивание беременности, абортусы, цитогенетика.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Non-random distribution of embryonic karyotypes in women with recurrent pregnancy losses

Nikitina T.V.^{1*}, Zhigalina D.I.², Sazhenova E.A.¹, Tolmacheva E.N.¹, Skryabin N.A.¹, Lebedev I.N.¹

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk

² National Research Tomsk State University, Tomsk

Introduction. Recurrent pregnancy losses is the loss of two or more consecutive pregnancies, it affects up to 5% of couples in the population. The average frequency of chromosomal abnormalities in human spontaneous abortions is about 50%, and if the chromosomal abnormalities are random events, the subsequent abortion should be cytogenetically normal in half of the cases, regardless of the karyotype of the previous miscarriage. **The aim** of this study was to determine is there a regular occurrence of the chromosome constitution in spontaneous abortions from the same woman. **Materials and methods.** A total of 108 cases of recurrent embryonic death in 51 families were studied. The karyotype of abortion was obtained using a combination of methods: standard cytogenetic analysis (73), CGH (29), FISH and aCGH (3 samples each). 35% (18/51) of women were healthy, 59% (30/51) had diseases associated with miscarriage. **Results.** The odds ratio (OR) of the loss of the second embryo with the same karyotype (normal or abnormal), as in the first abortion, was 6.98 (95% CI: 2.04-23.88, $p = 0.0013$). In 19 women from 51 (37%), all the dead embryos had normal karyotypes, and 7 of these women did not have a pathology that caused miscarriage. Among women with RM 35% (18/51) had both miscarriages with abnormal karyotypes. Of these, in 6 women, embryo anomalies were repeated trisomy of different chromosomes (heterotrisomies), in one family both abortions had trisomy 16. Eleven cases of repeated death of embryos proved to be a combination of different types of anomalies. The average age of women with two trisomic miscarriages was higher than in women with miscarriages with different types of anomalies (33.1 ± 3.45 and 28.7 ± 5.78 years, respectively, $p = 0.025$). **Conclusions.** The likelihood for

subsequent abortion to be of the same karyotype (normal or abnormal), as the previous one, is increased. Repeated miscarriages with normal karyotypes may be due to the women's etiological factors of miscarriage that were not diagnosed by standard survey methods. Some patients with recurrent trisomic abortions may have an increased risk of chromosomal nondisjunction than other women at the same age. The combination of abortions with different types of abnormalities from one woman is most likely random: it is unlikely that the presence of a specific type of anomaly could be associated with an increased risk of another type of anomaly, because different mechanisms are involved in their formation.

Key words: recurrent pregnancy losses, spontaneous abortions, cytogenetics.

Введение

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) — потеря двух и более беременностей подряд, затрагивающая до 5% супружеских пар в популяции — является сложной проблемой как для клиницистов, так и для пациентов. Наиболее частые причины ПНБ — иммунологические, гормональные, анатомические аномалии у женщины, носительство хромосомных перестроек у супругов и аномалии кариотипа самого эмбриона. Однако около половины случаев ПНБ — идиопатические, причины которых остаются неустановленными. Роль генетических факторов при ПНБ несомненна, учитывая, что распространенность привычного выкидыша среди родственников первой степени родства выше в 2–7 раз, по сравнению с основной популяцией. Средняя частота хромосомных аномалий у спонтанных абортусов человека составляет около 50% [1], и если считать возникновение хромосомных аномалий случайным событием, то, независимо от кариотипа первого выкидыша, последующий в половине случаев должен быть цитогенетически нормальным.

Целью данной работы было определить, существует ли закономерная повторяемость хромосомной конституции (нормальной или аномальной) у спонтанных абортусов от одной супружеской пары.

Материал и методы

Объектом настоящего исследования были спонтанные абортусы, поступившие из гинекологических отделений и акушерских клиник г. Томска и Северска, при этом врач заполнял специальную регистрационную форму с указанием возраста, акушерско-гинекологического анамнеза женщины, числа и исхода предыдущих беременностей, морфологических характеристик эмбриона. Женщине предоставлялась полная информация относительно целей и способа проведения цитогенетической диагностики причин невынашивания беременности, и она подписывала информированное согласие. Проведение исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики (г. Томск).

Исследуемая группа состояла из 51 женщины с двумя и более потерями беременности. Средний возраст женщин составил $29,7 \pm 5,6$ года (19–41, медиана 30 лет), а

средний срок беременности $9,7 \pm 2,8$ недель (3,7–19,1, медиана 9,2 недель). Среднее число беременностей на женщину составило $3,9 \pm 2,0$ (медиана 3), а среднее число выкидышей — $2,5 \pm 1,4$ (медиана 2). Акушерско-гинекологические анамнезы женщин были проанализированы на наличие предрасположенности к ПНБ (наследственная тромбофилия, антифосфолипидный синдром и другие гормональные, иммунологические и хронические воспалительные заболевания женской половой сферы, которые могли послужить этиологическими факторами повторных выкидышей). У 25 женщин в анамнезе было рождение живого ребенка (вторичное ПНБ), у 26 пациенток детей не было (первичное ПНБ).

Операционный материал, представляющий собой фрагменты плодного мешка, стерильно доставляли в лабораторию. Ткани плодного мешка отмывали от крови и отделяли от децидуальных тканей. Кариотип эмбрионов был получен с использованием комбинации нескольких методов: стандартный цитогенетический анализ (73 образца), CGH (29 образцов), FISH и aCGH (по 3 образца). Хромосомные препараты для стандартного GTG-анализа получали после культивирования экстраэмбриональных тканей в среде DMEM/F12 (1:1) с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки. Процесс культивирования, фиксации и получения хромосомных препаратов, а также методы проведения CGH, FISH и aCGH описаны в [2].

Вычисление статистической значимости различий между частотами сравниваемых показателей проводили с использованием критерия χ^2 , сравнения между группами проводили с применением непараметрического критерия Манна–Уитни. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Вычисляли отношение шансов (OR) потери второго эмбриона с таким же кариотипом (нормальным или аномальным), как и у первого абортуса. Так как в выборке были семьи, в которых прокариотипировано 3 и 4 абортуса, то расчет (OR) проводили двумя способами: I — предыдущий абортус vs все последующие, II — оценивались все сочетания кариотипов эмбрионов.

Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, г. Томск) с использованием материалов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Результаты

Всего было прокаротипировано 108 случаев повторной гибели эмбриона в 51 семье: у 46 женщин был получен анализ кариотипа двух абортусов, у 4 женщин — 3 абортусов, и у одной женщины проанализировано 4 погибших эмбриона. В соответствии с кариотипом эмбрионы относили к группе «нормальный кариотип» (46,XX или 46,XY) или к группе «аномальный кариотип» (все типы хромосомных аномалий). Женщин подразделяли на 4 группы: А — оба эмбриона с аномалиями кариотипа; В — 1-й (предыдущий) абортус с нормальным, 2-й (последующий) с аномальным кариотипом; С — 1-й абортус с аномальным, 2-й с нормальным кариотипом; D — оба абортуса с нормальным кариотипом (табл. 1). После гибели эмбриона с аномальным кариотипом следующий абортус гораздо чаще был также с аномальным, чем с нормальным кариотипом (72% и 28% соответственно). Если предыдущий абортус имел нормальный кариотип, последующий также в большинстве случаев (73,1%) был нормальным, а аномальный кариотип встречался в 26,9% случаев (табл. 1).

Отношение шансов (OR) потери второго эмбриона с таким же кариотипом (нормальным или аномальным), как и у первого абортуса, по I способу составило $OR = 6,98$ (95% CI: 2,04—23,88; $p = 0,0013$), по II способу $OR = 7,84$ (95% CI: 2,48—24,80; $p = 0,0002$). Таким образом, обнаружена повышенная вероятность того, что последующий абортус будет иметь такой же кариотип (либо нормальный, либо аномальный), что и предыдущий.

У 37% (19/51) женщин все погибшие зародыши были с нормальным кариотипом, из них у 7 пациенток имелась патология репродуктивной системы, однако

у 10 женщин не было выявлено патологии, обуславливающей невынашивание беременности, включая одну женщину с тремя, и одну — с четырьмя абортусами с нормальным кариотипом (табл. 2). Кроме того, среди пациенток из этой группы было больше случаев первичного ПНБ, при котором у женщины не было беременностей, завершившихся рождением живого ребенка (табл. 2).

Оба выкидыша с аномалиями кариотипа имели 35% (18/51) женщин с ПНБ, из них у 6 женщин аномалии эмбрионов представляли собой повторные трисомии по различным хромосомам (гетеротрисомии), еще в одной семье оба абортуса имели трисомию хромосомы 16. Одиннадцать случаев повторной гибели эмбрионов с аномальным кариотипом оказались сочетанием различных типов аномалий: трисомии с триплоидией (4 семьи), трисомии с тетраплоидией (4 семьи), трисомии с моносомией X (2 семьи) и мозаичной моносомии аутосомом с тетраплоидией (1 семья). В группе А средний возраст женщин с двумя трисомными выкидышами был достоверно выше, чем у женщин с двумя выкидышами с различными типами аномалий ($33,1 \pm 3,45$ и $28,7 \pm 5,78$ соответственно, $p = 0,025$).

По данным гинекологического обследования, 35% (18/51) женщин были здоровы, 59% (30/51) имели гормональные, иммунологические или воспалительные заболевания женской половой сферы, ассоциированные с невынашиванием (материнский фактор), и для 6% (3/51) данные отсутствовали. Интересно, что по наличию материнского фактора, предрасполагающего к невынашиванию беременности, статистически значимых отличий между группами не было (табл. 2). Следует отметить, что повторные хромосомные аномалии эмбрионов и наличие

Таблица 1

Сочетания кариотипов абортусов у женщин с ПНБ

1-й абортус	2-й абортус	Группа	Число женщин (%)	Возраст женщин	Число эмбрионов
Аномальный	Аномальный	А	18 (72,0)	$30,4 \pm 5,4$	36
	Нормальный	С	7 (28,0)	$30,7 \pm 5,1$	15
Нормальный	Аномальный	В	7 (26,9)	$33,1 \pm 6,2$	16
	Нормальный	D	19 (73,1)	$27,5 \pm 5,3^*$	39

Примечание. * — статистически значимые отличия по возрасту от групп А и В

Таблица 2

Сравнительная характеристика групп женщин по анамнестическим показателям

Группы	ПНБ: первичное/вторичное	Число беременностей	Число выкидышей	Материнский фактор: есть/нет
А	9/9	$3,5 \pm 1,9$	$2,1 \pm 1,4^{**}$	5/12
В+С	4/10	$5,1 \pm 2,2$	$2,9 \pm 1,6$	6/8
D	13/6*	$3,3 \pm 1,5$	$2,5 \pm 1,0$	7/10

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверные отличия; * — статистически значимые отличия по наличию живорожденных детей от группы В+С; ** — статистически значимые отличия по числу выкидышей от группы В+С.

у женщины этиологических факторов привычного невынашивания не являются взаимоисключающими, их сочетание встретилось довольно часто. В группе А пять из 17 женщин имели такую патологию, в том числе и женщина с наследственной тромбофилией и 8 спонтанными абортми в анамнезе, у которой оба прокариотипированных эмбриона имели аутомсомные трисомии.

Так как группы В и С представляли собой женщин, у эмбрионов которых сочетались нормальные и аномальные кариотипы, и по всем характеристикам эти группы не различались, мы объединили их в единую группу (В+С). Оказалось, что женщины их этой группы имели большее число беременностей и большее число выкидышей, чем остальные (табл. 2). При этом и число живорожденных детей в этой группе было несколько выше, но уровня статистической значимости выявленные отличия достигали только по сравнению с группой D.

Обсуждение

ПНБ затрагивает до 5% супружеских пар в популяции, при этом примерно у половины из них причина повторных случаев эмбриональной гибели остается невыявленной. Известно, что хромосомная патология обуславливает 50–60% случаев спонтанных абортми у человека [3]. Это означает, что при случайном повторении событий невынашивания беременности, независимо от кариотипа первого выкидыша, второй должен быть цитогенетически нормальным в половине случаев. Однако полученные в настоящей работе данные допускают существование неслучайного распределения кариотипов абортми, во всяком случае, у части женщин: если предыдущий эмбрион имел нормальный кариотип, то вероятность последующей потери эмбриона с нормальным кариотипом составляла 73%. Если же предыдущая потеря беременности была вызвана хромосомными аномалиями зародыша, то вероятность того, что следующий абортми будет цитогенетически нормальным, составила лишь 28% (табл. 1). Сходное распределение наблюдалось и для абортми с хромосомными аномалиями: кариотип второго из двух последовательных спонтанных абортми был аномальным в 72% случаев, если предыдущий зародыш был анеуплоидным, и только в 27% случаев, если предыдущий абортми имел нормальный кариотип. Отношение шансов потери второго эмбриона с таким же (нормальным или аномальным) кариотипом, как и у первого абортми, составило $OR = 6,98$ (или $OR = 7,84$ в зависимости от способа расчета). Таким образом, обнаружена повышенная вероятность того, что последующий абортми будет иметь такой же кариотип, что и предыдущий. Сходные наблюдения описаны в работе Хассольда: если предыдущий зародыш был анеуплоидным, то кариотип второго абортми был аномальным приблизительно в 70% случаев, а если предыдущий абортми имел нормальный кариотип — то только в 20% случаев [4]. Это позволяет предположить, что у части су-

пружеских пар имеет место повторяемость хромосомной конституции погибших эмбрионов. По-видимому, повторная гибель эмбрионов с нормальным кариотипом и повторные потери беременности вследствие хромосомных аномалий зародышей представляют собой два различных состояния, обусловленных разными механизмами формирования.

Повторная гибель эмбрионов с нормальным кариотипом

При кариотипировании двух или более последовательных абортми от 273 женщин было установлено, что нормальный хромосомный статус погибшего эмбриона значительно повышает вероятность того, что последующий абортми также будет иметь нормальный кариотип [5]. В ряде других работ также отмечается, что если первый обследованный абортми имел нормальный кариотип, то и последующие абортми в этих семьях также имели нормальный хромосомный набор [4]. Вероятно, что в семьях с ПНБ и цитогенетически нормальными абортми действует некий постоянный неблагоприятный фактор, не всегда диагностируемый стандартными методами акушерско-гинекологического обследования, который распространяется на все беременности, и ведет к повторным потерям эмбрионов с нормальным хромосомным набором.

В нашем исследовании 13 из 19 женщин в этой группе (D) не имели ни одной благополучно завершившейся беременности (первичное ПНБ), что больше, чем в других группах (табл. 2). Возраст женщин с повторными потерями эмбрионов с нормальными кариотипами оказался статистически значимо ниже ($27,5 \pm 5,3$ года) по сравнению с женщинами из других групп (табл. 1). Известно, что с увеличением возраста женщин повышается частота хромосомных аномалий у эмбрионов. Более частая гибель эмбрионов с нормальным кариотипом у молодых женщин согласуется с этим фактом, а наличие повторных выкидышей свидетельствуют о существовании неустановленной патологии у данной супружеской пары.

Таким образом, женщины с абортми с нормальным кариотипом имеют меньше живорожденных детей, ПНБ у них формируется в более молодом возрасте, чем у женщин других групп, а причины гибели эмбрионов для большинства из них остаются не выявленными. По данным Стефенсон с соавторами, у женщин с ПНБ нормальный кариотип предыдущего абортми связан с неблагоприятным прогнозом в последующей беременности [6]. В исследовании на японской популяции установлено, что у пациенток с кариотипически нормальным абортми следующая беременность закончилась невынашиванием в 62% случаев, тогда как у пациенток с аномальным кариотипом плода аборт произошел лишь у 38% женщин ($p = 0,01$) [7]. Все это позволяет заключить, что наличие повторных выкидышей с нормальным кариотипом является наименее благоприятным вариантом с точки зрения прогноза исхода последующей беременности.

Повторные потери беременности вследствие хромосомных аномалий зародышей

Проведенный в настоящей работе анализ выявил довольно высокую вероятность того, что обе потери беременности у женщины вызваны аномалиями кариотипа эмбриона — 35% (18/51). Исследования, где анализировали кариотипы нескольких абортусов от одной и той же пациентки, немногочисленны. Самое масштабное из них, проведенное на двух выборках женщин — в Нью-Йорке и Гонолулу — было опубликовано в 1987 году [5]. Частота повторной потери анеуплоидных эмбрионов в Нью-Йорке составила 19,2% (24/125), а в Гонолулу 27,7% (41/148). По данным других исследователей частота повторных хромосомных аномалий еще ниже: в штате Юта (США) она была равна 10% (3/30) [8] и в Польше — 13% (3/23) [9]. Обнаруженная в нашей популяции частота статистически значимо выше, чем в других выборках, кроме сравнения с популяцией Гонолулу. Так как общая частота хромосомных аномалий у спонтанных абортусов в Томской популяции составляет 46,6% при ПНБ и 56,7% при спорадических абортах [10] и не превышает средних мировых значений этого показателя [3], повышенная частота повторной гибели эмбрионов с аномалиями кариотипа не могла быть вызвана более частой их встречаемостью в целом. Популяционная специфичность хоть и не может быть исключена, но ее вероятность невелика, учитывая тот факт, что частоты спонтанных абортусов и частоты хромосомных аномалий среди них довольно сходны в различных изученных популяциях [1, 3]. Более вероятным представляется, что у некоторых женщин имеются факторы, предрасполагающие к формированию эмбрионов с нарушениями кариотипа.

В литературе описано несколько случаев, когда супружеская пара имела три и более абортуса с аномалиями кариотипа, чаще всего это были трисомии по различным хромосомам, хотя встречались и полиплоидии. Специальное исследование семей, имеющих нескольких абортусов с аномалиями кариотипа, было предпринято Робинсон с соавторами. Оказалось, что типы аномалий хромосом сходны с аномалиями у спорадических абортусов, почти все трисомии возникали в результате ошибок в мейозе матери, не было выявлено увеличения повторяемости одной и той же аномалии в семье по сравнению с ожидаемой при случайном совпадении. Так как средний возраст матерей в выборке равнялся 38 годам, авторы сделали вывод, что основной предрасполагающий фактор повторных случаев анеуплоидии у абортусов — это увеличение частоты случайных ошибок сегрегации хромосом вследствие большого возраста матерей [11]. Однако в нашем исследовании средний возраст матерей с повторяющимися аномальными кариотипами абортусов был заметно ниже (30 лет). Интересно, что внутри этой группы средний возраст женщин с двумя трисомными выкидышами оказался статистически значимо выше, чем у женщин с двумя выкидышами с различными типами аномалий ($33,1 \pm 3,45$ и $28,7 \pm 5,78$ соответственно, $p = 0,025$).

Случаи повторения триплоидий среди абортусов от одной женщины также встречаются, хотя и гораздо реже [12]. Филдес с соавторами описали женщину 34 лет с 18 абортами, шесть из которых были проанализированы и все оказались триплоидными, причем механизм возникновения триплоидии — неспособность корректно завершить II деление мейоза. Интересно, что и мать пациентки также имела ПНБ с 18 спонтанными абортами в анамнезе. В этом и подобных случаях существование генетических особенностей, предрасполагающих к формированию аномалий кариотипа у эмбриона, не вызывает сомнения, но такие пациенты весьма редки.

Повторные случаи хромосомных аномалий абортусов могут быть следствием нескольких причин.

1. Случайное повторение в результате повышения риска хромосомного нерасхождения с увеличением возраста матери. Эта точка зрения основывается на анализе значительной по размеру выборки (273 женщины с двумя прокариотипированными абортусами), в котором не было обнаружено повышенного риска трисомии у эмбриона, если предыдущий абортус был трисомным либо имел другую хромосомную аномалию. Это позволило авторам сделать вывод о том, что повторные анеуплоидии вносят вклад в повторное невынашивание лишь у незначительной части пациентов [5].

2. Гонадный мозаицизм у родителей. Наличие анеуплоидного клона в гонадах может приводить к неоднократному появлению зародышей с одинаковыми аномалиями. Но так как зарегистрированные редкие случаи повторных трисомий с участием одной и той же хромосомы (гомотрисомии) включают хромосомы 15, 16 и 22 — одни из самых часто встречающихся аномалий у спонтанных абортусов [13], нельзя исключить возможность случайного совпадения. Специальное исследование позволило сделать вывод о том, что случаи гонадного мозаицизма, если и имеют место, то очень редки, и не вносят значимого вклада в этиологию ПНБ [11].

3. Повышенный по сравнению со среднестатистическим для данного возраста риск мейотического нерасхождения у некоторых женщин. Это может быть обусловлено, например, генетической вариабельностью частоты мейотической рекомбинации, мутациями в генах, контролирующих процесс мейоза, процессами биологического старения яичников, которые могут варьировать у женщин одного биологического возраста. Поиск связи определенных генетических вариантов у родителей с нарушениями кариотипа эмбрионов проводится весьма активно. Например, было обнаружено, что генотипы гена *MTHFR* — важного фермента метаболизма фолиевой кислоты, влияют на продукцию анеуплоидных эмбрионов. Значимо более высокая частота анеуплоидных эмбрионов (70,3 %) выявлена у матерей-носительниц минорных аллелей полиморфных вариантов *MTHFR* 677T и/или *MTHFR* 1298C, по сравнению с носительницами частых аллелей (57,9 %) [14]. Пока неясно, каков может быть механизм этого явления, возможно, аномалии ме-

таболизма фолатов ведут к аберрантному метилированию ДНК и повышению вероятности анеуплоидии. Мутации в гене *SYCP3* (Synaptonemal complex protein 3), белок которого является существенным компонентом синаптонемального комплекса, обнаружены у женщин с ПНБ [15]. Однако масштабное полногеномное ассоциативное исследование, включающее 2362 матерей, 2360 отцов, 20798 бластомеров и 15388 биопсий трофоэктодермы, проведенное специально для поиска генетических вариантов у родителей, связанных с нарушениями кариотипа у эмбрионов, не выявило ассоциаций частоты нерасхождения хромосом в оогенезе с генотипом матери [16].

4. Повышенный риск соматического нерасхождения в раннем эмбриогенезе. Для раннего эмбрионального развития человека характерна высокая частота хромосомного мозаицизма, в том числе и у морфологически нормальных эмбрионов. Применение FISH выявило, что мозаичные варианты хромосомных аномалий, возникшие уже в процессе эмбрионального развития, широко распространены и в материале спонтанных абортусов. Косвенные аргументы в пользу того, что существует межиндивидуальная вариабельность по частоте соматического нерасхождения у потомков, получены в исследовании Дельханты. Обнаружено, что некоторые пациентки продуцировали «хаотических» эмбрионов повторно в нескольких циклах ЭКО, тогда как у других пациенток такие эмбрионы не встречались вообще [17]. В исследовании на ооцитах показано неслучайное распределение хромосомных аномалий в ооцитах некоторых женщин, что свидетельствует о существовании предрасположенности к нерасхождению. ДНК более 20 тысяч эмбрионов (3- и 5-дневных) и более 2 тысяч их родителей генотипировали с использованием SNP-чипов (single nucleotide polymorphism), в результате чего была обнаружена ассоциация нарушений кариотипа эмбриона, возникших в первых митотических делениях, с распространенным вариантом (AA) rs2305957 гена *PLK4* (*Polo-like kinase 4*) [16]. Продукт этого гена играет роль в удвоении центриолей, и как избыток, так и недостаток его приводят к индукции хромосомной нестабильности. Совсем недавно опубликованы данные, полученные в Китае при обследовании 530 женщин с ПНБ и более 2 тысяч женщин с бесплодием, подвергшихся процедуре ЭКО. Было показано, что женщины с генотипом AA по данному полиморфному варианту (rs2305957) из группы с бесплодием имеют сниженный показатель частоты формирования бластоцист, а в группе с ПНБ носительство данного варианта оказалось связано с невынашиванием беременности [18].

Так как выборки женщин с несколькими прокариотипированными абортусами ограничены вследствие сложности сбора материала, риск нерасхождения хромосом у зародышей оценивали также по данным пренатальных и преимплантационных исследований. Масштабный анализ 2856 кариотипов, полученных при пре-

натальной диагностике у женщин, имевших ранее трисомную беременность или спонтанный абортус с трисомией, продемонстрировал существование повышенного риска гетеротрисомии (т.е. трисомии по другой хромосоме) в последующей беременности [19]. Результаты еще ряда исследований, проведенных в различных популяциях, демонстрируют сходные закономерности: у женщин, имевших ранее анеуплоидию у зародыша, обнаружена повышенная вероятность анеуплоидии при следующем зачатии, особенно это характерно для молодых (<35 лет) пациенток [20]. Эти работы свидетельствуют в пользу гипотезы, что у некоторых женщин аномальные кариотипы зародышей формируются чаще, чем если бы это было случайным событием.

Таким образом, повышенная частота повторных потерь эмбрионов с аномалиями кариотипа, обнаруженная в данной работе, может быть связана с индивидуальными особенностями некоторых женщин, предрасполагающими к хромосомным аномалиям у зародышей. Пока неясен механизм такой предрасположенности, особенно если у эмбрионов встречаются абберации различных типов. Маловероятно, чтобы наличие конкретного типа аномалии могло быть связано с повышенным риском возникновения другого типа аномалий, так как в их формирование вовлечены различные механизмы (нерасхождение при трисомии, анафазное отставание при моносомии X, диспермия или нарушения мейоза при триплоидии и сбой митоза при тетраплоидии), и такие сочетания скорее всего случайны. Однако у женщин с однотипными повторными аномалиями кариотипа абортусов представляется интересным проанализировать генетические и эпигенетические особенности с использованием современных методов — анализа метилирования, вариаций числа копий ДНК (CNV), однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и секвенирования следующего поколения для поиска точковых мутаций.

Список литературы

1. Никитина ТВ, Лебедев ИН. Цитогенетика привычного невынашивания беременности. Генетика. 2014;50(5): 501-514.
2. Лебедев ИН, Никитина ТВ. Цитогенетика нарушений эмбрионального развития человека (Наследственность и здоровье): учебно-методическое пособие — Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2013. — 124 с.
3. van den Berg MM, van Maarle MC, van Wely M, et al. Genetics of early miscarriage. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822:1951-1959.
4. Hassold T.J. A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions. *Am. J. Hum. Genet.* 1980;32:723-730.
5. Warburton D, Kline J, Stein Z, et al. Does the karyotype of a spontaneous abortion predict the karyotype of a subsequent abortion? — Evidence from 273 women with two karyotyped spontaneous abortions. *Am. J. Hum. Genet.* 1987;41:465-483.
6. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum. Reprod.* 2002;17: 446-451.

7. Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzomori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil. Steril.* 2000;73:300-304.
8. Sullivan AE, Silver RM, LaCoursiere DY, et al. Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage. *Obstet. Gynecol.* 2004;104:784-788.
9. Skrzypczak J, Kwinecka-Dmitriew B, Zakrzewska M, Lantos-Bielenska A. Do chromosomal abnormalities reappear in subsequent pregnancies and how often? *Ginekol Pol.* 2010;81(9):681-686.
10. Nikitina TV, Sazhenova EA, Tolmacheva EN, et al. Comparative cytogenetic analysis of spontaneous abortions in recurrent and sporadic pregnancy losses. *Biomed Hub.* 2016.1.:446099 (DOI: 10.1159/000446099)
11. Robinson W, McFadden DE, Stephenson MD. The origin of abnormalities in recurrent aneuploidy/polyploidy. *Am. J. Hum. Genet.* 2001;69:1245-1254.
12. Filges I, Manokhina I, Penaherrera MS, et al. Recurrent triploidy due to a failure to complete maternal meiosis II: whole exome sequencing reveals candidate variants. *Molecular Human Reproduction.* 2015;21(4):339-346.
13. Lebedev I. Mosaic aneuploidy in early fetal losses. *Cytogenet Genome Res.* 2011;133:169-183.
14. Enciso M, Sarasa J, Xanthopoulou L, et al. Polymorphisms in the MTHFR gene influence embryo viability and the incidence of aneuploidy. *Hum Genet.* 2016;135:555-568.
15. Sazegary A, Kalantar SM, Pashaiefar H, et al. The T657C polymorphism on the SYCP3 gene is associated with recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet.* 2014 Oct;31(10):1377-1381.
16. McCoy RC, Demko Z, Ryan A, et al. Common variants spanning PLK4 are associated with mitotic-origin aneuploidy in human embryos. *Human genetics.* 2015;348(6231):235-238.
17. Delhanty JD, Harper JC, Ao A, et al. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet.* 1997;99(6):755-760.
18. Zhang Q, Li G, Zhang L, Sun X, et al. Maternal common variant rs2305957 spanning PLK4 is associated with blastocyst formation and early recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* 2017 Apr;107(4):1034-1040.e5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.01.006.
19. Warburton D, Dallaire L, Thangavelu M, et al. Trisomy recurrence: a reconsideration based on North American data. *Am. J. Hum. Genet.* 2004;75:376-385.
20. de Souza E, Halliday J, Chan A, et al. Recurrence risks for trisomies 13, 18, and 21. *Am J Med Genet A* 2009;149A: 2716-2722.