

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ЭКОНОМИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МУЛЬТИДИСЦИПЛИНАРНЫЕ АСПЕКТЫ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЫ**

**СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ
I МЕЖДУНАРОДНОГО ФОРУМА
«МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА –
НОВАЯ МОДЕЛЬ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ XXI ВЕКА:
ТЕХНОЛОГИИ, ЭКОНОМИКА, ОБРАЗОВАНИЕ»**

26-27 июня 2013 года

*Под научной редакцией И.А. Максимцева, В.И.
Ларионовой*

**ИЗДАТЕЛЬСТВО
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
ЭКОНОМИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
2013**

ББК 65.304.9

М 90

Мультидисциплинарные аспекты молекулярной медицины: сборник материалов I Международного форума «**Молекулярная медицина – новая модель здравоохранения XXI века: технологии, экономика, образование**». 26-27 июня 2013 года / под науч. ред. И.А. Максимцева, В.И. Ларионовой. – СПб. : Изд-во СПбГЭУ, 2013.

ISBN 978-5-7310-2915-5

Сборник содержит материалы докладов и статьи участников I Международного форума «Молекулярная медицина – новая модель здравоохранения XXI века: технологии, экономика, образование».

Молекулярная медицина является основой современной доказательной клинической медицины, появление которой стало возможным благодаря внедрению технологий.

Медицина и лабораторная диагностика должны быть готовы к стремительно развивающемуся мировому прогрессу в технологиях, что потребует соответствующих знаний в сфере экономики.

Сборник предназначен преподавателям и студентам медицинских, биологических, технических, экономических и юридических факультетов университетов, а также специалистам сферы здравоохранения.

ББК 65.304.9

Редакционная коллегия: д-р экон. наук, проф. **И.А. Максимцев**
д-р мед. наук, проф. **В.И. Ларионова**
канд. биол. наук **Н.В. Ковалева**

Рецензенты: д-р экон. наук, проф. **А.Е. Карлик**
д-р физ-мат. наук, проф. **А.М. Ельяшевич**
д-р мед. наук, проф. **Е.В. Шайдаков**

ISBN 978-5-7310-2915-5

© Коллектив авторов, 2013

Содержание

ПРИВЕТСТВИЕ	11
Churilov L.P., Stroev Y.I., Utekhin V.I., Balakhonov A.B., Molitvin M.N., Kovač Z.	
How to Teach a Physician-Pathologist? Pathophysiology transforms into Systemic Pathobiology Being an Introductory Course of Translational Medicine.....	15
Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B.	
Real problems for the implementation of postgenomic technologies in medical practice.....	18
Jacak J., Schaller S., Sams M., Borgmann D., Silye R., Winkler S.M.	
Nanoscope mapping of serotonin receptor (5-HT1AR) and spatial cluster analysis for classification of fixed brain tissues.....	19
Kochetova O.V., Korytina G.F., Akhmadishina L.Z., Victorova T.V., Mustafina O.E.	
Polymorphism P450 genes in three ethnic groups from Republic of Bashkortostan.....	23
Афанасьев А.П., Ледащева Т.А., Кинунен А.А., Блинова В.А.	
Ортопедические осложнения у детей при нейрофиброматозе I типа.....	24
Ахмадишина Л.З., Корицина Г.Ф., Кочетова О.В., Урманцев М.Ф., Измайлова С.М., Измайлов А.А., Павлов В.Н., Викторова Т.В.	
Оценка роли полиморфных вариантов генов репарации ДНК XRCC1, XPD, XPA в развитии рака мочевого пузыря.....	26
Василишина А.А., Булатникова М.А., Глебова М.А., Котелевская Е.А., Смолянинов А.Б.	
Синдром Ретта: спектр мутаций в Северо-Западном регионе России.....	28
Воинова В.Ю., Юров И.Ю.	
Клинические особенности геномных и хромосомных аномалий у детей.....	30
Воинова В.Ю.	
Проблемы медико-генетического консультирования при геномных аномалиях.....	34
Вонский М.С., Рунов А.Л., Кулябина Т.В., Крылов А.И.,	37

Суворов В.И., Конопелько Л.А.	
Вопросы международной и национальной стандартизации биоаналитических измерений.....	
Воротеляк Е.А.	
Современные методы стимуляции и реконструкции волосяного фолликула.....	39
Ворсанова С.Г., Юров И.Ю., Воинова В.Ю., Куринная О.С., Зеленова М.А., Демидова И.А., Улас Е.В., Юров Ю.Б.	
Диагностика синдрома Ретта у девочек без мутаций в гене MECP2: использование молекулярного кариотипирования (аггау CGH).....	41
Вохмянина Н.В.	
Значение HLA-маркеров для диагностики целиакии.....	45
Гонзалго М., Ишханова Г.В.	
Биомаркер микроРНК и его использование в молекулярной медицине.....	47
Гончарова А.С., Золотухин П.В., Самсонов А.Е., Александрова А.А.	
Уровень плацентарного фактора роста (PlGF) при беременности, осложненной гестозом.....	50
Горовенко Н.Г., Костюкова Н.И., Россоха З.И., Кирьяченко С.П., Выдыборец С.В.	
Анализ клинико-генетических маркеров в прогнозировании лекарственного ответа и выживаемости пациентов с множественной миеломой...	52
Горовенко Н.Г., Кирьяченко С.П., Россоха З.И.	
Анализ генетического полиморфизма в прогнозировании потребности в реанимационной помощи у новорожденных.....	56
Горовенко Н.Г., Подольская С.В.	
Предиктивное генетическое тестирование: ожидаемое и действительное.....	60
Горовенко Н.Г.	
Вопросы генетического тестирования в постдипломном образовании врачей различных специальностей в Украине.....	62
В.И. Григорьев, В.Н. Григорьева	
Инновационные аспекты развития лечебной физической культуры в системе высшего профессионального образования.....	64
Давыдов-Синицын А.П., Баженова О.В., Лисковых М.А.,	69

Чечик Л.Л., Пономарцев С.В., Томилин А.Н., Толкунова Е.Н.	
Выделение культуры стволовых клеток рака кишечника.....	
Зайцева А.Т., Голубцов В.И. ¹ , Лазарев К.Ю., Корхмазова С.А.	
Опыт преподавания медицинской генетики в КубГМУ..	71
Золотухин П.В., Александрова А.А., Машкина Е.В., Покудина И.О., Родионов А.А., Самсонов А.Е., Шкурат Т.П.	
Интерактивно-ориентированное профилирование транскриптома плацент при тяжелом гестозе.....	74
Иванов М.В., Петрова Н.Н., Зубов Д.С., Чомская Н.М.	
Показатели безопасности сочетанного применения ЭСТ и антипсихотиков двух генераций при лечении больных шизофренией.....	76
Казарян И.В., Виссарионов С.В., Костик М.М., Ларионова В.И.	
Особенности костного метаболизма у детей с деформациями позвоночника.....	78
Ковалева Н.В., Альвовский И.К., Мельников Е.К.	
Медико-генетическая индикация зон дискомфорта проживания: показания к верификации молекулярно-генетическими методами.....	80
Ковалева Н.В.	
Инициативные специализированные регистры наследственной патологии как ценный ресурс и точки роста (на примере регистра болезни Дауна в Санкт-Петербурге).....	85
Козлова О.А.	
Рождение dizygotic близнецов от разных мужчин.....	92
Козловская М.А., Петрова Е.В., Мартыненко Л.С., Цыбакова Н.Ю., Иванова М.П., Шабанова Е.Л., Шуваев В.А., Абдулкадыров К.М., Мартынкевич И.С.	
Генетическая диагностика Ph-отрицательных хронических миелолифферативных заболеваний (ХМПЗ).....	98
Колотий А.Д., Ворсанова С.Г., Юров И.Ю., Демидова И.А., Кравец В.С., Куринная О.С., Шаронин В.О., Юров Ю.Б.	
Выявление микрореструктур при использовании хромосомного анализа высокого разрешения с	100

подтверждающей молекулярно-цитогенетической диагностикой у детей с недифференцированными формами умственной отсталости и нормальным кариотипом.....	
Кочетова О.В., Викторова Т.В.	
Полиморфизм генов STAT1, STAT3, IL-17A, IL-6, NFκB у женщин с аутоиммунным тиреоидитом и ожирением..	104
Кривенцова Н.В., Авруцкая В.В., Шокарев Р.А., Гимбут В.С., Кригер С.Ю., Клочкова Н.Е.	
Загрязнение материнскими клетками в плодных образцах при проведении инвазивной пренатальной диагностики.....	107
Кьергаард А.В., Мамон Л.А.	
Тепловое воздействие на мейоциты самцов <i>Drosophila melanogaster</i> индуцирует появление потомков с однокродительской дисомией по половым хромосомам....	109
Кьергаард А.В.	
Преподавание основ молекулярной генетики спорта в системе последиplomного образования спортивных врачей.....	113
Лавникевич Д.М., Медведева Т.В., Чилина Г.А., Васильева Н.В., Полищук А.Г.	
ПЦР-метод для обнаружения и идентификации патогенных грибов у пациентов с онихомикозом.....	116
Ледашева Т.А., Тулуш Е.К., Куранова М.Л., Спивак И.М.	
Атаксия-телеангиэктазия: диагностические критерии...	119
Липатова Л.В., Серебряная Н.Б., Сивакова Н.А.	
Маркеры воспалительного ответа у больных эпилепсией.....	121
Любченко Л.Н., Филиппова М.Г., Портной С.М., Любченко Л.Н.	
Стратегия молекулярно-генетической диагностики при злокачественных новообразованиях женской репродуктивной системы.....	124
Моисеева Е.В., Аронов Д.А., Семушина С.Г., Боженко В.К.	
Преимущества новой парадигмы экспериментальной онкологии: индивидуальный прогноз исхода иммунотерапии на основании анализа суррогатных биомаркеров.....	126
Нишева Е.С., Макарова Т.А., Соколова Н.Е., Маларева Е.В ² , Каплин Н.Н., Майхуб М.	130

Иммунограмма при инфекционном мононуклеозе у детей Нишева Е.С., Макарова Т.А., Соколова Н.Е., Маларева Е.В., Каплин Н.Н., Майхуб М.	
Дифференциальный диагноз иммунограмм при В- клеточных иммунодефицитах и инфекционном мононуклеозе у детей.....	132
Нишева Е.С., Акопян А.С., Каган А.В., Каплин Н.Н., Майхуб М.	
Новый способ исследования хемотаксиса.....	134
Нишева Е.С., Акопян А.С., Каган А.В., Каплин Н.Н., Майхуб М.	
Нарушения хемотаксиса у детей с первичным перитонитом.....	136
Осадчук Т.В., Новикова И.В., Савенко Л.А., Шепелевич Е.В., Плевако Т.А., Крицкая Т.М., Подлещук Л.В.	
Редкий случай мозаицизма в результате диплоидизация триплоидии и нарушения сегрегации хромосомы 18 и половых хромосом.....	138
Пальцев М.А., Полякова В.О., Кветной И.М., Коновалов С.С., Кветная Т.В. Линькова Н.С., Крылова Ю.С., Дурнова А.О., Толибова Г.Х., Литвякова О.М., Седов Е.В., Козлов К.Л.	
Экспрессия сигнальных молекул в буккальном эпителии: новые возможности молекулярной диагностики заболеваний человека.....	140
Пальцев М.А., Кветной И.М.	
Нейроиммуноэндокринология: сигнальные молекулы как диагностические и прогностические маркеры социально значимых заболеваний.....	143
Пантелеев В.Г.	
Практика применения микроскопии в доказательной медицине.....	146
Петрова Е.В., Козловская М.А., Мартыненко Л.С., Иванова М.П., Цыбакова Н.Ю., Зюзгин И.С., Карягина Е.В., Грицаев С.В., Абдулкадыров К.М., Мартынкевич И.С.	
Особенности и прогностическая ценность молекулярно- генетических повреждений у больных ОМЛ и МДС.....	148
Петросян М.А., Толибова Г.Х., Горячая Т.С., Крылова Т.А., Дурнова А.О., Петрова Л.И., Полякова В.О.	
Клеточная модель для фармакологического изучения молекулярно-клеточных механизмов действия	151

гестагенов.....	
Платова А.И., Мирошниченко И.И.	
Моделирование фармакокинетики анастрозола на целевой популяции женщин в постменопаузе.....	153
Райдан М., Шубин Н.А., Блинова М.И., Прохоров Г.Г., Пинаев Г.П. Устойчивость к низким температурам клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки.....	156
Рунов А.Л., Вонский М.С., Кулябина Т.В., Крылов А.И. Стандартизация биоаналитических измерений нуклеиновых кислот.....	158
Саженова Е.А., Скрябин Н.А., Лепшин М.В., Минаичева Л.И., Вовк С.Л., Лебедев И.Н. Эпимутации импринтированных генов при невынашивании беременности.....	160
Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Однородительская дисомия в клинической практике: синдром Прадера-Вилли.....	163
Семёнов А.В. Частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови больных с солидными опухолями.....	166
Сироткина О.В., Суринт Н.А., Горбунов Г.Н., Вавилова Т.В. Применение алгоритма лабораторного молекулярно-генетического исследования для оценки функционального состояния тромбоцитов и оптимизации антиагрегантной терапии у больных, оперированных на артериях нижних конечностей.....	168
Траль Т. Г., Толибова Г. Х., Сердюков С. В. Морфофункциональная оценка причин замершей беременности.....	171
Шульгин Д.А., Колбасин Л.Н., Донников М.Ю., Сичинава Е.П., Урванцева И.А. Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов MTHFR, MTR, MTRR и клинико-анамнестических данных с гипергомоцистеинемией у женщин Югорского региона.....	173
Эрдман В.В., Туктарова И.А., Насибуллин Т.Р., Каримов Д.Д., Сахаутдинова Г.М., Мустафина О.Е. Молекулярно-генетическое исследование продолжительности жизни: анализ полиморфизма	175

генов-кандидатов.....	
Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Куринная О.С., Зеленова М.А., Юров Ю.Б. Иновационные технологии в диагностике геномных аномалий у детей с идиопатическими формами умственной отсталости.....	180
Юров Ю.Б., Ворсанова С.Г., Юров И.Ю. Молекулярная цитогенетика и геномика заболеваний аутистического спектра.....	183
Zdenko Kovač Today's education for tomorrow's health. Integrative algorithms and etiopathogenetic clusters as study methods to bridge the chasm between the basic science and practical medicine.....	185
Барабанова Л.В., Баженова О.В., Дукельская А.В., Москаленко С.Е., Рогоза Т.М., Мамон Л.А. О преподавании курса «Общая генетика» на медицинском факультете Санкт-Петербургского государственного университета.....	198
Брайко О.П., Лазарев К.Ю., Голубцов В.И. Варианты и частота генетических полиморфизмов ферментов детоксикации ксенобиотиков у детей с врожденным изолированным дефектом межжелудочковой и предсердной перегородок в Краснодарском крае.....	203
Васильева Т.А., Хлебникова О.В., Тимковская Е.Е., Зинченко Р.А. Предварительные результаты клинико-генетических исследований врожденных пороков развития радужки в Российской Федерации.....	207
Горovenko Н.Г., Кирьяченко С.П., Россоха З.И. Анализ генетического полиморфизма в прогнозировании потребности в реанимационной помощи у новорожденных.....	213
Гречанина Е.Я., Гречанина Ю.Б., Здыбская Е.П., Молодан Л.В. Сочетание хромосомного и генного полиморфизма с дефицитом трансаминазы гаммааминомасляной кислоты как эпигенетическая болезнь.....	217
Дубинина Е.Е., Щедрина Л.В., Ковругина С.В. Окислительный стресс в патогенезе психоневрологически расстройств.....	225

Дурнова А.О., Судалина М.Н., Лищук С.В., Бондарев Н.Э. Кисспептины – новые потенциальные маркеры различных опухолей яичников.....	232
Кветной И.М., Прощаев К.И., Кветная Т.В., Ильницкий А.Н. Мелатонин как биомаркер старения и возрастной патологии.....	239
Крылова Ю.С., Шарфи Ю.Н. Прогнозирование исхода ЭКО: значение экспрессии рецепторов эстрогена, прогестерона, лейкемию ингибирующего фактора и анамнестических особенностей пациенток.....	247
Куранова М.Л., Ледашева Т.А., Тулуш Е.К., Рунов А.Л., Молодан Л.А., Гречанина Е.Я., Плескач Н.М., Спивак И.М., Михельсон В.М. Протеинкиназа АТМ и длина теломер при атаксии-телеангиэктазии.....	255
Лифшиц Г.И., Кох Н.В., Слепухина А.А., Солдатова Г.С. Опыт внедрения фармакогенетического тестирования на модели многопрофильного медицинского центра.....	266
Маньковская С.В. Мутация BRAF^{T1799A} – частое молекулярное событие патогенеза папиллярной микрокарциномы щитовидной железы.....	274
Осадчук Т.В., Новикова И.В., Савенко Л.А., Шепелевич Е.В., Плевако Т.А., Крицкая Т.М., Подлещук Л.В. Пренатальная ДНК-диагностика наиболее частой хромосомной патологии на основе количественной флуоресцентной ПЦР (КФ-ПЦР) в Беларуси.....	280
Осадчук Т.В., Новикова И.В., Савенко Л.А., Шепелевич Е.В., Плевако Т.А., Крицкая Т.М., Подлещук Л.В. Пренатальная ДНК-диагностика наиболее частой хромосомной патологии на основе количественной флуоресцентной ПЦР (КФ-ПЦР) в Беларуси.....	285
Румянцева Н.В., Осадчук Т.В., Наумчик И.В., Жевнеронок И.В., Качан Ю.П. Доминантные формы наследственной моторно-сенсорной нейропатии I типа: клинико-молекулярно-генетическая диагностика в Беларуси.....	291
Рубанович А.В., Хромов-Борисов Н.Н. Воспроизводимость и предсказательная ценность результатов в генетике предрасположенностей.....	298

Хромов-Борисов Н.Н.	315
Современное общедоступное программное обеспечение статистического анализа в молекулярной медицине и генетике. Мастер-класс.....	307
Хромов-Борисов Н.Н., Рубанович А.В.	
Эволюционная медицинская геномика.....	315
Чурилов Л.П., Строев Ю.И., Утехин В.И., Цинзерлинг В.А., Балахонов А.В., Молитвин М.Н., Ковач З.	
Как учить врача-патолога? Патофизиология преобразуется в системную патобиологию и служит введением в трансляционную медицину.....	324

Дорогие друзья!

26 и 27 июня 2013 Санкт-Петербургский государственный экономический университет гостеприимно распахнет свои двери, чтобы принять участников **I Форума «Молекулярная медицина – новая модель здравоохранения XXI века: технологии, экономика, образование»**.



СПбГЭУ всегда находился в авангарде научной мысли. Поддержка и реализация самых передовых инновационных проектов, эффективное сотрудничество с крупнейшими производственными компаниями в различных отраслях, гармоничное сочетание науки и практики – уже долгие годы являются визитной карточкой университета.

Медицина является одной из самых наукоемких отраслей современности. Это та область, которая крайне важна как для каждого отдельного человека, так и для человечества в целом. От того, насколько быстро идеи становятся передовыми разработками, а разработки реализуются в массовом производстве зависит уровень жизни миллионов людей.

Благодаря внедрению высоких технологий стало возможным появление молекулярной медицины. В последние десятилетия это направление стремительно развивается и является основой современной доказательной клинической медицины. Перспективы и потенциальные результаты исследований в этой области – колоссальны. Этим и вызвано столь пристальное внимание к данной тематике.

Медицина и лабораторная диагностика должны быть готовы к стремительно развивающемуся мировому прогрессу в технологиях. В этой связи возрастает потребность не только в узкоспециализированных знаниях, но и в соответствующих компетенциях в сфере экономики.

В России современные инновационные медицинские технологии могут быть успешно реализованы только в результате совместной работы специалистов здравоохранения, медицинских работников и экономистов при поддержке государства. Международный Форум «Молекулярная медицина – новая модель

здравоохранения XXI века: технологии, экономика, образование» призван стать площадкой для общения всех заинтересованных и вовлеченных сторон. К участию в нём приглашены ведущие эксперты России и зарубежных стран в области здравоохранения и экономики, учёные, представители университетов, руководители крупных производственных компаний и лечебных учреждений.

Желаю всем участникам Форума плодотворной и интересной работы, результаты которой стали бы основой для развития и повышений благополучия нашего общества!

Ректор СПбГЭУ,
д.э.н., профессор



Игорь Максимцев

Уважаемые коллеги!

Организация первого междисциплинарного форума «Молекулярная медицина – новая модель здравоохранения XXI века: технологии, экономика, образование» продиктована не только насущной потребностью медицинского сообщества в коллегиальном обсуждении значимых достижений, но и в необходимости использования открытий в смежных научных областях, практическому внедрению результатов исследований в клиническую практику, в учебный процесс подготовки современных специалистов.



Знаменательно, что Форум проводится в стенах Санкт-Петербургского Государственного Экономического Университета, одного из крупнейших экономических ВУЗов России, что показывает заинтересованность учебных учреждений в создании межотраслевых специалистов, обладающих не только обширными знаниями в своей специальности, но и в прочных знаниях в смежных областях науки.

Научная программа Форума ставит своей целью обсуждение перспектив развития молекулярной медицины благодаря активному внедрению новых технологий, экономических моделей, созданию междисциплинарных образовательных программ. Ведь помимо развития фундаментальных исследований, не меньшую важность имеет практическая реализация полученных достижений, а это становится возможным только при условии взаимодействия опыта различных областей, включающих в себя медицину, биологию, физику, химию, экономику, информационные и инженерные технологии, социологию и юриспруденцию.

К работе Форума приглашены ведущие специалисты в области медицины, организаторы здравоохранения, представители высшей школы, крупнейшие производители лабораторного оборудования и лидеры фармацевтической отрасли, ученые и руководители клиник, медицинских центров из разных стран мира. Только работая вместе, мы сможем плодотворно развивать создание инновационных институтов, позволяющих поднять здравоохранение на новый уровень, сформировать новую отрасль

медицинской науки и клинической практики – молекулярную медицину, разработать персонифицированные основы профилактики, диагностики и эффективной терапии заболеваний человека, а также успешного клинического применения гибридных, антропоморфных технических систем бионического типа, в том числе и на основе нанотехнологий.

От имени Организаторов приветствую всех участников и гостей I Международного Форума «Молекулярная медицина – новая модель здравоохранения XXI века: технологии, экономика, образование».

Желаю Вам творческих успехов, хорошего общения и плодотворной работы!

Заместитель директора НИЦ «Курчатовский институт»
по медико-биологическим исследованиям,
академик РАН и РАМН,



М.А.Пальцев

Как учить врача-патолога? Патофизиология преобразуется в системную патобиологию и служит введением в трансляционную медицину

Чурилов Л.П.^{1*}, Строев Ю.И.¹, Утехин В.И.¹, Балахонов А.В.², Молитвин М.Н.³, Ковач З.⁴

¹ Кафедра патологии, ² кафедра физиологии, медицинский факультет, ³ кафедра гистологии и цитологии, биолого-почвенный факультет,

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*197106, Россия, Санкт-Петербург, В.О. 21-я линия, д. 8а, оф. 111;

тел: +7 904 336 3017, эл. почта: elpach@mail.ru

⁴ Кафедра патофизиологии, Медицинский факультет, Загребский университет, Загреб, Хорватия

Ключевые слова: алгоритмизованное обучение, междисциплинарное обучение, патобиология, патофизиология, патология, проектно-ориентированное обучение, системный подход, типовые патологические процессы, трансляционная медицина, этиопатогенетические кластеры, язык медицины.

How to Teach a Physician-Pathologist? Pathophysiology transforms into Systemic Pathobiology Being an Introductory Course of Translational Medicine

Churilov L.P. ^{1*}, Stroeve Y.I.¹, Utekhin V.I.¹, Balakhonov A.B.², Molitvin M.N.³,

Kovač Z.⁴

¹Dept of Pathology, ²Dept of Physiology, School of Medicine, ³Dept of Histology & Cytology, Faculty of Biology & Soil Science, St. Petersburg State University,

Saint Petersburg, Russia

*of. 111, bld 8a, 21st line V.O., St. Petersburg, Russia, 197106

phone: +7 904 336 3017, e-mail: elpach@mail.ru

⁴Dept of Pathophysiology, School of Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Keywords: algorithmic learning, interdisciplinary teaching, etiopathogenetic clusters, medical thesaurus, pathobiology,

pathophysiology, pathology, project-oriented learning, systemic approach, translational medicine, typical pathological processes.

Pathophysiology as a science and curriculum discipline stands in front of biggest challenge of its history. It extended far beyond the limits of its historical name and embedded aspects of Pathochemistry, Immunopathology, Pathobiophysics and Pathoinformatics, intermingling with Translational Medicine. Similar process prevails in Anatomic Pathology, terminating the historical period of ramification between these two sister branches of Pathology. Teaching/learning of Pathology should be modernized in accordance with the needs of nowadays, under the bias of its integrative role for Medicine, analogous to that of Systems Biology among non-medical Life Sciences. Current Pathophysiology grew into clinics (via laboratory and functional diagnostic tests, which are controlled clinical experiments). Thus, physicians of functional diagnosis, clinical immunology, genetics and biochemistry services, those of autopsy units – are in fact close to pathobiologists and should be re-named into clinical pathologists. This term is entirely applicable to all above-mentioned specialists, and not only to anatomic pathologists, as it is currently misused in some states.

Every diagnostician has to compose a conceptual model of disease in order to explain and combine data for comprehension of a case. But, such modeling is inherent to Pathophysiology; hence competence of diagnostician is based on it. Holistic approach to patient, disease and education is traditional to Russian medicine. In our Departments, classical lab experiments are joint to early start of Clinical Pathology (5th term), combined with case history analysis and lectures co-delivered by both pathophysiological and clinician with patient demonstrations. In our teaching posters pathophysiological, pathomorphological, clinical and historical data are fused. Local net of digital TV-microscopes gives instant video archive of experimental results added to student's protocols of lab studies.

In classical biological education courses of Pathophysiology, Anatomic Pathology and Clinics are absent. In modern Medical curricula teaching/learning of research technologies, currently used by Molecular and Cell Biology is very limited and superficial. As a rule, a biology graduate is not able to be effective in translational medical studies, because of “innocence” in clinical medicine, or very poor knowledge of systemic holistic medical concepts.

At the same time, medical graduates are ineffective in this field also, because a poor knowledge of modern research technologies and

mathematical analysis of results makes them unable to formulate tasks, evaluate data and use resources properly. AS the result of this, development of Translational Medicine is retarded by the lack of competent staff.

Newly available “visibility” within the integral human body provides a new horizon that should be systemically integrated with the classical interpretations. It is high time for elaboration and introduction new inter-faculty based M.S. programmes in the field of Pathobiology, open both for bachelors of Biology and medical students after 4th year. Within their individual educational trajectories, the graduates of such admixed programmes will combine the advantages and compensate for weak facets of medical either biological background and achieve M.S. degree in Pathobiology & Translational Medicine.

Novel two-way teaching/learning clinical practice based approach seems to be resistant to main pitfalls of classical education. The algorithmic workout-based problem seminars give convenient way to dealing with complexity of reactivity and diseasomes, making four interdependent steps (exposition of problem, repetition of relevant knowledge, comprehension of pathogenesis and feedback integration). Algorithmic pathways often converge to more or less identical intersection points, the typical pathologic processes or corresponding etiopathogenetic clusters (EPC). The EPC have a multiple redundant inputs and multiple equifinal exits, so they are targets of therapeutic interventions. These are around 100 of mosaic blocks, interplaying in all nosological forms, like elements of Mendeleev table adjoined in any substance, so they give common hubs of the response within the natural network of pathobiological interactions.

Following 14 years of positive experience with algorithm model and four years with EPC model in teaching/learning practice in Croatia, this approach will be tested in the partner universities, including Russia. Hence, we collected considerable experience in interdisciplinary project-oriented and algorithmic learning. Existing curricula of Medicine are five or six years programmes started with basic courses followed by clinical ones. So, students are in need to study the two different frames of references, the scientific and the clinical ones. The 1st one is error-prone based on controlled experiment, time unlimited, not driven by the benefit reasoning, and has a high degree of experimental freedom.

The clinical reasoning tend not to make mistakes, it is time constrained within the natural course of diseases, and driven by the patient's benefit, within very narrow frame of researching freedom. These are challenges and important regulatory forces for medical

students and physicians. We interpret the role of modern Pathophysiology as bridging scientific and clinical modes of reasoning. Practical organization of health care into branches and sub-branches has generated a compartmentalization of medical profession.

Unlike other natural sciences, Medicine still did not elaborate a unified thesaurus and language identically accepted by all its subsets. Such thesaurus, as a pre-requisite of new thinking, should be based on the sub-language of Pathology.

Real problems for the implementation of postgenomic technologies in medical practice

Iourov I.Y.^{1,2,3}, Vorsanova S.G.^{1,2,4}, Yurov Y.B.^{1,2,4}*

¹FGBU "Mental Health Research Center of Medical Sciences" of the Russian Academy of Medical Sciences, Zagorodnoe sh.2

²FGBU "Moscow Institute of Pediatrics and Pediatric Surgery, Ministry of Health of the Russian Federation"

³Department of Medical Genetics, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russian Federation

⁴Moscow City University of Psychology and Education

*Zagorodnoe sh 2, Moscow 117152, Russian Federation

Tel. +7 4959528990, e-mail: ivan.iourov@gmail.com

Keywords: genome, DNA microarray, molecular karyotyping, genomic and chromosomal abnormalities

Postgenomic technologies provide for ultra rapid accumulation of huge amount of data on genome variations in health and disease. Consequently, difficulties in data mining and interpretations hinder the use of postgenomic data massives in medical practice. The data acquired by whole genome scan is the basis for personalized medicine inasmuch as it allows to determine molecular and cellular mechanisms of diseases and to define individual pharmacogenetic profile. Moreover, the lack of "medicine-oriented" postgenomic technologies makes molecular diagnosis almost useless limiting it to managing the knowledge about underlying disease causes as a fact without further attempts to develop molecular-based therapies and "roadmaps" for increasing health (life)-span and life quality. The solution of problems related to the use of

postgenomic technologies in medical practice is not associated with "backbreaking" requirements. Since a modern genome analyzing device is usually designed for evaluating/sequencing multiple targets in multiple samples, there is no apparent need for each molecular diagnosis facility to possess one. In this instance, the essential part of genome medicine work flow is data analysis and interpretation. To succeed, a center for collecting and interpreting data is certainly required. The result of its work is an extended description of genome variations relevant to patient's phenotype or, in other words, adaptation of basic genome research results to specific medical tasks (translational medicine). Our experience (translational genome analysis of 134 patients) indicates that the organization of molecular diagnosis and further genome/bioinformatic analysis for solving specific medical tasks according to the main principles of personalized medicine mentioned above is the easiest way to succeed on the road to the implementation of postgenomic technologies in medical practice.

Nanoscope mapping of serotonin receptor (5-HT1AR) and spatial cluster analysis for classification of fixed brain tissues

Jacak J.^{1,2*}, *Schaller S.*³, *Sams M.*¹, *Borgmann D.*³, *Silye R.*⁴, *Winkler S.M.*³

^{1*} School of Applied Health and Social Sciences, Upper Austrian University of Applied Sciences, Campus Linz, Garnisonstraße 21, 4020 Linz, Austria

² Institute of Applied Physics, Johannes Kepler University, Linz, Altenbergerstraße 69, 4020 Linz, Austria

³ Bioinformatics Research Group, Upper Austrian University of Applied Sciences, Campus Hagenberg, Softwarepark 11, 4232 Hagenberg, Austria

⁴ Nerve Clinic Linz, Department of Pathology and Neuropathology, Wagner-Jauregg Weg 15, 4020 Linz, Austria

Key words: (fluorescence microscopy, superresolution microscopy, serotonin receptor 5-HT1AR, cluster analysis)

Novel methods in fluorescence microscopy allow localization of single molecules with subdiffraction precision. One of the strengths of super-resolution microscopy is the accurate determination of the spatial

intra- and extracellular distribution of proteins and is less precise using conventional diffraction-limited optics [1, 2]. Recently, these techniques have also been adapted for imaging of human brain tissues [3-5]. In the following paper we invented STORM on post mortem routine brain tissue samples from neuropathology institutes, analysing Serotonin H1 receptor distribution.

In presented work direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM) was combined with immunocytochemistry using fluorescently labeled antibodies in order to mark and image serotonin receptors of paraffin fixed and cryo-preserved brain samples [6-8]. In the dSTORM the fluorophores are switched between a detectable fluorescent and a non-fluorescent (dark) state by a light induced chemical reaction [6, 7, 9]. This process is repeated many times and allows the reconstruction of protein distribution with single-molecule resolution.

Especially in the case of complex anatomical organs like the human brain the precise characteristics of receptor distribution could provide novel insights in brain tissue organization and function, the discrimination of receptors on neuronal and glial cells and finally classification of brains disease. Testing the model system, we have focused on the nanoscopic mapping of the well characterized serotonin receptor 5-HT_{1A}, a G-protein-coupled receptor widely distributed in regions of frontal cortex, septum, amygdale, hippocampus and hypothalamus. In recent years it has been found out that serotonin response strongly correlates with depressive symptoms (Major Depressive Disorder (MDD)), showing low brain 5-HT abundance and reduced density of serotonin 1A receptor (5-HT_{1AR}) and transporter (5-HTT) [10-13].

In this primarily technical study we developed a novel spatial method for analyzing dSTORM images of serotonin 5-HT_{1A} receptors in brain tissue (prefrontal cortex) samples using fluorescently labeled antibodies. For proper sample comparison we apply a cluster-based analysis at the single molecule level [14-16]. This special type of analysis uses the hierarchical clustering method for the linkage of receptor clusters with a given maximum distance between the receptor locations inside the cluster [17, 18]. This way, selected features of the clusters, such as shape, relative density and relative number of fluorophores are calculated. In general these statistical distributions form the basis for comparison of sample spatial patterns.

To enable anatomical orientation within the tissue of the frontal cortex, glial cells are also labeled with a second anti glial fibrillary

acidic protein (GFAP) antibody. Native and disease free brain tissue (cryo-preserved samples) was taken as a reference and compared to epitope retrieved and paraffin fixed tissue (perifrontal cortex) stored for different time periods. The comparison demonstrates the influence of longtime sample preservation, which is an important task for further studies on bank material; so far fixation artifacts have never been quantified on a nanoscopic level. Moreover, results on cluster densities, fluorophore numbers and shapes determined from healthy brain tissues were compared with post mortem brain samples from depressive patients. The results of this comparison prove that our method is suitable for characterization of receptor density changes and enabled tissue classification at a nanoscopic level.

Presented nanoscopic analysis of brain tissue is a powerful approach allowing a precise morphological modeling, which can be the basis for further neuropathological insights, especially in field of mental disease. An additional advantage of our method is its applicability on paraffin stored brain tissue samples. Consequently, defined pathological tissue collections are open for further investigations.

1. Shroff H. et al. 2008. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat. Methods*, V. 5, P. 417-423.
2. Shroff H., White H., Betzig E. 2008. Photoactivated localization microscopy (PALM) of adhesion complexes. *Curr. Protoc. Cell. Biol.*, Chapter 4, P. Unit 4 21.
3. Dani A., [Huang B.](#), [Bergan J.](#), et al. 2010. Superresolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron*, V. 68, P. 843-56.
4. Baddeley, D., [Crossman D.](#), [Rossberger S.](#), et al., 2011. 4D super-resolution microscopy with conventional fluorophores and single wavelength excitation in optically thick cells and tissues. *PLoS One*. V. 6, P. e20645.
5. Nanguneri, S., [Flottmann B.](#), [Horstmann H.](#), et al. Three-dimensional, tomographic super-resolution fluorescence imaging of serially sectioned thick samples. *PLoS One*, 2012, V. 7, P. e38098.
6. van de Linde, S., [Endesfelder U.](#), [Mukherjee A.](#), et al. 2009. Photochem. Photobiol. Sci., V. 8, P. 465-469.
7. van de Linde S., Sauer M., Heilemann M. 2008. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging of proteins in

- the mitochondrial inner membrane with photoswitchable fluorophores. *J. Struct. Biol.*, V. 164, P. 250-254.
8. Heilemann, M., Aufmkolk S., Franke C., et al. 2009. Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, V. 48, P. 6903-6908.
 9. Heilemann M., [Margeat E.](#), [Kasper R.](#), et al. 2005. Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch. *J. Am. Chem. Soc.*, V. 127, P. 3801-3806.
 10. Albert P.R., Lemonde S. 2004. 5-HT1A receptors, gene repression, and depression: guilt by association. *Neuroscientist*, V. 10, P. 575-593.
 11. Christiansen L., [Tan Q.](#), [Iachina M.](#), et al. 2007. Candidate gene polymorphisms in the serotonergic pathway: influence on depression symptomatology in an elderly population. *Biol. Psychiatry*, V. 61, P. 223-230.
 12. Hoyer D., Hannon J.P., Martin G.R. 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, V. 71, P. 533-554.
 13. Lambe E.K., [Fillman S.G.](#), [Webster M.J.](#), et al. 2011. Serotonin receptor expression in human prefrontal cortex: balancing excitation and inhibition across postnatal development. *PLoS One*. V. 6, P. e22799.
 14. Muresan L., Jacak J., Klement E.P., et al. 2010. Microarray analysis at single-molecule resolution. *IEEE Trans. Nanobioscience*, 9, P. 51-58.
 15. Qian H., Sheetz M.P., Elson E.L. 1991. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys. J.*, V. 60, P. 910-921.
 16. Wieser S., Schutz G.J. 2008. Tracking single molecules in the live cell plasma membrane-Do's and Don't's. *Methods*, V. 46, P. 131-140.
 17. Dixon P.M. 2006. Ripley's K Function. *Encyclopedia of Environmetrics*, John Wiley & Sons.
 18. Shakhnarovich G. T.D., Indyk P. 2006. *Nearest-Neighbor Methods in Learning and Vision*, ed. T.a. Practice, MIT Press.

Polymorphism P450 genes in three ethnic groups from Republic of Bashkortostan

Kochetova O.V.¹, Korytina G.F.¹, Akhmadishina L.Z.¹, Victorova T.V.^{1,2},

Mustafina O.E.¹

¹ Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Federation;

² Bashkir State Medical University, Russian Federation

Yfa, Pr. Oktyabrya 8347 2356088, Olga_mk78@mail.ru

Key words: cytochrome P450, polymorphism, ethnic groups, pharmacogenetic studies

Objectives. To determine the prevalence of the most common allelic variants of *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP2C9*, *CYP2E1*, *CYP2F1*, *CYP2J2* and *CYP2S1* in a representative sample of the three ethnic groups (Russians, Tatars and Bashkirs) from Republic of Bashkortostan (Russian Federation), and to compare the results with published data on other populations.

Materials and methods. *CYPs* genotypes were determined in DNA samples of 742 healthy unrelated individuals from three ethnic groups. The polymorphisms of *CYPs* genes were examined using PCR-RLFP method.

Results. Analysis of the *CYP1A1* (rs1048943, rs4646903), *CYP1A2* (rs762551), *CYP2E1* (rs2031920) allele, genotype and haplotype frequencies revealed significant differences among healthy residents of Republic of Bashkortostan of different ethnicities. Distribution of allele and genotype frequencies of *CYP1A2* (rs35694136), *CYP1B1* (rs1056836), *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910), *CYP2F1* (rs11399890), *CYP2J2* (rs890293), *CYP2S1* (rs34971233, rs338583) genes were similar in Russians, Tatars, and Bashkirs. Analysis of the *CYPs* genes allele frequency distribution patterns among the ethnic groups from Republic of Bashkortostan in comparison with the different populations worldwide was conducted.

Conclusion. The peculiarities of the allele frequency distribution of *CYPs* genes, in the ethnic groups of Republic of Bashkortostan should be taken into consideration in association with pharmacogenetic studies. The results of present investigation will be of a great help in elucidating the genetic background of drug response, susceptibility to cancer and to complex diseases, as well as in determining the toxic potentials of environmental pollutants in our region and in pharmacogenetic studies.

The work was supported by the Russian humanitarian scientific Fund №13-06-00633.

Ортопедические осложнения у детей при нейрофиброматозе I типа

Афанасьев А.П.^{1}, Ледащева Т.А.²⁻³, Кинунен А.А.³, Блинова В.А.³*

¹ ГБОУ ВПО СПбГПМУ * 194100 Россия, Санкт-Петербург, Литовская ул. 2, Тел.: +7 812 294 70 02, e-mail: ardan_afanasiev_ledashcheva@mail.ru ² ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И.Мечникова Минздрава России ³ Пб ГКУЗ Диагностический центр (медико-генетический), Российская Федерация

Ключевые слова: нейрофиброматоз I типа, дети, ортопедические проблемы

Orthopedic complications in children with neurofibromatosis type I

Afanasiev F.P.^{1}, Ledasheva T.A.²⁻³, Kinunen A.A.³, Blinova V.A.³*

¹ St. Petersburg State Pediatric Medical Academy * Litovskaya str. 2, St. Petersburg, Russian Federation, 194100, Phone: +7 812 294 70 02, e-mail: ardan_afanasiev_ledashcheva@mail.ru

² North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov ³ St. Petersburg Centre for Medical Genetics, Russian Federation

Key words: neurofibromatosis type I, children, orthopedic problems

Введение. Нейрофиброматоз I типа (НФ1) (синоним: болезнь Реклингхаузена, МIM:162200) относится к генетически детерминированным заболеваниям с поражением нервной системы, кожи, глаз, внутренних органов. Частота костных аномалий по данным разных авторов составляет 21-74%. Цель работы заключалась в анализе частоты патологии костной системы в структуре НФ1 и в разработке схем диспансерного наблюдения с применением лучевых методов обследования для диагностики на доклинической стадии, что может способствовать адекватной профилактике и лечению.

Материалы и методы. Проведено обследование 576 больных с НФ1, и в 96% была зарегистрирована различная костная патология. Для верификации изменений использовалась комплексная лучевая диагностика: рентгенография, компьютерная

и магнитно-резонансная томография, ультразвуковое исследование.

Результаты наблюдений свидетельствовали о вариабельности НФ1, в том числе и со стороны опорно-двигательного аппарата. Расхождение диагноза направления больных с подозрением на патологию костной системы и уточненным диагнозом НФ1 составило 6,5% по анализу 338 случаев. Спектр изменений был представлен задержкой роста (23%), прогрессирующим сколиозом/кифосколиозом (76,5%). 9,2% пациентов имели патологию нижних конечностей, из них 36,1% составили нейрофибромы трубчатых костей, 3,8% - неостогенные фибромы голеней. Имелись 7 наблюдений с деформацией грудной клетки (преимущественно воронкообразной). Наблюдалась редкие случаи сочетания НФ1 с болезнью Пертеса и множественными экзостозами. Врожденные ложные суставы, ассоциированные с НФ1, выявлены у 13,9% пациентов. Оперативное лечение проведено в 100% случаев с целью устранения ложных суставов, но в динамике у всех пробандов отмечено формирование опухолей головного мозга, а в одном случае - феохромоцитомы. У 121 пациента в возрасте от 6 до 17 лет с тяжелыми деформациями позвоночника и грудной клетки было проведено хирургическое лечение. Отмечается большое количество осложнений и потери коррекции в послеоперационном периоде. Задержка роста являлась клинически значимой для НФ1. Несоответствие костного и паспортного возраста выявлено в 65,9% случаев, из них в 37% отмечалось его ускорение, а в 63% - замедление.

Заключение. Характерными особенностями НФ1 является широкий спектр поражения тканей. Одним из ведущих являлась патология опорно-двигательного аппарата с наиболее частой деформацией позвоночника. Хирургическое лечение детей с ортопедическими осложнениями при НФ 1 является трудной задачей и с большим количеством осложнений. Регулярное диспансерное наблюдение с проведением комплексного клинικο-лучевого обследования и профилактические мероприятия, позволяют предупредить развитие тяжелых форм костно-суставной патологии при НФ1 и начать своевременно лечение.

Оценка роли полиморфных вариантов генов репарации ДНК *XRCCI, XPD, XPA* в развитии рака мочевого пузыря

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

¹ Институт биохимии и генетики уфимского научного центра Российской академии наук, Россия

² Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия

*450054, Уфа, Пр.Октября, 71, тел./факс: 2356088,

e-mail: l.akhmadishina@gmail.com

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, полиморфные варианты, гены репарации ДНК

An estimation of the role of *XRCCI, XPD, XPA* DNA repair gene polymorphisms in bladder cancer development

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

¹ Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Federation

² Bashkortostan State Medical University, Ufa, Russian Federation

* Russian Federation, Ufa, 450054, Pr.Octyabrya, 71, tel/fax: (347) 2356088,

e-mail: l.akhmadishina@gmail.com

Key words: bladder cancer, polymorphisms, DNA repair genes.

Введение. Рак мочевого пузыря составляет, по данным ВОЗ, около 3% от всех злокачественных новообразований. В структуре заболеваемости злокачественными опухолями у мужчин он занимает 6-е место в большинстве развитых стран. Женщины болеют в 3-4 раза реже. За последние годы отмечается тенденция к увеличению частоты этого заболевания. Важными патогенетическими составляющими являются следующие факторы: задержка мочи в мочевом пузыре, активное курение и генетическая компонента. Формирование последней обусловлено различными сочетаниями мутаций и полиморфных вариантов генетических систем, задействованных в процессе канцерогенеза, в частности, генов

системы репарации ДНК. В литературе имеются исследования, посвященные изучению генов репарации ДНК при раке мочевого пузыря. Однако результаты, полученные разными исследователями в различных популяциях мира, носят противоречивый характер и требуют подтверждения на дополнительных выборках пациентов.

Цель исследования заключалась в оценке вклада полиморфных локусов генов репарации ДНК *XRCC1* (с.839G>A и с.1196A>G), *XPB* (с.2251A>C) и *XPA* (с.-4A>G) в развитие рака мочевого пузыря у жителей Республики Башкортостан.

Материал и методы. Проведен молекулярно-генетический анализ образцов ДНК, выделенной из лимфоцитов периферической венозной крови 306 больных раком мочевого пузыря (из них 168 с мышечно-инвазивной формой и 124 с мышечно-неинвазивной) и 271 практически здоровых жителей Республики Башкортостан, подобранных по возрасту, полу и этнической принадлежности. Полиморфные локусы генов анализировали методом ПЦР-ПДРФ с последующим вертикальным гель-электрофорезом в 6–8% ПААГ, окрашиванием в растворе бромистого этидия и фотографированием в проходящем ультрафиолетовом свете. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программ Microsoft Access, Excel, BIOSTAT, Hardy-Weinberg equilibrium calculator, SNPStats.

Результаты. Ассоциация с раком мочевого пузыря была выявлена для аллеля А полиморфного локуса с.839 G>A гена *XRCC1* в аддитивной модели (OR=5.23, 95%CI (2.57-10.66)) в этнической группе татар. Анализ в зависимости от статуса курения показал, что генотип G/A обнаруживался чаще у курящих больных раком мочевого пузыря (OR=1.96, 95%CI (1.15-3.36), p=0.05). Также было показано, что маркер с.839 G>A гена *XRCC1* вносит вклад в развитие неинвазивного и инвазивного рака мочевого пузыря. Для генотипа A/A локуса с.1196A>G гена *XRCC1* была показана ассоциация с риском развития рака мочевого пузыря в рецессивной модели (OR=2.29, 95%CI (1.21-4.30), p=0.0082) у русских. Аналогичная ассоциация была показана и для курящих. Локус с.2251A>C гена *XPB* ассоциировал с устойчивостью к развитию рака мочевого пузыря в аддитивной модели для этнической группы татар (p=0.0003, OR=0.48, 95%CI (0.32-0.72)), рецессивной - для башкир (p=0.0083, OR=0.12, 95%CI (0.01-0.94)).

Заключение. Проведён анализ ассоциации полиморфных локусов генов репарации ДНК *XRCC1*, *XPA*, *XPB* с риском развития и тяжестью течения рака мочевого пузыря. С наименьшим

уровнем значимости выявлена ассоциация с заболеванием локуса *XRCC1* 839 G>A в этнической группе татар ($p < 0.0001$), показана протективная роль полиморфного варианта с.2251A>С гена *XPB* при развитии рака мочевого пузыря.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов ГНТП РБ № 17/2-Б), РГНФ № 13-06-00101 и РФФИ № 13-04-00287 А

Синдром Ретта: спектр мутаций в Северо-Западном регионе России

Василишина А.А.^{1,2,3*}, *Булатникова М.А.*^{1,2}, *Глебова М.А.*², *Котелевская Е.А.*^{1,2}, *Смолянинов А.Б.*^{1,2}

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Россия

² ООО «Покровский банк стволовых клеток», Россия

³ Институт цитологии РАН, Россия

* Кирочная ул., д. 41, Санкт-Петербург, Россия, 191015

E-mail: vasilishina.a@gmail.com

Ключевые слова: Синдром Ретта, MECP2

Rett syndrome: mutation spectrum in the Northwestern region of Russia

Vasilishina A.A.^{1,2,3*}, *Bulatnikova M.A.*^{1,2}, *Glebova M.A.*², *Kotelevskaya E.A.*^{1,2}, *Smolyaninov A.B.*^{1,2}

¹ North-Western State Medical University named after I.I.Mechnikov, Russia

² Stem Cell Bank Pokrovski, Russia

³ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Russia

* Kirochnaya str., 41, Saint-Petersburg, Russia, 191015,

vasilishina.a@gmail.com

Key words: Rett syndrome, MECP2

Введение. Синдром Ретта – одно из наиболее частых генетических заболеваний с умственной отсталостью у женщин. Встречается с частотой в среднем 1 на 10 тыс. живорожденных девочек [1]. У мальчиков этот синдром обнаруживается крайне

редко. Подавляющее большинство случаев являются спорадическими, описаны семейные случаи. Основная причина заболевания - мутации в гене MECP2, расположенном на X-хромосоме. Мутации в этом гене являются доминантными и, как правило, летальными для гемизиготных мальчиков.

По мировым данным, при классическом варианте синдрома Ретта мутации в гене MECP2 при секвенировании обнаруживаются в 60-90% случаев [2, 3, 4]. В группах пациенток с классическим синдромом, у которых при секвенировании мутации в гене MECP2 выявлены не были, приблизительно в 30% случаев обнаруживаются делеции целых экзонов или полностью гена MECP2 [5, 6]. При атипичных вариантах синдрома доля носителей мутаций или делеций MECP2 составляет 40-50% [3]. Известны 8 мажорных мутаций, которые в сумме составляют более 50% от всех выявляемых мутаций в данном гене.

Цель работы - обнаружение и характеристика мутаций гена MECP2 у пациенток с синдромом Ретта Северо-западного региона РФ.

Материал и методы. Обследованы 17 девочек с установленным клиническим диагнозом синдрома Ретта или с подозрением на данный синдром. Геномная ДНК выделялась из лимфоцитов периферической крови пациенток. На первом этапе проводилось секвенирование кодирующей части гена MECP2 (3, 4 экзоны с прилегающими участками интронов). На втором этапе проводился поиск протяженных делеций (отдельных экзонов или целого гена) методом мультиплексной лигазной цепной реакции (MLPA) с помощью набора зондов MRC-Holland. Анализ продуктов секвенирования и MLPA проводили с использованием системы капиллярного электрофореза CEQ8800 (Beckman Coulter).

Результаты. Из 17 обследованных девочек у 12 (70,6%) были выявлены патогенные мутации: с.473C>T (p.T158M), с.763C>T (p.R255X), с.502C>T (p.R168X), с.808C>T (p.R270X), с.880C>T (p.R294X), с.316C>T (p.R106W), с.401C>G (p.S134C), с.55C>T (p.Q19X), с.753delC (p.G252fs). У одной пациентки выявлена молчащая мутация: с.942C>T (p.I314I). Протяженные делеции не обнаружены. Все выявленные мутации описаны в международной базе данных RettBASE. Новые мутации не обнаружены. Из выявленных мутаций 6 являются мажорными. Наиболее часто определяемая в мире мутация MECP2:с.473C>T обнаружена в трех случаях, а третья по частоте мутация с.763C>T выявлена дважды. Таким образом, выявлены 6 нонсенс-мутаций, 5

миссенс-мутация, 1 мутация со сдвигом рамки считывания и 1 синонимичная замена.

Выводы: Частота выявляемости мутаций в гене MECP2 у пациентов с синдромом Ретта и спектр мутаций соответствуют мировым данным.

Список литературы

1. Neul J.L., Kaufmann W.E., Glaze D.G., et al. 2010. Rett Syndrome: Revised Diagnostic Criteria and Nomenclature. *Ann Neurol.*, V. 68, P. 944–950.
2. Бабенко О.В., Стрельников В.В., Залетаев Д.В. 2011. Молекулярно-генетические аспекты и диагностика синдрома Ретта. Под ред. М.А. Пальцева. *Введение в молекулярную диагностику*. М.: Медицина, Т.2, С.192.
3. Percy A.K., Lane J.B., Childers J., et al. 2007. Rett syndrome: North American database. *J Child Neurol.*, V. 22, P. 1338–1341.
4. Neul J.L., Fang P., Barrish J., et al. 2008. Specific mutations in Methyl-CpG-Binding Protein 2 confer different severity in Rett syndrome. *Neurology*, V. 70, P. 1313–1321.
5. Ravn K., Nielsen J.B., Skjeldal O.H., Kerr A., Hulten M., Schwartz M. 2005. Large genomic rearrangements in MECP2. *Hum Mutat.*, V. 25, P. 324.
6. Archer H.L., Whatley S.D., Evans J.C., et al. 2006. Gross rearrangements of the MECP2 gene are found in both classical and atypical Rett syndrome patients. *J. Med Genet.*, V. 43, P. 451–456.
- 7.

Клинические особенности геномных и хромосомных аномалий у детей

Воинова В.Ю.^{1,2,3}, Юров И.Ю.^{1,2,4*}

¹ФГБУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава России», Москва

²ФГБУ «Научный центр психического здоровья» РАМН, Москва

³ГБОУ ВПО Московский городской психолого-педагогический университет, Москва ⁴Кафедра медицинской генетики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России, Москва

*Загородное шоссе 2, Москва 117152, Россия, Тел. +7 4959528990?

E-mail: ivan.iourov@gmail.com

Ключевые слова: аутизм, синдром Ретта, умственная отсталость, геном, ДНК-микроматрица, молекулярное кариотипирование, геномные и хромосомные нарушения.

Clinical features of genomic and chromosomal abnormalities in children

Voinova V.Y.^{1,2,3}, *Iourov I.Y.*^{1,2,4*}

¹Institute of Paediatrics and Paediatric Surgery, Ministry of Health

²Research Center of Mental Health, RAMS, Moscow, Russia; Moscow, Russia

³Moscow City University of Psychology and Education

⁴Department of Medical Genetics, RMAPO, Ministry of Health of Russia, Moscow

*Zagorodnoe sh 2, Moscow 117152, Russian Federation, Tel. +7 4959528990, e-mail: ivan.iourov@gmail.com

Keywords: autism, Rett syndrome, mental retardation, genome, DNA microarray, molecular karyotyping, genomic and chromosomal abnormalities

Появление в последние годы высокоразрешающих геномных технологий, таких как молекулярное кариотипирование (arrayCGH), и применение их в клинической практике, с одной стороны, осуществило прорыв в клинической генетике, касающийся повышения эффективности диагностики генетических заболеваний, а с другой стороны, поставило перед клиницистами ряд новых проблем, одна из которых связана с вопросом клинической значимости выявляемых аномалий. Молекулярное кариотипирование позволяет выявлять вариации количества копий ДНК (copy number variations, CNV) в геноме. Сам по себе термин CNV не несёт информации о клинической значимости, поэтому при его употреблении в диагностической практике следует дополнительно указывать, является ли конкретный CNV патогенным или же доброкачественным. Высокое разрешение новых методов привело к открытию того факта, что вариации количества копий ДНК распространены, как в виде безвредных популяционных полиморфных вариантов, так и в виде патогенных мутаций. Решение вопроса о клинической значимости CNV становится сложной задачей для практического врача, учитывая существование нейтральных CNV и постоянное обнаружение всё

новых их вариантов. Если CNV относятся к редким, или ранее не были представлены в литературе, то особое значение приобретает применение биоинформатического анализа [1, 2, 3], без которого невозможна корректная интерпретация результатов молекулярного кариотипирования.

Несмотря на сложности интерпретации результатов, метод молекулярного кариотипирования предоставил клиницистам новые возможности в диагностике наследственных заболеваний. Прежде всего были открыты и стали доступными для диагностики новые микроделеционные и микродупликационные синдромы, количество которых очень велико. В качестве примера можно привести синдром дупликации Xq28. Для заболевания характерны задержка роста, микроцефалия, широкое лицо, эпикант, аномальные ушные раковины, маленький рот, аномалии неба, гипотония лицевых мышц и конечностей, спастичность, тяжелая умственная отсталость, аномалии гениталий, судороги, тяжелые респираторные инфекции. В течение последних 3-х лет благодаря использованию в диагностике геномных технологий нами наблюдалось четверо детей с данной патологией, что подтверждает результаты тех исследований, в которых указывается на синдром дупликации Xq28, как на частую причину умственной отсталости у мальчиков.

К новым возможностям метода молекулярного кариотипирования следует отнести его успешное применение в диагностике моногенных заболеваний. С помощью молекулярного кариотипирования в последние годы открыт ряд новых генов-кандидатов для моногенных заболеваний (синдромы CHARGE, Peters Plus, Pitt-Hopkins и др.). Дело в том, что с увеличением разрешающей способности молекулярного кариотипирования стало возможным обнаружение несбалансированных аномалий генома размером с один ген или часть гена. Так, нами наблюдалась девочка с микроделцией, которая захватывала 21 экзон гена *SMARCA2* из 34-х. Клинические проявления у нее полностью соответствовали синдрому Николаидес-Барайцера, ассоциированному с мутациями гена *SMARCA2*: задержка физического и психоречевого развития, гипотрихоз в области мозговой части черепа при нормальном росте волос в других частях тела, утолщение межфаланговых суставов, пупочная и паховая грыжи, специфические особенности лица в виде грубых черт, расширяющегося книзу носа с открытыми вперед ноздрями, широкого длинного филтрума, большого рта с утолщенной

нижней губой. Другим примером диагностики моногенного заболевания с помощью молекулярного кариотипирования является обнаружение микроделеции гена *MECP2* у девочек без точковых мутаций данного гена [4, 5]. Молекулярное кариотипирование не только позволило нам подтвердить клинический диагноз синдрома Ретта у этих детей, но и предполагать существование нового варианта этого заболевания, возникающего в результате микроделеций гена *MECP2* и имеющего легкие клинические проявления по сравнению с классическим синдромом Ретта. Таким образом, к показаниям для проведения молекулярного кариотипирования в последние годы стали относить моногенные болезни. Молекулярное кариотипирование показано особенно тем больным, у которых не обнаружено точковых мутаций в соответствующем заболеванию гене.

Нередко встречаются случаи наличия одновременно нескольких аномалий генома у одного и того же больного. Эти аномалии вносят вклад в клинические проявления и создают комплексную картину заболевания, которую невозможно было бы объяснить без применения метода молекулярного кариотипирования. Так, в нашей практике наблюдался больной с синдромом Клайнфельтера, микроделецией 1p36 и синдромом Паллистера-Киллиана одновременно. Без молекулярного кариотипирования невозможно было бы поставить эти диагнозы.

В заключение следует отметить, что внедрение геномных технологий в клиническую практику позволило значительно повысить эффективность диагностики генетических причин недифференцированной задержки психомоторного развития детей. Исследование частично поддержано грантом Президента Российской Федерации (МД-4401.2013.7).

Список литературы

1. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. 2006. Chromosomal variation in mammalian neuronal cells: known facts and attractive hypotheses. *Int. Rev. Cytol.*, Vol.249, P.143-191.
2. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. 2008. Molecular cytogenetics and cytogenomics of brain diseases. *Curr. Genomics*, Vol. 9, P.452-465.
3. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. 2012. Single cell genomics of the brain: focus on neuronal diversity and

- neuropsychiatric diseases. *Curr. Genomics*, Vol. 13, P.477-488.
4. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Куринная О.С. и др. 2012. Генетические аспекты психологических и поведенческих нарушений у детей с аутистическими расстройствами и трудностями в обучении: диагностика геномных и хромосомных нарушений с использованием ДНК-микрочипов. *Современные проблемы науки и образования*, №3; (дата обращения: 27.06.2012). URL: www.science-education.ru/103-6449
 5. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Kurinnaia O.S. et al. 2012. Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy, and congenital anomalies. *Mol. Cytogenet.*, Vol.5, 46.

Проблемы медико-генетического консультирования при геномных аномалиях

Воинова В.Ю.^{1,2,3}

¹ФГБУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава России», Москва

²ФГБУ «Научный центр психического здоровья» РАМН, Москва

³ГБОУ ВПО Московский городской психолого-педагогический университет, Москва

*Загородное шоссе 2, Москва 117152, Россия, Тел. +7 4959528990

Ключевые слова: медико-генетическое консультирование, молекулярное кариотипирование, геномные и хромосомные нарушения.

The problems of medical genetic counseling of patients with genomic abnormalities

Voinova V.Y.^{1,2,3}

¹Institute of Paediatrics and Paediatric Surgery, Ministry of Health

²Research Center of Mental Health, RAMS, Moscow, Russian Federation

³Moscow City University of Psychology and Education

⁴Department of Medical Genetics, RMAPO, Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russian Federation

*Zagorodnoe sh 2, Moscow 117152, Russian Federation, Tel. +7 4959528990

Keywords: medical genetic counseling, molecular karyotyping, genomic and chromosomal abnormalities.

При медико-генетическом консультировании семей с геномными аномалиями, клиническая значимость которых не вызывает сомнений, прежде всего важно знать, являются ли обнаруженные у пробанда CNV унаследованными или же представляют собой мутации *de novo*. Полученные в результате обследования с помощью результаты молекулярного кариотипирования членов семьи часто сложны для интерпретации. Каждый CNV и каждая семья имеют свои особенности, что требует активного взаимодействия лабораторных генетиков и врачей.

CNV, возникающие de novo. В случае, если CNV у пробанда является мутацией *de novo*, риск повторного рождения больного ребенка обычно равен общепопуляционному. Усложнить эту интерпретацию может отсутствие установленного отцовства. Если для дополнительного анализа доступен только один из родителей, и исследуемый CNV у него не обнаружен, заключение о риске для последующих беременностей делать нельзя.

Унаследованные CNV. Когда CNV обнаруживается у родителя или другого члена семьи, следует учитывать множество факторов. Родитель и другие близкие родственники должны пройти тщательное медицинское обследование на предмет наличия либо отсутствия симптомов, имеющих у пробанда. В случае, если *родитель имеет клинические проявления заболевания*, аналогичные пробанду, как правило, риск для последующих беременностей составляет 50% для CNV, связанных с аутосомами. При X-сцепленном CNV, в случае наличия заболевания у матери, риск его передачи составит 50% для детей обоих полов, но тяжесть проявления патологии у дочери будет зависеть от особенностей её X-инактивации. При X-сцепленных CNV у отца исключается их передача ребенку мужского пола. Ряд заболеваний отца (например, мужское бесплодие вследствие делеций,

затрагивающих локус AZF на Y хромосоме) передаются с вероятностью 100% только сыновьям. Наиболее сложны для консультирования случаи унаследованных CNV, если родитель является здоровым носителем. Как правило, это можно воспринимать как доказательство независимости болезни от CNV.

Однако существует ряд случаев, когда это не так. Первый случай аналогичен ситуации с хромосомными заболеваниями, когда родитель является носителем сбалансированной хромосомной аномалии (например, сбалансированной транслокации) и имеет при этом высокий риск рождения детей с несбалансированной перестройкой хромосом. Необходимы дополнительные цитогенетические и молекулярно-цитогенетические технологии (FISH) для корректного проведения медико-генетического консультирования подобных семей. Неполная пенетрантность: CNV может быть патогенным, но не проявляться у родителя, следовательно риск заболевания у будущих детей может достигать 50%. Варьирующая экспрессивность: родитель – носитель CNV может иметь легкие симптомы вызванной этим CNV болезни, следовательно риск составит до 50%. Эффекты импринтинга: затрагиваемый CNV участок хромосомы может быть подвержен импринтингу, так что болезнь будет проявляться только при наследовании от родителя определенного пола (а у родителя, в свою очередь, она не проявляется из-за наследования от прадеда другого пола). У пробанда, имеющего CNV, проявляется клиническая картина заболевания с аутосомно-рецессивным наследованием. Вторая мутация не определяется при молекулярном кариотипировании: (например, у пробанда наблюдается сочетание делеции, унаследованной от одного родителя, и недетектируемой геномными методами мутации в гене внутри того же участка хромосомы, унаследованная от второго родителя). Риск для будущих беременностей составит в этом случае 25%. Мозаицизм по CNV у родителя: CNV может не присутствовать во всех тканях родителя, следовательно, и болезнь не будет проявляться у него в полной мере, однако риск повторных случаев заболевания у детей может быть высок, если патологический клон клеток затрагивает гонады родителя. CNV у исходного пациента не совпадает по размеру с родительским: иногда обнаруживались случаи модификации CNV (например,

удлинение или укорочение) после передачи от родителя к ребёнку. Эту редкую возможность стоит иметь в виду, если диагностика CNV у родителя проводилась альтернативными методами, такими как флюоресцентная гибридизация *in situ*. Особо следует выделить CNV, сцепленные с X хромосомой, у пациента мужского пола, унаследованные от здоровой матери. Необходимо проверить, не является ли отсутствие болезни у неё результатом преимущественной инактивации X хромосомы, несущей мутацию. В этом случае важны исследования особенностей инактивации X хромосом у матери, прежде чем будет сделан вывод о том, существует ли 50% риск передачи заболевания матерью только для её сыновей или также для дочерей без сдвига X-инактивации. Таким образом, для проведения медико-генетического консультирования семей с геномными аномалиями необходим комплексный подход к диагностике, включающий обследование родителей с помощью технологий молекулярного кариотипирования, стандартного цитогенетического анализа, FISH, исследования инактивации X хромосомы и других методов.

Вопросы международной и национальной стандартизации биоаналитических измерений

Вонский М.С.^{1,2*}, *Рунов А.Л.*^{1, 2}, *Кулябина Т.В.*¹, *Крылов А.И.*¹, *Суворов В.И.*¹, *Конопелько Л.А.*¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии имени Д.И. Менделеева

* Московский пр., д. 19, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 195005, Тел.: +7 9119205867, e-mail: m.vonsky@gmail.com

² Институт цитологии Российской академии наук, Российская Федерация

Ключевые слова: биоаналитические измерения; прослеживаемость; стандартные образцы; ключевые сличения; калибровочные и измерительные возможности

Problems of international and national standardization of bioanalytical measurements

Vonsky M.S. ^{1,2*}, Runov A.L. ^{1, 2}, Kuliabina T.V. ¹, Krylov A.I. ¹, Suvorov V.I. ¹, Konopelko L.A. ¹

¹ D.I.Mendeleev All-Russian Institute for Metrology

* Moskovsky pr. 19, St.-Petersburg, Russian Federation, 195005, Phone: +7 9119205867, e-mail: m.vonsky@gmail.com

² Institute of Cytology of Russian Academy of Sciences, Russian Federation

Keywords: Bioanalytical measurements; Standardization; Traceability; Referent materials; Key comparisons; Calibration and measurement capabilities

Предметом биоанализа является измерение биологически значимых параметров макромолекул или их комплексов, имеющих биологическое происхождение. Измерения включают в себя идентификацию и количественное определение активных макромолекул, выполняющих определенную биологическую функцию, их биологически значимых параметров в сложных матрицах и смесях. Биоаналитические измерения имеют прямое отношение к здравоохранению, аттестации биофармацевтической и пищевой продукции, они относятся к сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений, и регламентируются Федеральным законом об обеспечении единства измерений № 102-ФЗ от 26.06.2008 г. Выполняемый нами комплекс работ в рамках “Стратегии обеспечения единства измерений в РФ до 2015 года” включает в себя создание комплекса физико-химических эталонов в области лабораторной медицины и разработку прослеживаемых стандартных образцов по направлению «медицинская диагностика и биотехнология». С 2004 г. ВНИИМ принимает участие в международных пилотных и ключевых сличениях в области биоанализа, проводимых под эгидой Рабочей группы по биоанализу Консультативного комитета по количеству вещества Международного комитета по мерам и весам, организует сличения в региональной метрологической организации (КОOMET).

Проведены пилотные исследования измерительных возможностей в области количественного анализа ДНК и РНК методами ПЦР в реальном времени (CCQM P103, P103.1, K61), количественного анализа ГМ кукурузы MON810 (CCQM K86) [1], сои 40-3-2 (КОOMET 375/RU/06), анализа продуктов AFLP (CCQM P53) [2], передачи массовой доли белка в растворе методом

флуоресцентного иммуноферментного анализа (CCQM P58, P58-1) [3], метилирования ДНК (CCQM P94.1), клеточных измерений (CCQM P102). Успешное участие в сличениях обеспечивает международное признание наших измерительных возможностей в области биоанализа и публикацию Калибровочных и измерительных возможностей (КИВ) в базе данных КИВ Международного бюро мер и весов. Результаты сличений позволили создать и зарегистрировать первый стандартный образец состава ДНК ГМ сои ГМ-СОЯ-ВНИИМ, прослеживаемый к СО Европейского института референтных материалов и методов (ERMМ).

Список литературы

1. Corbisier P., Vincent S., Schimmel H., et al. 2012. CCQM-K86/P113.1: Relative quantification of genomic DNA fragments extracted from a biological tissue. *Metrologia*, Vol.49, P. 08002.
2. Partis L., Burns M., Chiba K., Corbisier P., et al. 2007. A study of comparability in amplified fragment length polymorphism profiling using a simple model system. *Electrophoresis*, Vol 28, P. 3193-3200.
3. Noble J.E., Wang L., Cerasoli E., et al. 2008. An international comparability study to determine the sources of uncertainty associated with a non-competitive sandwich fluorescent ELISA. *Clin. Chem. Lab. Med.* Vol. 46, P. 1033–1045.

Современные методы стимуляции и реконструкции волосяного фолликула

Vorotelyak E.A.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, Российская Федерация, 119334, Тел.: +7 (499)135-40-81, e-mail: vorotelyak@yandex.ru

Up-to-date methods of hair follicle stimulation and reconstruction

Vorotelyak E.A.

N.K.Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilov str. 26, Moscow, Russian Federation, 119334, Tel.: +7 (499)135-40-81, e-mail: vorotelyak@yandex.ru

В настоящее время в дерматологии и клеточной биологии накоплены обширные знания относительно закономерностей функционирования волосяных фолликулов, факторов, участвующих в регуляции клеточной активности и обеспечивающих циклическую регенерацию фолликула. На основании наших знаний о регенеративных возможностях волосяного фолликула могут быть разработаны новые патогенетически обоснованные методы стимуляции роста волос и их восстановления. Надо сказать, что в мировой практике эти подходы интенсивно прорабатываются. Уже созданы новые технологии в трихологии на основании биологически активных веществ, факторов роста и клеточных технологий. Выбирая способы лечения болезней волос и активные компоненты препаратов, мы должны учитывать, что волос является своеобразным органом, функционирование которого обеспечивается регулируемой активностью отдельных клеточных популяций и их взаимодействием. Во время анагена в эпителии и мезенхиме активировано огромное число путей передачи сигнала и факторов, (BMP, FGF, HGF, IGF, PDGF, SCF, Shh, Wnt) координированная активность которых необходима для формирования волоса. Пролиферирующие и постмитотические кератиноциты матрикса экспрессируют рецепторы или компоненты различных сигнальных путей (beta-cateinin/Lef-1, c-kit, c-met, FGFR2, IGF-IR), в то время как клетки дермальной папиллы секретируют соответствующие лиганды (Wnt5a, SCF, HGF, FGF7, IGF-1). Эпителио-мезенхимные взаимодействия в волосяном фолликуле носят реципрокный характер. В настоящее время разработаны коктейли факторов роста и биологически активных веществ для стимуляции роста волос. В некоторых случаях используются средства, модулирующие активность сигнальных путей.

Регенеративный потенциал волосяного фолликула позволяет во многих случаях успешно корректировать возникающие в его развитии сбои. Однако если происходит необратимая потеря стволовых клеток волосяного фолликула и его способности к регенерации истощаются, приходится думать о возможности его

реконструкции или стимуляции с использованием подходов, предлагаемых клеточными технологиями.

Опыт, накопленный при восстановлении эпителио-мезенхимальных дефектов, может помочь при разработке методов реконструкции волосяных фолликулов. Формирование кожных придатков является необходимым условием функционального восстановления кожного покрова. Кроме этого, потеря одних только волосяных фолликулов может представлять эстетическую и морально-психологическую проблему.

Наиболее обещающей может считаться технология, в которой для восстановления роста волос используются оба клеточных компонента волосяного фолликула: дермальный и эпителиальный. Одним из таких подходов может быть извлечение небольшого количества волосяных фолликулов, выделение из них компетентных индуктивных клеток и их последующее наращивание *ex vivo*. В литературе появились сведения об успешном выращивании фолликулоподобных структур *in vitro*. Однако в данной технологии остаются нерешенные проблемы. В докладе предполагается обсудить все эти вопросы и возможные пути решения.

Диагностика синдрома Ретта у девочек без мутаций в гене MECP2: использование молекулярного кариотипирования (array CGH)

Ворсанова С.Г.^{1,2,3}, Юров И.Ю.^{1,2,4*}, Воинова В.Ю.^{1,2,3}, Куринная О.С.^{1,2,3}, Зеленова М.А.^{2,3}, Демидова И.А.^{1,2,3}, Улас Е.В.², Юров Ю.Б.^{1,2,3}*

¹ФГБУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава России», Москва

²ФГБУ «Научный центр психического здоровья» РАМН, Москва

³ГБОУ ВПО Московский городской психолого-педагогический университет, Москва

⁴Кафедра медицинской генетики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России, Москва

*Загородное шоссе 2, Москва 117152, Россия

Тел. +7 4959528990 svorsanova@mail.ru; ivan.iourov@gmail.com

Ключевые слова: синдром Ретта, аутизм, умственная отсталость, геном, ДНК-микроматрица, молекулярное кариотипирование, геномные и хромосомные нарушения.

Diagnosis of Rett syndrome in girls without a mutation in the gene *MECP2*: the use of molecular karyotyping (array CGH)

Vorsanova S.G. ^{1,2,3*}, Iourov I.Y. ^{1,2,4*}, Voinova V.Y. ^{1,2,3}, Kurinnaya O.S. ^{1,2,3}

Zelenova ^{1,2} M.A. ^{1,2}, Demidova I.A. ^{1,2,3}, Ulas E.V. ², Yurov Y.B. ^{1,2,3}

¹Institute of Paediatrics and Paediatric Surgery, Ministry of Health

²Research Center of Mental Health, RAMS, Moscow, Russia; Moscow, Russia

³Moscow City University of Psychology and Education

⁴Department of Medical Genetics, RMAPO, Ministry of Health of Russia, Moscow

*Zagorodnoe sh 2, Moscow 117152, Russia

Tel. +7 4959528990, svorsanova@mail.ru, ivan.iourov@gmail.com

Keywords: Rett syndrome, autism, mental retardation, genome, DNA microarray, molecular karyotyping, genomic and chromosomal abnormalities.

Введение. Синдром Ретта (RTT)(OMIM 312750) — орфанное психическое заболевание (частота: 1:10000-1:15000), связанное с нарушением развития центральной нервной системы (ЦНС). В настоящее время RTT рассматривается как самый распространенный и социально значимый генетический синдром, приводящий к умственной отсталости и аутизму у девочек [1-4].

Цель работы заключалась в поиске новых структурных микроаномалий и вариаций числа копий ДНК генома, которые этиологически и патогенетически могут быть связаны с RTT, при использовании технологии молекулярного кариотипирования (array CGH). Для этого было проведено молекулярно-цитогенетическое исследование девочек с клиническими проявлениями RTT, не имеющих мутаций в гене *MECP2* и исследованных ранее с использованием прямого секвенирования кодирующей области [5, 6-8].

Материалы и методы: Исследованы 12 девочек с RTT, у которых не было обнаружено мутаций гена *MECP2*, но при этом клинические проявления у больных соответствовали критериям

классической либо атипичной формы синдрома [8]. Для молекулярного кариотипирования (полногеномного сканирования) была использована серийная сравнительная геномная гибридизация на ДНК-микрочипах (array CGH) [7, 8], содержащих 135 тысяч олигонуклеотидных проб, позволяющих сканировать геном с разрешением 20 тысяч пн и менее. Оценка патогенности обнаруженных вариаций генома проводилась с использованием оригинальной биоинформатической технологии. Для выявления субмикроскопических изменений последовательности ДНК менее 100000 пн был специально разработан алгоритм обработки данных о соотношении интенсивности гибридизационных сигналов проб донора и пациента.

Результаты. У 5-ти девочек со стертыми клиническими проявлениями болезни обнаружены микроделеции в участке Xq28, затрагивающие ген *MECP2*. У девочек с микроделециями в участке Xq28 наблюдается особый подтип RTT, проявляющийся в виде клинически более легких форм по сравнению с классическим вариантом этого моногенного синдрома. В одном случае атипичная форма RTT была ассоциирована с геномными аномалиями, затрагивающими ген *CDKL5* и критический участок микроделеционных синдромов Прадера-Вилли и Ангельмана (15q11.2). Помимо этого, впервые представлены данные о вариациях генома в участках 3p13, 3q27.1 и 1q21.1-1q21.2, обнаруженные у 3-х девочек. Предполагается, что эти участки генома могут содержать новые гены, этиологически связанные с RTT-подобным фенотипом. В 3-х из 12 проанализированных случаев не выявлены патологически значимые нарушения и вариации генома.

Выводы. Согласно полученным данным, отсутствие мутаций в гене *MECP2* у девочек с синдромом RTT при умственной отсталости и аутизме, выявленное при проведении молекулярно-генетической диагностики, не является исключаящим критерием для клинического диагноза RTT. Для недопущения ошибок при диагностике RTT необходима комплексная генетическая диагностика с привлечением молекулярно-цитогенетических методов (array CGH, или молекулярное кариотипирование).

Исследование частично поддержано грантом Президента Российской Федерации (МД-4401.2013.7).

Список литературы

1. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Воинова-Улас В.Ю. и др. 2005. Эпигенетические исследования синдрома Ретта как адекватной модели аутистических расстройств. *Ж. неврол. психиатр. им. С. С. Корсакова*; Т. 105(7), С. 4-11.
2. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. 2006. Медицинская цитогенетика. М.: «Медпрактика». 2006, 300с.
3. Ворсанова С.Г., Юров И.Ю., Соловьев И.В., Юров Ю.Б. 2008. Гетерохроматиновые районы хромосом человека: клинико-биологические аспекты. М.: Медпрактика. 2008, 300с.
4. Тиганов А.С., Юров Ю.Б., Ворсанова С.Г., Юров И.Ю. 2012. Нестабильность генома головного мозга: этиология, патогенез и новые биологические маркеры психических болезней. *Вестник РАМН*, Т. 9, С. 45-53.
5. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Kurinnaia O.S. et al. 2012. Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy, and congenital anomalies. *Mol. Cytogenet.*, V. 5, P. 46.
6. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Куринная О.С. и др. 2012. Генетические аспекты психологических и поведенческих нарушений у детей с аутистическими расстройствами и трудностями в обучении: диагностика геномных и хромосомных нарушений с использованием ДНК-микрочипов. *Совр. проблемы науки и образ.*, Т. 3, 5с, URL: www.science-education.ru/103-6449.
7. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Куринная О.С. и др. 2012. Диагностика геномных нарушений у детей с умственной отсталостью и аутизмом с помощью серийной сравнительной геномной гибридизации (аггау CGH и HRCGH). *Клинич. генетика и перинат. диагностика*, Т. 1, С. 50-54.
8. Воинова В.Ю., Ворсанова С.Г., Юров И.Ю. и др. 2009. Анализ корреляций генотипа и фенотипа при синдроме Ретта: использование оригинальной клинической шкалы. *Мед. Генет.*, Т.8(№1/79), С. 9-18.

Значение HLA-маркеров для диагностики целиакии

Вохмянина Н.В.

ГКУЗ «Диагностический центр (медико-генетический)», Россия
194044, Санкт-Петербург, ул. Тобольская, д.5,
Тел.: +7 812 294-7003, e-mail: spbnat@yandex.ru

Ключевые слова: глютеновая энтеропатия, HLA-DQA1, HLA-DQB1, предсказательная ценность отрицательного результата

Value of HLA-markers for diagnostics of coeliac disease

Vokhmyanina N.V.

Municipal Center for Medical Genetics, Russian Federation
Tobolskaya str., 5, St. Petersburg 194044, Russian Federation
Tel.: +7 812 294-7003, e-mail: spbnat@yandex.ru

Key words: gluten enteropathy, HLA-DQA1, HLA-DQB1, negative predictive value

Введение. Глютеновая энтеропатия (ГЭ) - мультифакторное (комплексное, полигенное) заболевание, развитие которого контролируется множественными генетическими и внешнесредовыми факторами. Многочисленные варианты генетической экспрессии в совокупности со средовыми факторами влияют на формирование клинического полиморфизма и разной степени пораженности слизистой оболочки тонкого кишечника, что лежит в основе наблюдаемых атипичных форм глютеновой энтеропатии. Эффективное выявление таких форм требует вовлечение маркеров, имеющих максимальные лабораторные показатели, которые позволяют значительно ускорять постановку диагноза. Цель исследования - определить диагностическую эффективность HLA-маркеров для выявления ГЭ.

Материал и методы. Клинические лабораторные исследования проводились на базе СПб ГКУЗ МГЦ. Материалом для исследования служили образцы цельной венозной крови, полученной у 392 здоровых пациентов и у 210 больных ГЭ, находящихся на обследовании и лечении в период с 2004 по 2011 годы в ГБОУ ВПО СПбГПМУ (2004-2008 гг), СПб ГКУЗ МГЦ и ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова (2009-2011 гг). Для HLA-

генотипирования использовался метод ПЦР. Идентификацию аллельных вариантов HLA-генов проводили гель-электрофорезом в проходящем УФ-световом потоке, длина волны 254нм.

Результаты. Статистический анализ частот рискованных аллелей показал их диагностическую и прогностическую несостоятельность как самостоятельных маркеров и невозможность их использования для диагностических целей.

Анализ рискованных гаплотипов определил их низкую специфичность (56%) вместе с очень высокой (99,8%) предсказательной ценностью отрицательного результата теста (ПЦОР), которые предполагают, что наличие рискованных гаплотипов недостаточно для предсказания болезни у носителей, но их отсутствие позволяет доподлинно отрицать наличие ГЭ у пациента. Такие диагностические характеристики HLA-маркеров определяют возможность использования его как скринирующего теста в целях отбора пациентов для дальнейшего обследования. Однако, в связи недостаточной изученностью генетической составляющей ГЭ, целесообразность и эффективность их использования при скрининговом режиме видится в обследовании пациентов из групп риска (пациенты, имеющие в анамнезе ассоциированные с целиакией заболевания, и родственники больных), которые предположительно должны иметь повышенный генетический риск. Кроме этого, максимальная ПЦОР может также помочь разобраться в неясных диагностических ситуациях (например, положительные морфометрические маркеры и отрицательные антитела).

Заключение. Полученные диагностические характеристики HLA-маркеров позволяют дифференцировать больных и выбрать правильную стратегию в определении алгоритма лабораторного мониторинга больных целиакией.

Список литературы

1. Sabatino A., Corazza G. 2009. Coeliac disease. *Lancet*, Vol. 373, P. 1480–1493.
2. Ludvigsson J., Fasano A. 2012. Timing of Introduction of Gluten and Celiac Disease Risk. *Ann Nutr Metab.*, V. 60, P. 22–29.
3. Trynka G., Wijmenga C., Heel D. 2010. A genetic perspective on coeliac disease. *Trends Mol Med.*, V. 16, P. 537-550.
4. Husby S., Koletzko S., Korponay-Szabo I., et al. 2012. Zimmer, for the ESPGHAN Working Group on Coeliac

Disease Diagnosis, on behalf of the ESPGHAN Gastroenterology Committee. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *JPGN*. V. 54, P. 136–160.

Биомаркер микроРНК и его использование в молекулярной медицине

Гонзалго М.,¹ Ишханова Г.В.^{2*}

¹Стэнфорд, Медицинский Центр, ^{2*} Исследовательский центр НАСА, США
e-mail: gonzalگو@stanford.edu; galina.v.ishkhanova@nasa.gov.

Ключевые слова: микроРНК, биомаркер, онкология

Application of the microRNA as a biomarker in molecular medicine

Gonzalگو M.,¹ Ishkhanova G.^{2*}

¹Stanford University, Medical Center,
875 Blake Wilbur Drive, Stanford, CA
ph.(650)725-5544, gonzalگو@stanford.edu.

^{2*}NASA, Ames Research Center
Building 261, Room 109, Moffett Field, CA 94035
Ph.: (650)604-0779, e-mail: Galina.V.Ishkhanova@nasa.gov

Key words: microRNA, biomarker, cancer

Современная медицина особое внимание уделяет двум перспективным областям: диагностике заболеваний и генной терапии. Несмотря на существенные достижения в диагностике ряда патологий, проблемы раннего выявления, особенно онкологических заболеваний, продолжают волновать медицинскую общественность. Для диагностики онкологических заболеваний используются онкомаркеры. Онкомаркеры – это белки, вырабатываемые клетками различных опухолей. Опухоль вырабатывает особые вещества, которые по своим функциям сильно отличаются от нормальных веществ организма или вырабатываются в количестве, значительно превышающим норму. Идеальным опухолевым маркером можно считать тот, который обладает высокой специфичностью и чувствительностью в

отношении определенного вида опухоли. Однако большинство известных в настоящее время опухолевых маркеров не всегда отвечают этим критериям. Почти у каждого человека можно обнаружить в крови небольшое количество онкомаркеров, а потому именно ранняя диагностика опухолей затруднена. Следовательно, выявление повышенного содержания того или иного онкомаркера не является основанием для постановки диагноза рака, а служит поводом к углубленному обследованию пациента.

Традиционно, персональная медицина определяется как практическая медицина, которая использует индивидуальный генетический профиль для получения мнения относительно предотвращения, диагностики и лечения болезни. Возраст, стиль жизни, окружающая среда - все влияет на реакцию организма на лекарства, однако немаловажное значение имеет индивидуальная специфическая генная вариация. Генетические тесты помогут идентифицировать людей с этими генетическими вариациями, и одним из этих тестов является профиль экспрессии микроРНК.

МикроРНК (microRNA, miR) — класс некодирующих РНК, длина составляет 21-25 нуклеотидов, основной функцией является подавление трансляции мРНК, что приводит к остановке синтеза белка. МикроРНК могут быть закодированы в любом участке генома. Большинство (61%) генов микроРНК расположены в областях интронов белоккодирующих генов (интрон - участок ДНК, который является частью гена, но не содержит информации о последовательности аминокислот белка), тем не менее, гены микроРНК могут быть локализованы в области экзонов (экзон - это последовательность ДНК, которая представлена в зрелой РНК) или межгенных областях. МикроРНК транскрибируются (копируются) с генов, названных генами микроРНК, с помощью РНК-полимеразы II (pol II), некоторые – с помощью pol III. Биогенез микроРНК намного сложнее, чем тРНК, и является многоступенчатым процессом, в котором участвуют множество ферментов

Согласно данным базы микроРНК, в настоящее время в геноме человека описаны более 800 микроРНК, а применение биоинформатических методов позволило предсказать наличие более 1000 генов микроРНК. МикроРНК контролируют множество биологических и метаболических процессов: от развития органов, тканей и сигнальной трансдукции до заболеваний, вызванных опухолевыми процессами и вирусом иммунодефицита.

Сегодня изучение малых регуляторных РНК является одной из наиболее бурно развивающихся областей молекулярной

биологии. Обнаружено, что все короткие РНК выполняют свои функции на основе явления, названного РНК-интерференцией. Суть этого феномена заключается в подавлении экспрессии гена на стадии транскрипции или трансляции при активном участии малых молекул РНК.

МикроРНК и онкомаркеры находятся в определённом взаимодействии: онкомаркеры - это специфические белки, а микроРНК регулирует образование этих белков. Определение содержания опухолевых микроРНК для ранней диагностики рака имеет ряд преимуществ по сравнению с тестами, определяющими содержание белков. Выявить наличие микроРНК можно даже при их ничтожной концентрации в образце, разработка диагностических тестов на основе микроРНК занимает намного меньше времени, чем для белков.

Новые современные технологии, примененные к идентификации генов микроРНК и их мишеней, такие как компьютерные программы, предсказывающие микроРНК и их мишени, ПЦР в реальном времени и микроРНК микроплатформы, позволяют лучше изучить и понять функции микроРНК. Все это свидетельствует о том, что микроРНК имеют значительный потенциал для клинического применения в диагностике заболеваний и генной терапии.

Несмотря на то, что многие исследования убедительно доказали возможность применения профиля экспрессии микроРНК для идентификации и классификации малодифференцированных опухолей, многое еще предстоит сделать для применения этой методики в клинической практике. Сегодня большинство исследований направлены на сравнение профилей экспрессии микроРНК в опухолевой и соответствующей здоровой ткани, но не менее перспективным является определение профилей экспрессии микроРНК в разных субтипах опухолей.

МикроРНК, по всей видимости, являются древнейшей системой регуляции функционирования геномов. Очевидная функциональная характеристика всех микроРНК - это «тонкая» регуляция процессов. В тоже время нарушение экспрессии микроРНК приводит к сбою системы в целом. Сегодня уже делаются попытки использования микроРНК не только как диагностического маркера, но и как объекта воздействия терапевтических агентов, и это едва ли не самый удобный во всех отношениях подход для использования в генной терапии.

Уровень плацентарного фактора роста (PIGF) при беременности, осложненной гестозом

Гончарова А.С., Золотухин П.В., Самсонов А.Е., Александрова А.А.
Южный федеральный университет
пр. Стачки, 194/1, г.Ростов-на-Дону, Россия, 344090
Тел.: +7 (863) 2-433-885, e-mail: fateyeva_a_s@mail.ru

Ключевые слова: беременность, гестоз, плацентарный фактор роста

The level of placental growth factor (PIGF) during pregnancy complicated by preeclampsia

Goncharova A. S., Zolotukhin P.V., Samsonov A.E., Aleksandrova A.A.
Southern Federal University
Stachky, 194/1, Rostov-on-Don, Russian Federation, 344090
Tel.: +7 (863) 2-433-885, e-mail: fateyeva_a_s@mail.ru

Keywords: pregnancy, preeclampsia, placental growth factor

Введение. Гестоз – это осложнение беременности, развивающееся после 20-й недели гестации и характеризующееся полиорганной функциональной недостаточностью. Известно, что плацента играет ключевую роль в развитии гестоза. Считается, что в патогенез гестоза вовлечены три компонента: дефект плаценты, плацентарная ишемия и дисфункция эндотелиальных клеток, ведущие к осложнениям на плацентарном сосудистом уровне. Существует ряд факторов, которые могут связать аномальное развитие плаценты с системной эндотелиальной дисфункцией при гестозе, и одним из наиболее вероятно значимым считается плацентарный фактор роста. PIGF относится к семейству сосудисто-эндотелиальных факторов роста, принимает активное участие в процессах плацентации, становления и развития плацентарного кровообращения, преимущественно производится плацентой. Известно, что PIGF вовлечен в развитие гестоза, тем не менее, его роль в патогенезе этого осложнения не вполне ясна. В ряде работ PIGF описан в качестве прогностического биомаркера развития гестоза. Динамика уровней PIGF достаточно подробно описана для первого и второго триместров беременности, в то время как в третьем триместре динамика PIGF менее изучена.

Целью данного исследования являлось изучение уровня PIGF в сыворотке крови беременных женщин с 36 по 40 неделю гестации при физиологической и осложненной гестозом беременности.

Материалы и методы. Материалом исследования являлись образцы сыворотки крови беременных женщин Ростовской области. Были обследованы 37 женщин с физиологически протекающей беременностью (контрольная группа) и 9 женщин с беременностью, осложненной гестозом (группа сравнения). От всех пациенток было получено информированное добровольное согласие на обследование. Исследования одобрены комитетом по биоэтике Южного федерального университета (протокол № 1 от 29 сентября 2011 года). Исследование уровня PIGF проводили методом иммуноферментного анализа на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Alisei» (Италия) с использованием тест-системы Quantikine® Human PIGF ELISA (R&D Systems, США). Полученные данные обработаны статистически с применением пакета программ Statistica 6.0. Использовались стандартные показатели статистики, такие как медиана, 25-й и 75-й перцентиль, для определения достоверности различий в двух независимых выборках использовали критерий Манна-Уитни.

Результаты. В группе женщин с физиологически протекающей беременностью уровень PIGF составил 170,5 [111,8-239,4] пг/мл, в то время как в группе женщин с гестозом было отмечено значительное снижение уровня PIGF ($p < 0,01$), медиана составила 72,3 [64,3-86,5] пг/мл. В ряде работ было показано, что PIGF может быть мощным вазодилататором, в частности, в маточных артериях. Блокада PIGF во время беременности, следовательно, приводит к увеличению сосудистого тонуса, и, соответственно, гипертонии, что и происходит при гестозе.

Выводы. При исследовании уровня PIGF в сыворотке крови беременных женщин, проживающих в Ростовской области, было установлено статистически значимое снижение уровня PIGF в группе женщин с гестозом, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$). Это наблюдение, а также исследование механизмов взаимодействия PIGF с другими факторами роста может быть ключом к пониманию патогенеза гестоза. Тем не менее, роль PIGF в патогенез гестоза недостаточно ясна, отчасти из-за непонимания его физиологических действий в целом, кроме того, существуют

противоречивые данные о его биологической активности. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования.

Анализ клинико-генетических маркеров в прогнозировании лекарственного ответа и выживаемости пациентов с множественной миеломой

Горовенко Н.Г.¹, Костюкова Н.И.*¹, Россоха З.И.², Кирьяченко С.П.²,

Выдыборец С.В.¹

¹ Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика МЗ Украины, Украина

² Государственное учреждение «Референс-центр по молекулярной диагностике МЗ Украины», Украина

04112, г. Киев, ул. Дорогожицкая 9, Украина

Тел.: (044) 2054813, e-mail:

Ключевые слова: генетический полиморфизм, множественная миелома, лекарственный ответ.

The analysis of clinical and genetic markers in prediction of drug response and survival in patients with multiple myeloma

Gorovenko N.G.¹, Kostyukova N.I.^{1*}, Rossokha Z.I.², Kiryachenko S.P.², Vydyborets SV¹

¹ P.L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education

National Medical Academy of Postgraduate Education named after P.L. Shupyk

² State institution “Reference center for molecular diagnostic of Public Health Ministry of Ukraine”

9, Dorohozhyts'ka str. Kyiv, Ukraine, 04112

Tel: +380442054813, e-mail: medgen2006@mail.ru

Keywords: genetic polymorphism, multiple myeloma, drug response

Введение. Множественная миелома (ММ) – лимфопролиферативное заболевание, морфологическим субстратом которого являются плазматические клетки, продуцирующие патологический моноклональный иммуноглобулин, что

сопровождается снижением нормальных иммуноглобулинов и различной симптоматикой, в зависимости от распространенности патологического процесса [1]. Развитие первичной рефрактерности при применении стандартных протоколов лечения у больных ухудшает прогноз течения заболевания и выживаемости [3-6]. Рефрактерность выявляется в 20-40% случаев использования препаратов первой линии у больных ММ [2]. Существующие клинико-лабораторные маркеры прогнозирования течения и лекарственного ответа не учитывают генетических особенностей пациента, полиморфизма генов, вовлеченных в биотрансформацию препаратов. Целью данной работы стал поиск информативных маркеров для прогнозирования лекарственного ответа и выживаемости пациентов с ММ.

Материал и методы исследования. Обследованы 130 пациентов с ММ из различных регионов Украины в период с 2007 по 2011 годы. Диагностика заболевания проводилась в гематологических отделениях на основе клинической симптоматики с учетом стандартных клинико-лабораторных критериев (общее число проанализированных до начала лечения показателей – 68). Средний возраст больных составил $56,28 \pm 0,96$. Больные были пролечены по стандартным протоколам: 26 (19,11%) получали лечение по схеме МР, 55 (40,44%) – по схеме М2, 49 (36,02%) – по схеме VAD. При оценке учитывали общепринятые критерии, в которых выделяют полную ремиссию, частичную ремиссию, минимальный ответ, прогрессирование заболевания, отсутствие ответа и плато. У 6 (4,61%) пролеченных больных была полная ремиссия, у 72 (55,38%) – частичная ремиссия, а у 52 (40,00%) – отсутствие ответа. Лекарственный ответ был эффективным у 13 (50%) больных, лечившихся по протоколу МР, у 33 (60%) – лечившихся по протоколу М2, у 32 (65%) – лечившихся по протоколу VAD. Для поиска эффективных прогностических маркеров лекарственного ответа обследованных больных разделили на 2 группы: I-я группа – 52 пациента без ответа на лечение, II-я группа – 78 пациентов с ответом на лечение (пациенты с полной и частичной ремиссией). Подобный подход был использован Dumontet С.І. и соавторами [7].

Молекулярно-генетическое исследование делеционного полиморфизма генов *GSTT1*, *GSTM1*, полиморфизма *A313G*, *C3435T* генов *GSTP1*, *MDR1* было проведено в образцах крови пациентов. Использовали мультиплексную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и ПЦР с определением полиморфизма длины

рестрикционных фрагментов. Статистический анализ проводили с использованием методов бинарной логистической регрессии и линейной регрессии (программа SPSS 16.0) для прогнозирования лекарственного ответа и оценки выживаемости пациента.

Результаты. Частота аллельного полиморфизма *GSTM1* была достоверно повышена у больных с отсутствием лекарственного ответа (OR=3,48 (1,66-7,29)). У пациентов I-ой группы была достоверно снижена частота делеционного полиморфизма *GSTM1* в сравнении с пациентами II-й группы (62,82% и 32,20%; $\chi^2 = 11,33$, OR=0,29 (0,14-0,60), $p < 0,001$). Наличие делеционного полиморфизма *GSTM1* у пациента имело протективный эффект в развитии неэффективного лекарственного ответа. Различия в частотах полиморфных вариантов других исследованных генов в двух группах не были выявлены.

У пациентов обеих групп проанализированы 68 клинико-лабораторных показателей, имевших место до начала лечения, вероятные различия были выявлены для показателей уровня кальция ($p < 0,05$) и $\alpha 2$ -глобулина ($p < 0,05$) в сыворотке крови. У пациентов I-ой группы были достоверно повышены уровни кальция и $\alpha 2$ -глобулина по сравнению с пациентами II-й группы, и эти показатели в сочетании с полиморфизмом гена *GSTM1* были использованы для создания предиктивной модели риска развития неэффективного ответа при проведении терапии первой линии. Прогностическая ценность модели при оценке риска развития составляла 62,3% для показателей кальция и $\alpha 2$ -глобулина, 69,9% – для полиморфизма гена *GSTM1*, 73,6% – для полиморфизма гена *GSTM1* и показателей кальция и $\alpha 2$ -глобулина. Следовательно, комплексный анализ приведенных лабораторных показателей и результатов генетического тестирования позволяет наиболее точно прогнозировать лекарственный ответ при проведении первой линии терапии.

Линейная регрессия, проведенная с учетом 5-летней выживаемости, показала зависимость продолжительности жизни пациента от имевшего место протокола первой линии терапии, возраста, уровня кальция в сыворотке крови перед началом лечения и изученного полиморфизма гена *MDR1*. Продолжительность жизни достоверно сокращалась при использовании в качестве первой линии терапии протоколов M1 ($p < 0,05$), M2 ($p < 0,01$), высоком уровне кальция в сыворотке крови до начала лечения ($p < 0,01$), с увеличением возраста пациента ($p < 0,05$) и в зависимости от полиморфизма гена *MDR1*. У больных с наличием генотипа *CT*

по гену *MDR1* продолжительность жизни была выше в сравнении с больными, которые имели другие генотипы по этому гену ($p < 0,05$), что наблюдалось при использовании различных схем первой линии терапии.

Заключение: Использование предиктивной модели с учетом полиморфизма гена *GSTM1*, уровней кальция и $\alpha 2$ -глобулина в сыворотке крови до начала лечения позволяет прогнозировать эффективность лекарственного ответа при проведении терапии первой линии у больных ММ. Лучшая выживаемость наблюдалась у пациентов с генотипом *CT* по гену *MDR1*. Генетические особенности пациента оказывают влияние на формирование лекарственного ответа и позволяют разработать подходы к оптимизации терапии

Список литературы

1. Волкова М.А. 2007. *Клиническая онкогематология. Руководство для врачей*. М.: Медицина, С. 847.
2. Вотякова О.М. 2008. Современная терапия множественной миеломы. Фундаментальные и прикладные исследования в онкогематологии. *Бюллетень сибирской медицины. Приложение 3*, с.33-41.
3. Крячок І.А. 2010. Сучасні стандарти діагностики та лікування хворих на множинну мієлому. *Укр. мед. часопис.*, Т. 76, №2, С.91-97.
4. Крячок І.А. 2005. Клініко-лабораторні маркери прогнозу перебігу захворювання та відповіді на комбіноване лікування із включенням високодозової хіміотерапії та трансплантації стовбурових клітин у хворих на множинну мієлому. *Укр. мед. часопис.*, Т. 48, №4, С. 132-138.
5. Серафин Н.Я., Лукавецкий Л.М., Цяпка О.М. 2007. Лікування хворих на множинну мієлому: досвід та перспективи. *Онкологія*, Т. 9, №2, С.159-163.
6. Alvares C.L., Davies F. E., Horton C. 2005. Long term outcomes of previously untreated myeloma patients: responses in induction chemotherapy and high dose melphalan incorporated within a risk stratification model can help to direct the use of novel treatments. *Br. J. Haematol.*, V.129, P. 607-614.
7. Dumontet C., Landi S., Reimen T. 2010. Genetic polymorphisms associated with outcome in multiple myeloma

patients receiving high-dose melphalan. *Bone Marrow Transplantation*, V. 45, P.1316-1324.

Анализ генетического полиморфизма в прогнозировании потребности в реанимационной помощи у новорожденных

Горовенко Н.Г.¹, Кирьяченко С.П.^{2*}, Россоха З.И.²

¹ *Национальная медицинская академия послыдипломного образования имени П.Л. Шупика МЗ Украины, Украина*

² *ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН», Украина*

04112, Киев, ул. Дорогожицкая 9, Украина, (044)2054813,
e-mail:medgen2006@mail.ru

Ключевые слова: генетический полиморфизм, новорожденные, реанимационная помощь.

The analyses of genetic polymorphism in intensive care necessity of newborns

Gorovenko N.G.¹, Kiryachenko S.P.*², Rossokha Z.I.²

¹ P.L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education
National Medical Academy of Postgraduate Education named after P.L. Shupyk

² State institution “Reference center for molecular diagnostic of Public Health Ministry of Ukraine”

9, Dorohozhyts'ka str. Kyiv, Ukraine, 04112

Tel: +380442054813, e-mail: medgen2006@mail.ru

Keywords: genetic polymorphism, newborns, intensive care.

Введение. Последнее десятилетие характеризовалось бурным развитием молекулярной медицины, основные усилия которой были направлены на поиск генетической компоненты, в том числе и в развитии критических состояний у новорожденных [1-3]. Недостаточное внимание было уделено исследованию роли генетического полиморфизма в течении критических состояний и определении потребности в реанимационной поддержке [4]. Изучение влияния генетической детерминанты на потребность в

медицинских вмешательствах у новорожденных может служить основой для разработки индивидуализированного подхода к выбору стратегии лечения, способствовать снижению частоты развития осложнений за счет их своевременной профилактики. Цель исследования - проанализировать влияние генетического полиморфизма на потребность в реанимационной помощи у новорожденных с критическими состояниями.

Материал и методы исследования. Обследованы 235 новорожденных с клиническими проявлениями перинатальной асфиксии с различной неврологической симптоматикой, респираторным дистресс синдромом (РДС), воспалительными заболеваниями легочной ткани, неонатальной желтухой и органной недостаточностью различной степени выраженности (основная группа) и 110 новорожденных, не имевших клинических симптомов неонатальных заболеваний (контроль). Молекулярно-генетические исследования проводились стандартными методами. Для определения полиморфизма I/D гена ACE применялась алельспецифична полимеразная цепная реакция (ПЦР). При исследовании полиморфных вариантов A1166C, C677T, G308A генов AT2R1, MTHFR, TNF- α проводили, после ПЦР, анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Продукты амплификации фрагментов ДНК генов AT2R1, MTHFR, TNF- α подлежали гидролитическому расщеплению с помощью эндонуклеаз рестрикции BstDeI, HinfI и NcoI, соответственно. Продукты ПДРФ анализа учитывали, проводя электрофорез полученных фрагментов в 2% агарозном геле. Результаты молекулярно-генетических исследований подлежали статистической обработке с использованием программ SPSS 17.0. и мультифакторной пространственной редукции (Multifactorial Dimensionality Reduction) [5].

Результаты. Индивидуальный анализ клинической картины обследованных нами новорожденных показал, что носители генотипов *DD* (30,40 \pm 2,88) и *ID* (30,62 \pm 3,76) достоверно чаще нуждались в длительной госпитализации в отличие от носителей генотипа *II* (19,06 \pm 3,23). При проведении исследования влияния полиморфизма I/D гена ACE на потребность в реанимационной помощи наблюдалось достоверное повышение частоты генотипа *DD* (33,33%) и достоверное снижение генотипа *II* (13,73%) у больных новорожденных, которые нуждались в реанимационной поддержке в отличии от частоты этого генотипа у больных новорожденных, которые лечились в специализированных

неонатальных отделениях ($\chi^2=7,47$, $p<0,05$, $OR=3,56$ 95%CI:1,39-9,13 и $\chi^2=5,39$, $p<0,05$, $OR=0,13$ 95%CI:0,13-0,86 соответственно). Частота генотипа *DD* была достоверно повышена у новорожденных, которые нуждались в искусственной вентиляции легких (ИВЛ) - 35,48%, в отличие от больных новорожденных с данным генотипом, у которых не применялась ИВЛ - 8,14% ($\chi^2=13,09$, $p<0,05$, $OR=6,21$, 95%CI: 2,14-18,04). Частоты генотипов *ID* и *II* статистически не различались в зависимости от потребности в ИВЛ.

Обращая внимание на достоверную ассоциацию генотипа *DD* с потребностью в ИВЛ у больных новорожденных, мы провели анализ влияния полиморфных вариантов гена *ACE* на длительность ИВЛ. У больных детей с генотипом *DD* применение ИВЛ было длительным вдвойне ($16,63\pm 2,87$) по сравнению с больными с генотипом *II* ($9,50\pm 2,23$, $p<0,05$). Итак, как видно из полученных нами результатов полиморфизм *ID* гена *ACE* определяет продолжительность госпитализации, необходимость применения реанимационной, дыхательной поддержки и ее продолжительность у больных новорожденных. Нами было проанализировано влияние полиморфизма *A1166C* гена *AT2R1* на продолжительность госпитализации, необходимость реанимационной и респираторной поддержки. Достоверные различия в распространении исследуемых нами полиморфных вариантов гена *AT2R1* не были обнаружены.

Носители генотипа *308AA* по гену *TNF-a* ($43,60\pm 8,96$) достоверно чаще нуждались в длительной госпитализации, в отличие от носителей генотипа *308GG* ($25,51\pm 2,20$). Среди тех, кто нуждался в ИВЛ, была достоверно повышена частота генотипа *308AA* - 12,90%, по сравнению с частотой этого генотипа у больных новорожденных, которым не применяли ИВЛ - 2,33% ($\chi^2=5,24$, $p<0,05$, $OR=6,22$, 95%CI:1,08-35,87). Обращая внимание на ассоциацию генотипа *308AA* гена *TNF-a* с потребностью в ИВЛ у больных новорожденных, мы провели анализ влияния полиморфных вариантов гена *TNF-a* на продолжительность ИВЛ. У носителей генотипа *308AA* продолжительность ИВЛ была почти вдвое больше ($19,5\pm 3,93$) по сравнению с носителями генотипа *308GG* ($8,25\pm 1,72$); эти показатели достоверно различались ($p<0,05$). У носителей генотипа *308AG* продолжительность ИВЛ была меньше по сравнению с носителями генотипа *308AA*, но эти данные достоверно не различались ($p>0,05$). Носители генотипов *677TT* ($31,24\pm 4,29$) и *677CT* ($30,91\pm 3,46$) по гену *MTHFR* чаще нуждались в длительной госпитализации, в отличие от носителей

генотипа *CC* (20,74±2,84). Больные новорожденные с генотипом *677CT* ($\chi^2=6,19$ OR=2,80 95%CI:1,23-6,39) и генотипом *677TT* ($\chi^2=8,15$ OR=4,54 95%CI:1,51-13,64) достоверно чаще нуждались в реанимационных мероприятиях, в отличие от больных детей, лечившихся только в специализированных неонатальных отделениях. Частота генотипа *677CC* была достоверно повышенной у больных новорожденных, лечившихся в специализированных неонатальных отделениях, по сравнению с частотой этого генотипа у больных, лечившихся в реанимационном отделении ($\chi^2=19,30$ OR=0,18 95%CI: 0,08-0,39). Новорожденные, которым была оказана специализированная реанимационная помощь, требовали применения ИВЛ.

Сред тех кто нуждался в ИВЛ, была достоверно повышена частота носителей генотипа *677TT* - 29,03%, по сравнению с частотой этого генотипа у больных новорожденных, которым не применялась ИВЛ - 5,81% ($\chi^2=10,66$, $p<0,05$, OR=6,63, 95%CI:2,02-21,79). Частота генотипа *677CC* была достоверно повышенной у детей реанимационного отделения, которые не требовали применения ИВЛ ($\chi^2=12,29$, $p<0,05$, OR=0,20 95%CI:0,08-0,52). Обращая внимание на вероятную ассоциации *677TT* генотипа с потребностью в ИВЛ у больных новорожденных, мы провели анализ влияния полиморфных вариантов гена *MTHFR* на продолжительность ИВЛ. Среди больных новорожденных с генотипом *677TT* респираторная поддержка была достоверно продолжительнее (16,58±1,02) по сравнению с больными с генотипом *677CC* (11,00±1,01).

Полученные результаты показывают, что полиморфизм *С677Т* гена *MTHFR* влияет на потребность в реанимационной помощи, определяет необходимость применения респираторной поддержки и позволяет оценить ее вероятную продолжительность у новорожденных. На следующем этапе был использован метод мультифакторной пространственной редукции (MDR) для построения модели межгенных взаимодействия. Наиболее значимой была модель, которая включала четыре гена - *ACE*, *TNF- α* , *AT2R1*, *MTHFR*, ее прогностическая ценность составила 69,96 ($p<0,05$). Построенная нами модель позволила оценить влияние межгенных взаимодействия на потребность в респираторной поддержке. Синергичное взаимодействие было выявлено для генов *MTHFR* и *ACE*, энтропия которых составляла 10,32% и 8,72% и возрастала при их совокупном действии на 1,78%. Необходимость реанимационной помощи высоко достоверно зависела от генов

ACE и *MTHFR*, а построенная с их учетом двухкомпонентная модель потребности в реанимационной поддержке имела прогностическую ценность 60,95%.

Заключение. Анализ полиморфных вариантов генов *ACE*, *AT2R1*, *TNF- α* , *MTHFR* является важным для обоснования риска развития критических состояний и оценки потребности новорожденных при медицинских вмешательствах.

Список литературы

1. Collins F.S., McKusick V.A. 2001. Implication of Human Genome Project for Medical Science. *JAMA.*, V. 285, № 5, P. 540-544.
2. Peltonen L.A., McKusick V.A. 2002. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Genomics and Medicine*, V. 2, P. 3-12.
3. Баранов В.С. 2009. Генетический паспорт – основа индивидуальной и превентивной медицины. *СПБ.: Изд-во Н-Л*, 528 с.
4. Harding D. 2007. Impact of common genetic variation on neonatal disease and outcome. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, V. 92, P. 408-413.
5. Hua He., William S.O., Brott M.J. 2009. Power of multifactor dimensionality reduction and penalized logistic regression for detecting gene-gene interaction in a case-control study. *BMC Medical Genetics*, V. 10, P. 127-136.

Предиктивное генетическое тестирование: ожидаемое и действительное

*Горовенко Н.Г.**, *Подольская С.В.*

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика

Дорогожицкая ул., 9, Киев, Украина, 04112

Тел.: +380442054813, e-mail: medgen2006@mail.ru

Ключевые слова: полиморфные генетические маркеры, диагностика, риск развития заболевания.

Predictive genetic testing: expectations and reality

Gorovenko N.G.*, Podolskaya S.V.

P.L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education

National Medical Academy of Postgraduate Education named after P.L.

Shupyk

9, Dorohozhyts'ka str. Kyiv, Ukraine, 04112

Tel: +380442054813, e-mail: medgen2006@mail.ru

Keywords: polymorphic genetic markers, the diagnosis, the risk of developing the disease.

Введение. Одним из наиболее сложных вопросов применения методов молекулярной диагностики в клинической практике является переход от групповых рисков, выявленных многочисленными исследованиями для конкретных маркеров и групп патологий, к оценке риска развития патологического процесса для конкретного пациента. Существуют различные подходы, и одним из наиболее перспективных направлений является использование статистических моделей для конкретизации индивидуальных рисков [1-4]. Целью работы была сравнительная оценка информативности результатов только генетического тестирования в сравнении с комплексным анализом генеалогических, анамнестических, молекулярно-генетических и клинико-лабораторных данных.

Материал и методы: Методами ПЦР или ПЦР-ПДРФ были определены полиморфные варианты: I/D - гена ангиотензинпревращающего фермента (*ACE*), T174M и M2355T - ангиотензиногена (*AGT*), A166C - гена рецептора I типа к ангиотензину II (*A 2R1*), C108T - гена параоксоназы 1 (*PON1*), C677T - гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), 4b/a, T-786C и G894T гена эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS*), C3435T – гена множественной лекарственной устойчивости (*MDR1*), делеционного полиморфизма глутатионтрансфераз *GSTT1* и *GSTM1*, а также комбинаций перечисленных полиморфных генетических маркеров у пациентов с мультифакторной патологией (сахарный диабет I типа, артериальная гипертензия, рак молочной железы). При статистической обработке использовали программы STATISTICA 10.0, SPSS Statistics 21.0, MDR (Multifactor Dimensionality Reduction).

Результаты. Потенциал предвидения события (развитие болезни и/или ее осложнений) при использовании только указанных генетических маркеров был ниже, чем при включении в

модель анамнестических и клинических данных, а также оценки отягощенности родословной. При предварительном отборе значимых для данной группы генетических маркеров и включении анамнестических и клинических данных уровень предикции модели повышался и позволял рассчитать вероятность развития осложнений заболевания для носителей конкретных генотипов.

Выводы. Включение в статистическую обработку, кроме результатов молекулярно-генетических исследований, анамнестических и клинических данных, оценки отягощенности родословной по данному заболеванию увеличивает предиктивную ценность статистической модели и позволяет разработать персонализированный прогноз риска мультифакторной патологии.

Список литературы

1. Леонов В.П. *Логистическая регрессия в медицине и биологии.* Код доступа http://www.biometrica.tomsk.ru/logit_1.htm
2. Бююль А., Цёфель П. 2005. *SPSS: Искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей.* Спб., DiaSoft, , 608 с.
3. Williams S.M., Ritchie M.D., Phillips J.A. 3rd et al. 2004. Multilocus analysis of hypertension: a hierarchical approach. *Hum. Hered.*, Vol. 57, P. 28-38.
4. Sucheston L., Chanda P., Zhang A., Tritchler D., Ramanathan M. 2010. Comparison of information-theoretic to statistical methods for gene-gene interactions in the presence of genetic heterogeneity. *BMC Genomics*, Vol. 11, P.487-498.

Вопросы генетического тестирования в постдипломном образовании врачей различных специальностей в Украине

Горovenko H.G.*

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика, Дорогожицкая ул., 9, Киев, Украина, 04112, Тел.: +380442054813, e-mail: medgen2006@mail.ru

Ключевые слова: последипломное образование, полиморфные генетические маркеры, обучение

Issues of genetic testing in postgraduate education of doctors of various specializations in Ukraine

Gorovenko N.G.

P.L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, National Medical Academy of Postgraduate Education named after P.L. Shupyk 9, Dorohozhyts'ka str. Kyiv, Ukraine, 04112

Tel: +380442054813, e-mail: medgen2006@mail.ru

Keywords: postgraduate education, polymorphic genetic markers, training

Проблема генетического тестирования еще не нашла должного места в системе додипломной подготовки врача. Наверстывать упущенное приходится за очень короткое время. Врачи разных специальностей требуют разного уровня овладения разных объемов знаний о генетическом тестировании. Наибольшего внимания требуют врачи - генетики, которые получают эти знания в максимальном объеме на циклах специализации, предаттестационной подготовки, а также на курсах тематического усовершенствования, посвященных отдельным вопросам генетического тестирования. Врачи лаборанты - генетики должны овладеть методологическими и методическими вопросами организации и проведения собственно лабораторных генетических исследований. Ответственность за качество выполненных анализов несут именно врачи-лаборанты. Это и генетическое тестирование наследственных болезней, в том числе подтверждающая диагностика при неонатальных скринингах, для установления диагноза моногенной патологии, для проспективного расчета риска, для проведения преконцепционной генетической диагностики и др. Генетическое тестирование также входит в повседневную практику врачей разных специальностей, поскольку оно все шире применяется как для оценки генетического риска развития и особенностей течения различных патологических состояний и мультифакторной патологии, так и для программирования различных сторон жизни человека (питание, физические нагрузки, воздействие определенных факторов среды). Овладеть знаниями о генетическом тестировании они могут только на циклах тематического усовершенствования, и эти циклы должны проводить кафедры медицинской генетики. Практикующие врачи должны не просто стремиться быть ультрасовременным и назначать «модные» тесты, которые иногда навязывают врачам и обывателям коммерческие фирмы, а уметь сначала анализировать

родословные и лишь затем осознанно выбрать те генетические тесты или панели исследований, результаты которых сам врач сможет потом интерпретировать и выработать действительно важные для поддержания здоровья данного пациента рекомендации. В настоящее время отсутствие врача на рабочем месте в течение 4-8 недель, необходимых для обучения на курсах повышения квалификации, является большой профессиональной и экономической проблемой. В Украине она частично решается за счет введения коротких 1-2 недельных циклов, внедрения очно - заочной (дистанционной) формы обучения, выездных циклов, проведением лекций, семинаров, конференций в режиме on-line. Внедрение новых технологий позволяет расширить возможности повышения квалификации в медицине, и врачи различных специальностей могут получить необходимые знания в рамках системы последиplomного образования.

Инновационные аспекты развития лечебной физической культуры в системе высшего профессионального образования

В.И. Григорьев, В.Н. Григорьева

Санкт-Петербургский государственный экономический университет,

В физической культуре студентов вузов накоплен положительный опыт использования технологий лечебной физической культуры (ЛФК). Однако сегодня приходится признать, что в ходе проводимой реформы, связанной с переходом на двухуровневую систему образования, ЛФК не стала объектом инновационного развития. Как следствие этого – несоответствие её содержания современным требованиям по качеству, глубине дифференциации и индивидуализации лечебной работы со студентами. В работе кафедр физического воспитания проявился тревожный плеоназм – при избыточности использования здоровьесберегающих брендов и технологий, не достигается ожидаемых прогрессивных результатов.

Обобщая публикации последних лет легко можно увидеть некую генеральную интенцию: цена либеральной «перестройки» оказалась весьма разорительной – на фоне демографического кризиса ухудшилось здоровье нации в целом. Несмотря на предпринимаемые усилия в рамках национального проекта

«Здоровье», где ЛФК используется одним из инструментов сбережения жизненного потенциала студенческой молодежи, при проведении массовых обследований выявлена тенденция к ухудшению морфофункционального развития, признаки ретардации, низкий уровень тренированности, адаптационных возможностей организма, возрастание рисков развития патологических состояний. Безусловно, здесь проявляется методологическая дилемма: с одной стороны, очевидна необходимость модернизации ЛФК, с другой – отсутствие научного знания, предлагающего кинезиологические технологии более высокого качества, неразвитость в вузах инфраструктуры, ресурсного обеспечения ЛФК. Осмысление проблемы приобретает в отечественной науке масштабы, соответствующие роли ЛФК в физической культуре студентов.

Представляется, что её решение, связано с переосмыслением путей развития ЛФК на основе анализа многообразия современных концепций, диверсификационной типологии, теории саморганизации биологических систем, понимания человека как главного объекта и субъекта физкультурно-спортивной деятельности. Предпринимаемые в наступившую эпоху сциентизма попытки модернизации ЛФК с опорой на теорию систем, структурализма и синергетики, открывают заманчивые перспективы многовариативности, высоких темпов её инновационного развития и необратимости эволюционных процессов. Есть основание ожидать, что решение проблемы связано с научным обоснованием и внедрением в практику физического воспитания инновационных личностно-ориентированных технологий ЛФК, выделением составляющих элементов, уточнением функций ЛФК, переосмыслением сложившихся критериев и параметров в оценке здоровья студентов. Исследовательский базис составляют информационные («information technology»), когнитивные («cognitive science»), нано («nanotechnology») и биотехнологии (biotechnology). Это информационное поле характеризуют предпочтения при формировании технологических платформ разрабатываемого подхода. Выделенные узлы (nano-bio-info-cogn) являются перспективной конфигурацией, обладающей выраженной синергией и соответствуют долгосрочным ориентирам развития ЛФК в вузе. Интертекстуально они концентрируют усилия на решении стратегических задач: аккумуляции интеллектуального капитала, генерацию паттернов, разработку

высокотехнологичных методик, распространение информации и передового опыта.

Предлагаемый инновационный подход конструктивно опирается на концепцию целостного развития студентов, отражающую причинную природу педагогического воздействия с учетом генетического и фенотипического полиморфизма, половой детерминации и половой дифференциации. Во главу угла предлагаемого подхода поставлена личность студента, в его целостности, в многообразии связей и отношений с окружающим миром. Программа ЛФК ставит студента в центр лечебного воздействия, гармонизирует условия для его личностного развития и самореализации, способствует капитализации здоровья, повышению физического и умственного потенциала, формированию духовности. Структура программы дифференцирована по трем исследовательским уровням: 1) на теоретическом уровне, связанном с изучением механизмов лечебного воздействия физических упражнений в восстановительном лечении; 2) на практическом уровне – с разработкой инновационных оздоровительных технологий в поддерживающей и профилактической терапии; 3) на клиническом уровне – с оценкой эффективности их действия.

Программа ориентирована на диверсификацию разных средств адресно направленной нозологической коррекции по группам заболеваний: системы кровообращения, органов дыхания, суставов, органов пищеварения, болезнях обмена, заболеваниях нервной системы, заболеваниях и травмах периферической нервной системы, ЛФК в травматологии, в ортопедии, в акушерстве, в гинекологии. В каждом из этих направлений проявляются имплицитные, хорошо контролируемые детерминации ЛФК с устойчивостью здоровья, работоспособностью, социализацией студентов, страдающих тем или иным заболеванием. Столь широкий, антропоцентрически ориентированный контекст разработанной программы ЛФК указывает на глубинные личностно-ориентированные смыслы стратегии здоровьесбережения студенческой молодежи. В этом контексте проявляется сравнительная выраженность регулятивного значения сакрального ядра ЛФК, как механизма укрепления и капитализации человеческого потенциала. Разработанная программа реабилитационных мероприятий является частью комплексного лечения и способом общей, неспецифической, патогенетической и профилактической терапии, обеспечивающая: повышение

активности, совершенствование двигательных навыков и физических способностей студентов; восстановление нарушенных болезнью двигательных актов; воздействие на весь организм, ускоряющее ликвидацию патологических процессов, развивающихся на почве заболевания или травмы; стимуляцию регенеративных процессов в тканях на основе улучшения крово- и лимфообращения, обмена веществ).

Программа позволяет адресно использовать средства кинезитерапии при лечении остеохондроза позвоночника, грыжи межпозвоночных дисков, сколиозов, артритов и артрозов крупных суставов, а также после травм и операций на позвоночнике и суставах не истощая его резервных и компенсаторных функций. В ходе лечения восстанавливаются нарушенные функции опорного аппарата, преодолевается боль и страх перед ней и перед движениями, которых боится человек. В кейсах лечебных программ определяются оптимальная скорость, амплитуда, последовательность движений, набор мышц, необходимых для их реализации, последовательность их включения, а также постуральные синергии, необходимые для удержания равновесия при выполнении движения, и возможные коррекции. Уже в фазе планирования двигательного акта, протекающей с участием по определению Н.А. Бернштейна «премоторных зон коры», происходит перекодирование пространственно-кинематических представлений на выбор двигательных программ, обеспечивающих стимулирующее воздействие на трофические процессы и нормализацию функций. Тем самым достигается минимизация физического воздействия, приближение действующего фактора к патологическому очагу.

Эффективность упражнений программы осуществляется на основе общей витальности и обусловлена содержанием, новизной, сложностью, параметрами физической нагрузки; характером заболевания студентов; качественными параметрами занятий ЛФК (профессиональной компетенцией преподавателя, оснащенностью мест занятий). Содержание практических занятий составляет выполнение комплексов гимнастических упражнений, оказывающих точечно-целевое воздействие на отдельные больные участки тела. При их выполнении формируются функциональные синергии для отдельных кинематических цепей и их адаптация к вариативным условиям.

В программе предусмотрено использование технологий *innovatie learning* обеспечивает гармонизацию взаимодействия

опорно-двигательного аппарата и сенсорных систем, повышение качества биодинамических параметров двигательной деятельности. В кейсах целевых заданий предусмотрено использование комплексов упражнений с заданными и вариативными параметрами кинематической структуры. Группа корригирующих упражнений нацелена на исправление осанки, обеспечивая полноценное в функциональном отношении взаиморасположение и функционирование внутренних органов и систем. Сюда входят корригирующие упражнения, сочетаемые с дыхательной гимнастикой, упражнениями на координацию движений, упражнениями с малыми отягощениями, висами и упорами, упражнениями с предметами и на снарядах. В идеомоторную группу входят упражнения ментального тренинга, формирующие в сознании студентов мыслеобразы реально выполняемых двигательных действий на фоне фликкерных шумов. Представление о выполнении движений, сочетаемые с пассивными двигательными действиями улучшают трофику опорного аппарата, усиливают функции гемодинамической, дыхательной и др. систем организма.

С практической точки зрения, модернизация работы специального медицинского отделения в вузе нуждается в организации, планировании и поддержке. Шаги в этом направлении преломляют гетерономные воздействия и создают тем самым необходимый баланс потребностей студентов в двигательной активности, основанных на специфической идентичности. Успешность решения реализации программ ЛФК обусловлена необходимостью повышения профессионального гудвилла и субсидиарности преподавателей физического воспитания, работающих на специальном медицинском отделении. При её реализации ЛФК обретает инновационное развитие – как некая цепь реализованных новшеств и условий их применения. Это касается всех сторон инновационной деятельности: поиска новых идей, создания и внедрения инновационных оздоровительных технологий, особой организации труда преподавательского корпуса.

Апробация подхода показала, что занятия ЛФК приводят к положительным результатам, они дают студентам жизненный позитивизм. Физическая культура постепенно начинает входить в мейнстрим жизненных ценностей студентов специального медицинского отделения, где её влияние распространяется на все ощущения жизни, вторгается в зону чувств и настроений

студентов, поднимая общий жизненный тонус. Студенты начинают воспринимать необходимость занятий физическими упражнениями как условие для: производительного учебного труда и успешности учебной деятельности; повышения резервов адаптации к социальной и экологической среде; обретения компетенций. Безусловно, это вторжение новых, неосвоенных представлений об эталонах и свойствах качества жизни. У студентов специальной медицинской группы формируется чувство сопричастности к физической культуре, их роль в процессе обучения становится более активной. Тем самым формируется новая организационная основа развития ЛФК в вузе, совершенствуется система проводимых оздоровительных и профилактических мероприятий. В этой неординарности проявляется новая роль, имманентный и экзистенциальный характер ЛФК. В ней присутствует феноменологическое начало, обращенность к многообразию физкультурно-оздоровительной деятельности, создается новая реальность коррекции состояния организма студентов.

Выделение культуры стволовых клеток рака кишечника

Давыдов-Синицын А.П. ^{1}, Баженова О.В. ², Лисковых М.А. ¹,
Чечик Л.Л. ¹, Пономарцев С.В. ¹, Томилин А.Н. ¹, Толкунова Е.Н. ¹*

¹ Институт цитологии РАН, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

* Тихорецкий пр., 4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064

Тел. +7 921 5530085, электронный адрес: ads707@ya.ru

Ключевые слова: раковые стволовые клетки, опухоленность, Ост4

Derivation of colon cancer stem cells culture

Davydov-Sinitsyn A.P. ^{1}, Bazhenova O.V. ², Liskovykh M.A. ¹,
Chechik L.L. ¹, Ponomartsev S.V. ¹, Tomilin A.N. ¹, Tolkunova E.N. ¹*

¹ Institute of Cytology of RAS, Russia

² Saint-Petersburg State University, Russia

* Tikhoretskiy pr. 4, St. Petersburg, Russian Federation, 194064

Tel. +7 921 5530085, e-mail: ads707@ya.ru

Keywords: cancer stem cells, tumorigenicity, POU5F1, Oct4

Введение. Согласно современным представлениям [1], в раковой опухоли присутствует популяция низкодифференцированных клеток, обладающих стволовыми свойствами — раковые стволовые клетки (РСК). Именно РСК ответственны за возникновение новых очагов опухолеобразования при метастазировании [2]. Сходство РСК с эмбриональными стволовыми клетками даёт основание предположить, что в них могут быть активны те же ключевые регуляторы, например, транскрипционный фактор Oct4 [3].

Цель работы — выделение и описание субпопуляции РСК карциномы прямой кишки человека MIP101 на основании усиленной экспрессии Oct4.

Материал и методы. Клетки заражали в культуре лентивирусным вектором, содержащим ген вирусной тимидинкиназы и ген устойчивости к пуromицину под контролем Oct4-зависимого энхансера. Клетки, получившие трансген и при этом экспрессирующие эндогенный Oct4, приобретают устойчивость к антибиотику пуromицину и чувствительность к противогерпесному препарату ганцикловиру. Экспрессия Oct4 оценивалась с помощью обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Опухологенность определялась путём подкожной инъекции суспензии клеток (500 тыс. клеток) иммунодефицитным лабораторным мышам Nude с последующим измерением опухолей на 30-е сутки. Клоногенный потенциал клеточных линий оценивался путём культивирования на низкоадгезивном пластике с подсчётом колоний заданного размера (> 90 мкм) [4].

Результаты. После заражения клеток MIP101 вирусом и отбора устойчивых к пуromицину клонов, экспрессирующих эндогенный Oct4, наблюдалось трёхкратное усиление экспрессии Oct4 на уровне РНК: 3.1 ± 0.1 против 1.0 ± 0.1 у исходных клеток (в отн. ед.).

Для дальнейшей работы были отобраны несколько пуromицин-устойчивых клонов MIP101. При клоногенном анализе было показано, что исходные клетки не выживают при таких условиях, тогда как пуromицин-устойчивые клоны 101.1, 101.4, 101.15 дают в среднем 59, 38 и 14 колоний на лунку, соответственно. При введении под кожу мышей размеры опухолей согласовались с клоногенной активностью этих же клонов: 101.1 — 11.7 ± 3.2 мм, 101.4 — 12.0 ± 1.7 мм, 101.15 — 5.3 ± 1.2 мм за 30

суток. Исходные клетки MIP101 в этих условиях давали опухоли размером 6.0 ± 1.4 мм.

Выводы. Получена популяция клеток карциномы MIP101, эндогенно экспрессирующая маркер эмбриональных стволовых клеток Oct4 и при этом обладающая повышенным клоногенным и опухолевым потенциалом. Эти клетки растут в условиях, специфичных для раковых стволовых клеток. Чувствительность этих клеток к ганцикловиру, свойственная только стволовым клеткам и утрачиваемая в дифференцированных потомках, делает их удачной моделью для отработки систем прицельного уничтожения раковых стволовых клеток.

Список литературы:

1. Al-Hajj M., Clarke M.F. 2004. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, Vol. 23, P. 7274—7282.
2. Liu H. G., Chen C., Yang H., Pan Y.F., Zhang X.H. 2011. Cancer stem cell subsets and their relationships. *J. Transl. Med.*, Vol. 9, P. 50—59.
3. Лисковых М. А., Чуйкин И. А., Раян А. и соавт. 2011. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток крысы: анализ условий репрограммирования и культивирования. *Цитология*, Т. 53, № 12, С. 939—945.
4. Kanwar S.S., Yu Y., Nautiyal J., et al. 2010. The Wnt / beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol. Cancer.*, Vol. 9, N 212, P. 1—13.

Опыт преподавания медицинской генетики в КубГМУ

Зайцева А.Т.,¹ Голубцов В.И.¹, Лазарев К.Ю.¹, Корхмазова С.А.^{1,2}*

¹ Кубанский государственный медицинский университет, Россия

* Седина ул., 4, Краснодар, Россия, 350000

Тел.: +89183318858, e-mail: svetakorxmazova@rambler.ru

² ГБУЗ ДККБ ДЗКК Краевой перинатальный центр, Россия

Ключевые слова: медицинская генетика, поэтапное образование, молекулярная медицина

Experience of teaching in medical genetics at Kuban state medical university

Zaitceva A.T.¹, Golubtsov V.I.¹, Lazarev K.J.¹, Korkhmazova S.A.^{1,2}

¹ Kuban' state medical university, Russia

² Regional perinatal center, Russia

4 Sedina street, Krasnodar, Russia

E-mail: svetakorxmazova@rambler.ru

Key words: medical genetics, stage-by-stage education, molecular medicine

На кафедре биологии с курсом медицинской генетики КубГМУ происходит внедрение в учебный процесс наиболее прогрессивных образовательных технологий, с учетом последних достижений генетики. Обучение направлено на развитие базовых способностей студентов в области медицинской генетики, что определяет поэтапное формирование клинического мышления у врача.

Первый уровень усвоения дисциплины начинается на первом курсе с формирования представлений о строении ДНК и РНК, о геноме человека, механизмах мутационного процесса, этиологии, фенотипических проявлениях некоторых наследственных и врожденных заболеваний, о сущности методов генетического анализа, в том числе и молекулярно-генетических.

На четвертом курсе студенты приобретают знания и опыт их применения в клинике, позволяющие увидеть признаки наследственного заболевания. На практических занятиях особое внимание обращается на изучение морфогенетических вариантов в норме и при наследственных заболеваниях; на портретную диагностику наиболее часто встречающихся наследственных синдромов. Умению увидеть микропризнаки студенты обучаются с помощью слайдов, фотографий больных, а также используя компьютерные технологии – мультимедийные презентации, обучающие диагностические программы (СИНДИАГ), учебные фильмы. Клиническими базами для проведения занятий являются Кубанская межрегиональная медико-генетическая консультация, Перинатальный центр Детской краевой клинической больницы, Дом ребенка, где студенты знакомятся с частными клиническими случаями. На кафедре проводится элективный курс по актуальным вопросам медицинской генетики. В соответствии с научным профилем кафедры студенты вовлекаются в УИР и НИР, результаты которых ежегодно докладываются на научно-

практических конференциях. Открыта очная и заочная аспирантура по специальности «Генетика».

С 1999 г. проводилось преподавание медицинской генетики для врачей-интернов и клинических ординаторов по специальностям педиатрия, акушерство и гинекология, терапия, неврология, психиатрия, иммунология и аллергология, лабораторное дело, а с 2003 г. – по специальностям урология и рентгенология, причем учитывается специфика каждой специальности. Особенностью постдипломной подготовки врачей с 2012-2013 учебного года является обучение клинических интернов и ординаторов всех специальностей по дисциплине «Генетика», как фундаментальной. Последипломное генетическое образование клинических интернов и ординаторов является одним из завершающих этапов многоуровневой непрерывной подготовки специалиста.

С созданием на базе кафедры лаборатории молекулярно-генетических исследований появляются новые перспективы в преподавании медицинской генетики. Обучающиеся смогут не только сформировать представления, но и практически ознакомиться с современными методиками ДНК-диагностики, возможностями молекулярно-генетических исследований в практической медицине, а также увидеть перспективу научных исследований с использованием ДНК-технологий.

Таким образом, поэтапное изучение генетики в медицинском вузе способствует повышению уровня знаний и формированию клинического мышления у будущего врача. Углубление генетических знаний, с учетом последних достижений в области генетики, в клинической интернатуре и ординатуре в соответствии с выбранной специальностью, позволяет врачам широко использовать полученные знания в своей практической деятельности, проводить мероприятия, направленные на первичную профилактику наследственной и врожденной патологии.

**Интерактно-ориентированное профилирование
транскриптома плацент
при тяжелом гестозе**

Золотухин П.В.^{1}, Александрова А.А.¹, Машкина Е.В.¹, Покудина И.О.¹, Родионов А.А.¹, Самсонов А.Е.², Шкурат Т.П.¹*

¹ Южный федеральный университет, Россия

² Ростовский государственный медицинский университет,
Россия

* Россия, 344090, г. Ростов-на-Дону, пр-т Стачки, 194/1, к. 206

Тел. (863) 2975070, e-mail: p.zolotukhin@icloud.com

*Ключевые слова: тяжелый гестоз, транскриптомное
профилирование, окислительный статус, интерактом*

**Interactomics-based transcriptome profiling of the placental
tissues in pre-eclampsia**

Zolotukhin P.V.^{1}, Aleksandrova A.A.¹, Mashkina E.V.¹, Pokudina I.O.¹,
Rodionov A.A.¹, Samsonov A.E.², Shkurat T.P.¹*

¹ Southern federal university, Russia

² Rostov state medical university, Russia

* Russia, 344090, Rostov-on-Don, Stachki av., 194/1, r. 206

Tel. (863) 2975070, e-mail: p.zolotukhin@icloud.com

*Keywords: pre-eclampsia, transcriptome profiling, oxidative
status, interactome*

Введение. Во всем мире тяжелый гестоз является одной из основных причин материнской и детской смертности. Несмотря на значительные усилия, прилагаемые к изучению этого синдрома, его молекулярная патофизиология и этиология остаются плохо описанными. Исследование тяжелого гестоза затруднено его гетерогенностью и связанным с ней большим количеством противоречивых данных.

Анализ транскриптомных данных с учетом интерактомной информации представляет собой многообещающий инструмент для изучения сложных, гетерогенных состояний, в том числе тяжелого гестоза. В связи с вышеизложенным, целью данной работы был поиск особенностей транскриптома при тяжелом гестозе.

Материал и методы. Настоящее исследование проводилось в рамках проекта по поиску геномных и постгеномных маркеров развития осложненных вариантов течения гестации, в котором принимали участие женщины с тяжелым гестозом и физиологическим течением беременности. По совокупности данных, подтверждающих гомогенность анализируемых состояний, для транскриптомного исследования были выбраны по два образца тканей плацент из обеих групп. Исследование полногеномной экспрессии образцов тканей плацент проводили с помощью чипов Human HT12. Контроль качества чипов и образцов, статистическая обработка результатов транскриптомного исследования и пермутационное тестирование (поиск ложно-положительных отличий) проводились в GenomeStudio (Illumina, США), MS Excel (Microsoft, США), Chipster (CSC, Финляндия). Обработка результатов транскриптомного профилирования в среде Chipster включала функциональную оценку дифференциальной экспрессии по категориям Gene Ontology (GO) и с помощью разработанного нами интерактивного инструмента OSIM (Oxidative status interactome map).

Результаты. Нами не выявлены статистически значимые отличия характеристик транскриптома между группой тяжелого гестоза и контролем при функциональном анализе по категориям GO. Интерактивно-обоснованный функциональный анализ, основанный на отборе среди всех анализируемых генов тех, которые участвуют в формировании окислительного статуса, оказался более чувствительным и информативным. При применении этого подхода выявлены повышение экспрессии NFE2L3 в 7,7 раз ($p=0,02$ с поправкой Бонферрони) и снижение экспрессии NFE2L1 в 6,8 раз ($p=0,023$ с поправкой Бонферрони) в группе с тяжелым гестозом.

Выводы. При стандартном анализе транскриптомных данных с категоризацией по GO отличия между исследуемыми биореplikатами не обнаруживались, однако чувствительность и информативность анализа повышались при использовании аналитической системы интерактома окислительного статуса человека: при тяжелом гестозе наблюдалось изменение экспрессии важных компонент систем окислительного статуса NFE2L3 и NFE2L1, играющих заметные роли в контроле экспрессии детоксификационных и антиоксидантных реактивных факторов клетки.

Показатели безопасности сочетанного применения ЭСТ и антипсихотиков двух поколений при лечении больных шизофренией

Иванов М.В.^{1*}, Петрова Н.Н.², Zubov D.S.¹, Чомская Н.М.²

¹ Санкт-Петербургский НИПНИ им. В.М. Бехтерева

*195019 Россия, Санкт-Петербург ул. Бехтерева, д.3

Phone: +7 812 412- 7276; e-mail: mikhailivanov@bekhterev.ru

² Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

Ключевые слова: ЭСТ, шизофрения, резистентные состояния, безопасность

Safety performance of the combined use of ECT and two generations of antipsychotics in the treatment of patients with schizophrenia

Ivanov M.V.^{1*}, Petrova N.N.², Zubov D.S.¹, Chomskaya N.M.²

¹ Saint-Petersburg scientific research psychoneurological institute named after V.M. Bekhterev

* Bekhterev's street, 3, St. Petersburg, Russian Federation 195019

² St. Petersburg State University, Russian Federation.

Phone: +7 (812)4127276, e-mail: mikhailivanov@bekhterev.ru.

Keywords: ECT, schizophrenia, treatment-resistant symptoms, safety

Введение. Несмотря на значительный прогресс в области ПФТ шизофрении, к числу недостаточно решенных проблем относятся повышение её эффективности (преодоление резистентности) и безопасности [1-3]. В последние годы активно изучается возможность расширения показаний для ЭСТ за счет формирования терапевтического альянса с ПФТ [4, 5]. **Цель исследования** предусматривала оценку безопасности комбинированного применения ЭСТ и ПФТ с использованием атипичных антипсихотиков (АА) или традиционных нейролептиков (ТН) у больных шизофренией при наличии проявлений терапевтической резистентности.

Материал и методы. Исследование строилось на изучении динамики состояния 30 больных параноидной шизофренией с признаками терапевтической резистентности к АА и ТН,

получавшими курсы ЭСТ в отделении биологической терапии психически больных СПб НИПНИ им. В.М.Бехтерева.

Результаты. Полученные данные подтвердили возможность безопасного применения ЭСТ в сочетании с нейролептиками, как традиционными, так и атипичными, у больных параноидной шизофренией, для преодоления терапевтической резистентности. У больных, получавших ЭСТ на фоне приема АА, редукция невротических и автономных побочных эффектов более выражена и наступает в более короткие сроки, чем у больных, получавших только АА в качестве монотерапии. Побочные эффекты, которые могут быть обусловлены как проведением ЭСТ, так и приемом антипсихотиков, выражены незначительно и не требуют отмены антипсихотической терапии.

Заключение. Учет особенностей побочных эффектов комбинированной терапии будет способствовать более детальной дифференциации и индивидуализации терапии больных параноидной шизофренией, осложненной терапевтической резистентностью.

Список литературы

1. Данилов Д.С. 2010. Значение клинических особенностей шизофрении для выбора антипсихотической терапии. *Российский психиатрический журнал*, № 5, С. 70-78.
2. Козловский В. Л. 2004. Перспективы патогенетического подхода к обоснованию фармакотерапии шизофрении. *Социальная и клиническая психиатрия*, № 14(1), С. 97-101.
3. Петрюк П. Т. 2004. Основные современные принципы применения психофармакотерапии в психиатрии. *Таврический журнал психиатрии*, Т. 8, № 3, С. 27–33.
4. Комиссаров А.Г. 2006. Клиническая оценка эффективности комплексного лечения больных шизофренией с использованием фармакологической и электросудорожной терапии. *Дис.канд.мед.наук*, 134 с.
5. Цукарзи Э.Э. 2002. Нелекарственные методы биологической терапии в психиатрии: исторические аспекты и перспективы применения. В кн.: *Новые достижения в терапии психических заболеваний*. М: Издательство БИНОМ, С. 527-549.

Особенности костного метаболизма у детей с деформациями позвоночника

Казарян И.В.^{1}, Виссарионов С.В.¹, Костик М.М.², Ларионова В.И.¹*

¹ ФГБУ "Научно-исследовательский детский ортопедический институт имени Г.И.Турнера" Минздрава России

* 196603, Санкт-Петербург, Пушкин, Парковая ул., дом 64-68

Тел.: (812) 465-28-57; e-mail: : kazaryan.ira@yandex.ru

² ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России,

Ключевые слова: врожденный сколиоз, идиопатический сколиоз, остеокальцин, витамин D

The features of bone metabolism in children with different types of spine deformities

Kazaryan I.V.¹, Vissarionov S.V.¹, Kostik M.M.², Larionova V.I.¹*

¹ The Turner Research Institute for Children's Orthopedics of Ministry of Healthcare of Russian Federation

* Parkovaya street 64-68, Pushkin, Saint-Petersburg 196603, Russian Federation

Phone: (812) 465-28-57; e-mail: kazaryan.ira@yandex.ru

² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University of Ministry of Healthcare of Russian Federation

Keywords: congenital spinal deformities, idiopathic scoliosis, osteocalcine, vitamin D

Введение. Врожденные деформации позвоночника представляют собой достаточно сложную проблему, изучение которой требует многокомпонентного подхода. Состояние костной ткани определяет прочностные характеристики тел позвонков, скорость линейного роста, темпы развития деформаций. Нарушение костного метаболизма может значительно сказываться на степени прогрессирования заболевания, а также влиять на эффективность и отдаленные результаты хирургической коррекции данной патологии.

Материалы и методы. Проведено изучение маркеров костного метаболизма (остеокальцин, β – CrossLaps, общий P1NP и 25(OH)D₃) у детей с деформациями позвоночника. Уровни маркеров

костного метаболизма определялись электрохемилюминисцентным методом на автоматическом иммунохимическом анализаторе («Хоффманн – Ла Рош» E 170 Modular). В исследование включены 154 ребёнка в возрасте от 6 месяцев до 17 лет со врождёнными деформациями позвоночника (ВДП) на фоне аномальных позвонков, 145 пациентов с приобретёнными деформациями позвоночника неизвестного генеза (ИС - идиопатический сколиоз) и 276 детей без искривления позвоночника в качестве контрольной группы.

Результаты. Выявлены различия в костном биохимическом профиле у детей с разными формами искривления позвоночника. Общей характерной чертой для всех пациентов со сколиозом явилось снижение средних значений уровня обеспеченности витамином D по показателю 25(OH)D₃ в крови, по сравнению с нормами, рекомендованными Всемирной организацией здравоохранения (уровень 25(OH)D₃, свидетельствующий о нормальном обеспечении витамина D составляет 20-50 нг/мл). Частота дефицита витамина D (25(OH)D₃ < 20 нг/мл) у пациентов с деформациями позвоночника составила 75,1%. Дети с ВДП имели наибольшие темпы костного обмена, что проявлялось в виде повышенных уровней маркеров костного синтеза и резорбции. Также пациенты этой группы имели более высокий уровень витамина D, по сравнению с пациентами с ИС. Дети с ИС имели наиболее низкие параметры остеосинтеза по отношению к уровням маркеров костной резорбции, что может быть объяснено наиболее низким уровнем 25(OH)D₃ в группе детей с ИС. Данные представлены в таблице.

Показатель	Значение показателя в обследованных группах		
	ВДП	ИС	Контр оль
Остеокальцин, нг/мл	85,28± 39,87* [#] (n=129)	55,53 ±31,05* (n=13 4)	103,85 ±52,98 (n=70)
β – CrossLaps, нг/мл	1,509± 0,554* [#] (n=127)	1,146 +0,467 (n=13 4)	1,154+ 0,444 (n=70)
P1NP, нг/мл	663,2+ 44,2* [#] (n=81)	276,9 +31,9 (n=75)	-

)	
25(OH)D3, нг/мл	17,0+1 2,2#	13,6+ 7,2	-
25(OH)D3 < 20 нг/мл, (%)	91/128 (71,0)	105/1 33 (78,9)	

Таблица 1. Биохимические показатели костного метаболизма у детей с деформацией позвоночника. * различие с контролем статистически достоверно, $p < 0,0001$, # различие с ИС статистически достоверно, $p < 0,0001$.

Заключение. Степень дефицита витамина D позволяет определять состояние костной ткани и темпы костного метаболизма у детей с деформациями позвоночника различного генеза. Коррекция дефицита витамина D должна входить в программу лечения данной группы пациентов.

Медико-генетическая индикация зон дискомфортного проживания: показания к верификации молекулярно-генетическими методами

Ковалева Н.В.^{1*}, *Альвовский И.К.*², *Мельников Е.К.*³

¹ Научно-исследовательский детский ортопедический институт имени Г.И. Турнера Минздрава России

* 196603, Санкт-Петербург, Пушкин, Парковая ул., дом 64-68

Тел/факс: +7 812 650-72704; e-mail: kovalevanv2007@yandex.ru

² School of Applied Health and Social Sciences, Upper Austrian University of Applied Sciences, Campus Linz, Garnisonstraße 21, 4020 Linz, Austria

³ Национальный минерально-сырьевой университет «Горный», Санкт-Петербург, Россия

Ключевые слова: болезнь Дауна, кластеры, географические поллютанты, зоны дискомфортного проживания

Medical genetic high-lighting of areas of unfavorable habitation: evidence for application of molecular genetic technologies

Kovaleva N.V.^{1*}, *Alvovsky I.K.*², *Melnikov E.K.*³

¹ The Turner Research Institute for Children's Orthopedics of Ministry of Healthcare of Russian Federation

* Parkovaya str, 64-68, Pushkin, Saint-Petersburg, Russian Federation 196603

Phone/fax: +7 812 650-7270; e-mail: kovalevanv2007@yandex.ru

² School of Applied Health and Social Sciences, Upper Austrian University of Applied Sciences, Campus Linz, Garnisonstraße 21, 4020 Linz, Austria

³ National Mineral Resources University, St. Petersburg, Russian Federation

Key words: Down syndrome, clusters, geographical pollutants, areas of unfavorable habitation

Введение. Выявление зон дискомфорта проживания является приоритетной задачей экологии. Для медицинской индикации используются разнообразные показатели здоровья, в том числе частоты генетических аномалий как показатели мутационного процесса в половых клетках человека.

Связь между неблагоприятными факторами окружающей среды и возникновением врожденных аномалий может быть установлена при изучении пространственного распределения случаев патологии. Существование пространственной неоднородности случаев рождения детей с хромосомной патологией в течение долгого времени являлось предметом дискуссий, и лишь недавно были получены достаточно убедительные свидетельства перспективности таких исследований применительно к хромосомной патологии [1].

Болезнь Дауна (БД), или трисомия по хромосоме 21 (Т21, ММ 190685), является наиболее распространенной хромосомной аномалией у живорожденных детей [2], с частотой возникновения 1 на 600 новорожденных. Эта патология возникает, как правило, из-за нерасхождения хромосом 21 в мейотических делениях при формировании яйцеклетки (80-90% случаев) или сперматозоидов (10-20%), в результате чего образуются гаметы с лишней хромосомой 21. Основным фактором риска БД является возраст матери [3], однако большая часть детей с БД (60%) рождается у молодых матерей. Исследования других факторов, таких как использование оральных контрацептивов, вредные привычки, ионизирующее излучение и соседство с местами захоронения опасных отходов не дали убедительных доказательств увеличения риска рождения таких детей у молодых родителей.

Целью данного исследования являлось изучение пространственного распределения случаев рождения/зачатия индивидов с Т21 и возможной сопряженности обнаруженных кластеров с геологически активными зонами (ГАЗ) на территории Санкт-Петербурга. Для этого предполагалось (i) осуществить адресную привязку случаев рождения/зачатия индивидов Т21; (ii) выявить кластеры случаев рождения/зачатия индивидов Т21; (iii) сопоставить кластеры с зонами геологической неоднородности земной коры.

Материалы и методы. Использованы данные Регистра болезни Дауна Санкт-Петербурга, содержащего сведения о 2431 семье пациентов, рожденных/зачатых в период 1970-2009 годы. Среди них были 2102 ребенка, имеющие БД, и 329 пренатально диагностированных плода с Т21. Из анализа исключены сибсы близнецов, случаи унаследованной трисомии и случаи предположительно унаследованной трисомии (два и более случаев аномальных зачатий). Данные о числе домов и квартир в городе, а также о числе квартир в конкретных домах и их этажности были получены в Комитете по управлению государственным имуществом Санкт-Петербурга.

При помощи геоинформационной системы “2GIS” составлена карта распределения случаев БД в Санкт-Петербурге. Для этого была разработана программа, компилирующая документ, содержащий данные о семьях больных детей, в формате таблицы Excel, в файл формата KML. Затем полученный файл был закодирован в карту формата KMZ. В части случаев не удалось осуществить локализацию на карте вследствие переадресации, а также из-за проблемы отслеживания адресов в частных владениях.

Для анализа сопряженности кластеров рождения/зачатия индивидов с БД геологическими динамическими структурами использовались материалы поисковых, геолого-съемочных, геофизических работ, эколого-геохимического картирования, данных бурения и биолокационной съемки Санкт-Петербурга, полученные при проведении изыскательских работ Национальным минерально-сырьевым университетом по заказу Метростроя и Водоканала.

Анализ сопряженности агломерации случаев рождения/зачатия детей с БД с ГАЗ был проведен в части районов города (Петергоф, Пушкин, Стрельна, Ломоносов, Александровская, Володарский, Металлострой, Колпино, Шушары, Красное село, Кировский, Московский, Фрунзенский

районы). Оценку достоверности различий между наблюдаемыми и ожидаемыми величинами проводили с помощью критерия Фишера. Для определения уровня значимости в качестве порогового значения использовали $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Обнаружено неравномерное распределение случаев рождения БД, не объясняемое неравномерностью жилищной застройки. Идентифицированы 253 случая рождений/зачатий нескольких неродственных индивидов с Т21 в одном доме, включая 23 – из трех случаев, 5 – из четырех и 2 – из пяти. Ожидаемая частота рождений/зачатий БД составляла 1 случай на 714,6 квартир. Анализ 30 кластеров от 3-х до 5-ти случаев БД выявил статистически достоверное увеличение наблюдаемых частот над ожидаемой в 16 из них $P < 0,01$. Матери индивидов с БД из этих 16 кластеров были моложе по сравнению с матерями индивидов с БД, рожденных вне кластеров: средний возраст 28,8 лет и 30,8 лет, при этом частота женщин возрастной группы наибольшего риска 35 лет и старше составляла 20% и 35,9%, соответственно, $P = 0,02$ (Табл. 1). Анализ распределения кластеров по этажам показал, что только 14% квартир в этих кластерах расположены на первом этаже. Анализ агломерации случаев рождения/зачатия детей с БД показал их неслучайное совпадение с узлами тектонических разломов.

Медико-геологические исследования последних лет свидетельствуют о том, что зоны биологического дискомфорта могут определяться не только степенью техногенной загрязненности окружающей среды, но также и наличием целого ряда изначально существовавших факторов природного характера, наиболее значимыми из которых являются геологически активные зоны (ГАЗ). Это неоднородности в строении земной коры, являющиеся зонами повышенной проницаемости и напряжений. Как правило, они представлены местами разломов, подземными водными потоками и древними захороненными реками (палеореками). По негативному влиянию на на здоровье человека, ГАЗ может значительно превосходить отрицательное воздействие такого антропогенного фактора, как зараженность территории выбросами крупных промышленных предприятий. Опасность ГАЗ заключается в их проводящей роли для различных природных газов, выделяющихся из мантии (радон, гелий, метан, ртуть, углекислый газ и др. и растворенных в них металлов и соединений), а также в генерировании импульсных электромагнитных

излучений, обуславливающие изменение ионного состава воздуха [4].

Рядом учреждений (Региональный геологический центр ГПП «Невскеология», Ассоциация ученых «Будущее Санкт-Петербурга» при Санкт-Петербургском центре РАН, «Ассоциация «Человек и окружающая среда», Городской онкологический диспансер, НИИ гигиены и профпатологии) проведен комплекс геологических, эколого-геохимических и медико-географических исследований в Санкт-Петербурге. Эти исследования выявили статистически значимую связь развития склероза и ишемии сердца с ГАЗ. Над этими зонами также наблюдались изменение поведенческих реакций человека, повышение числа морфозов растений, снижение всхожести семян и урожайности сельскохозяйственных культур.

Нами выявлено существование значительной пространственной неоднородности случаев рождения/зачатия индивидов с хромосомной аномалией. Показано, что влияние радона как основного фактора воздействия практически можно исключить. Существование сопряженности агломераций случаев хромосомной патологии с ГАЗ свидетельствует о возможном влиянии ГАЗ на мутационный процесс в половых клетках человека, что согласуется с полученными ранее данными о негативном воздействии ГАЗ на состояние здоровья населения и на биоту в целом. Возможно, что высокие значения возрастспецифичных материнских рисков в Санкт-Петербурге, по сравнению с данными по 19 европейскими регистрами [5], объясняются воздействием этого фактора, поскольку Санкт-Петербург расположен в тектонически напряженной области сочленения Балтийского щита с Русской плитой.

Заключение. Полученные нами данные свидетельствуют о влиянии зон биологического дискомфорта на мутационный процесс в половых клетках человека. Исследования сопряженности ГАЗ с хромосомной аномалией установленного происхождения у пациентов с БД, а также со спектрами полиморфизмов ДНК и с вариабельностью спонтанного уровня хромосомных aberrаций в соматических клетках как в группах пациентов с различными патологиями, так и у здоровых индивидов, позволят изучить природу и механизмы влияния ГАЗ на генофонд и состояние здоровья населения.

Список литературы

1. McNally R.J.Q., Rankin J., Shirley M.D.F., et al. 2008. Space-time analysis of Down syndrome: results consistent with transient pre-disposing contagious agent. *Int. J. Epidemiol.*, Vol. 37, P. 1169-1179.
2. Alberman E., Mutton D., Ide R., et al. 1995. Down's syndrome births and pregnancy terminations in 1989 to 1993: preliminary findings. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, V. 102, P. 445-447.
3. Carothers A.D., Hecht C.A., Hook EB. 1999. International variation in reported livebirth prevalence rates of Down syndrome, adjusted for maternal age. *J. Med. Genet.*, V. 36, P. 386-393.
4. Мельников Е.К., Рудник В.А. 1995. Влияние зон активных разломов на состояние среды обитания Санкт-Петербургского региона. *Экология и развитие Северо-Запада*, СПб: Центр МАНЭБ.
5. Ковалева Н.В., Ильяшенко Т.Н., Мельников Е.К. 2000. Пространственная неравномерность рождения детей с болезнью Дауна. *Тез. Докл. 2-го съезда Вавиловского о-ва генетиков и селекционеров*. Санкт-Петербург, 1-5 февраля 2000 г. С. 336-337.

Инициативные специализированные регистры наследственной патологии как ценный ресурс и точки роста (на примере регистра болезни Дауна в Санкт-Петербурге)

Ковалева Н.В.

ФГБУ "Научно-исследовательский детский ортопедический институт имени Г.И.Турнера" Минздрава России

196603, Санкт-Петербург, Пушкин, Парковая ул., дом 64-68

E-mail: kovalevanv2007@yandex.ru

Ключевые слова: регистры наследственной патологии, болезнь Дауна

Unsolicited specialized registers of hereditary diseases as a valuable resource and a point-of-increase (St. Petersburg register of Down syndrome as an example)

Kovaleva N.V.

The Turner Research Institute for Children's Orthopedics of Ministry of Healthcare of Russian Federation
Parkovaya str, 64-68, Pushkin, Saint-Petersburg, Russian Federation
196603

Key words: registers of hereditary diseases, Down syndrome

Специализированные регистры наследственной патологии призваны, в первую очередь, решать насущные задачи, позволяющие им быть полезными для практики. Такими задачами для регистра болезни Дауна (БД) является мониторинг возрастспецифичных материнских рисков, эффективности пренатальной диагностики, оперативности и эффективности постнатальной цитогенетической диагностики, определение структуры заболеваемости пациентов, младенческой смертности и ее причин и ряд других.

Поскольку нет государственной поддержки и, соответственно, контроля со стороны государства инициативных специализированных регистров, дополнительные исследовательские задачи и возможность их реализации зависят от различных обстоятельств, и очень существенно – от энтузиазма, кругозора и ресурсов основателя. В данном сообщении приводятся примеры, показывающие как использование данных регистра Болезни Дауна Санкт-Петербурга позволяет формулировать и решать фундаментальные проблемы, выходящие далеко за рамки первоначальных прикладных задач. В большинстве случаев приводится обоснование необходимости использования молекулярно-генетических методов для решения поставленных проблем.

Пример 1. Использование данных регистра для мета-анализа соотношения полов (соотношение лиц мужского пола и женского пола) у детей с болезнью Дауна. Мета-анализ эпидемиологических исследований позволил доказать факт преобладания больных мужского пола при всех формах трисомии 21 (Т21), как унаследованных, так и *de novo*, за исключением мозаицизма (при котором наблюдается преобладание больных женского пола). Выявлено увеличение соотношения полов с течением времени, объясняемое постепенным увеличением доли кариологически подтвержденных диагнозов [1]. Последующие дополнительные исследования, в том числе с использованием данных регистра,

позволили сделать вывод, что ложно-положительные диагнозы БД ассоциированы с женским полом, что дает основание предполагать патологию, возможно, сцепленную с X-хромосомой, фенотипически неотличимую от БД [2].

Эти исследования позволили сделать следующие выводы: (1) Необходимы клинические и параклинические исследования (в том числе молекулярно-генетические) детей с нормальным кариотипом, направленных на кариологическую диагностику по поводу подозрения на БД. (2) Очевидно, что в ранние периоды исследований эпидемиологии БД частота этой патологии была завышенной за счет гипердиагностики; следовательно, можно предполагать временной тренд увеличения риска рождения ребенка с БД. (3) Для изучения эпидемиологии БД и выявления региональных факторов риска из анализа должны быть исключены периоды и регионы с низким уровнем кариологического подтверждения диагноза. Следует уточнить, что мета-анализ в этих случаях и в ряде других использован для увеличения выборок, но задачи были сформулированы при анализе данных Регистра БД Санкт-Петербурга.

Пример 2. Поскольку, по данным регистра, при мозаицизме по T21 выявляется преобладание больных девочек над больными мальчиками, был осуществлен анализ соотношения полов среди носителей мозаицизма по числовым и структурным аномалиям хромосом по данным литературы, который позволил сделать нетривиальные выводы о существовании полоспецифичной нестабильности перичентромерных районов хромосом в раннем эмбриогенезе человека [3]. Дальнейшее развитие этой проблематики, с использованием молекулярных методов, перспективно для индивидуального прогнозирования успешности применения экстракорпорального оплодотворения в лечении бесплодия.

Пример 3. Данных регистра использованы для определения механизмов, обуславливающих преобладание женщин среди родителей – носителей гонадного мозаицизма по T21. Мета-анализ данных литературы и собственных данных позволил показать, что основным механизмом является полоспецифичная постзиготическая коррекция T21. Получены свидетельства в пользу генетической предрасположенности к нарушению сегрегации хромосом в части семей. Также получены данные, свидетельствующие о мейотической негомологичной коориентации лишней хромосомы 21 и X хромосомы в мейозе мужчин –

носителей мозаицизма по T21 [4]. Эти факты также ждут верификации на молекулярном уровне.

Пример 4. Это исследование дало ответ на вопрос, обсуждаемый цитогенетиками в течение 50-ти лет – существует ли у человека межхромосомный эффект (МХЭ, влияние хромосомной аномалии на мейотическую сегрегацию хромосом, не вовлеченных в перестройку). На основании мета-анализа данных регистра и данных литературы определены частоты унаследованных сбалансированных перестроек у пациентов с регулярной T21 и частоты перестроек (унаследованные и вновь возникшие) у родителей потомства с T21. Дополнительно проведен анализ собственных данных и данных литературы по родительскому происхождению T21 в потомстве носителей сбалансированных перестроек. Показано, что носители сбалансированных реципрокных транслокаций и инверсий, не вовлекающих хромосому 21, - но не Робертсоновских транслокаций, - имеют повышенных риск потомства с T21.

Однако эти данные не свидетельствуют о существовании МХЭ в его привычном понимании, то есть в виде влияния перестройки на сегрегацию других хромосом в процессе мейоза носителя перестройки. Полученные результаты являются гораздо более интригующими, поскольку позволяют предполагать влияние отцовской перестройки на сегрегацию материнских хромосом после оплодотворения [5, 6]. Для подтверждения и исследования этого феномена необходимо применение молекулярных методов.

Пример 5. При сравнении данных регистров БД Санкт-Петербурга и Ленинградской области в городе Сосновый Бор обнаружена необычно низкая доля детей с БД, рожденных матерями 35 лет и старше (4%, статистически достоверно отличается от 28% в Санкт-Петербурге и от 29% в Ленинградской области за исключением Соснового Бора, $p=0,0235$ и $p=0,0154$, соответственно). В Сосновом Бору градообразующим предприятием является Ленинградская атомная станция, и значительная часть мужского населения занята на производствах с риском облучения малыми дозами ионизирующей радиации (МДИР).

Известно, что нарушения хромосомного аппарата, приводящие к T21, если они происходят в мужских половых клетках, являются возраст-независимыми, в отличие от нарушений в женских половых клетках. Следовательно, риски рождения детей с БД в этом регионе обусловлены, главным образом факторами, не

зависящими от материнского возраста. Объяснением обнаруженного явления может быть более высокая, чем в других популяциях, частота хромосомных мутаций в мужских половых клетках, обусловленная профессиональным облучением МДИР. Таким образом, Сосновый Бор может являться полигоном для исследования возможных генетических эффектов МДИР в мужских половых клетках. Для подтверждения этого предположения требуется молекулярное тестирование родительского происхождения T21.

Пример 6. Исследована частота БД в период глобальных социально-экономических преобразований. Проведено сравнение частоты и рисков БД в одногодичных интервалах материнского возраста в период высоких социальных ожиданий («перестройка», 1983-1987), - и соответствующего увеличения числа родов (69,406→73,275), - и в период экономического кризиса («переходный период», 1995-1999), когда число родов катастрофически снизилось (33,841→29,438). Анализ соответствия полученных данных теоретически ожидаемым был проведен в рамках сотрудничества с National Down Syndrome Cytogenetic Register, England and Wales, 1989-2002. Обнаружено, что несмотря на изменения возрастной структуры репродуктивной популяции, частота БД в 1995-1999 была наименьшей за все время наблюдения: 1,18 на 1000 новорожденных (однако эта частота статистически достоверно не отличалась от теоретически ожидаемой). Младенческая смертность детей с БД снизилась с 39% в 1983-1987 гг. до 17% в 1995-1999 гг. [7]. Таким образом, не обнаружено влияние экономического кризиса на частоту рождения детей с хромосомной аномалией или на выживаемость больных детей. Впрочем, нельзя исключить вероятности снижения частоты БД за счет субоптимальных условий вынашивания беременности или, напротив, предположения о роли стратификации репродуктивной популяции по уровню жизни. Для этого необходимы дополнительные исследования, которые вряд ли возможно провести.

Пример 7. Исследованиями в двух районах города (Василеостровский и Калининский) установлено, что риск рождения детей с БД и с другими хромосомными аномалиями, а также с врожденными пороками развития значительно увеличен (в 1,5 – 3 раза) в пределах влияния геологически активных зон. Обнаружены несколько кластеров рождения детей с хромосомной патологией в отдельных домах, находящихся в зонах наиболее

высокой геологической активности (пересечение тектонических разломов) [8]. Мы полагаем, что статистически достоверное превышение числа патологий над рассчитанными ожидаемыми значениями в конкретных домах должно рассматриваться как сигнал возможного экологического неблагополучия и должно быть тщательно исследовано (см. также тезисы Ковалевой и соавт. в этом сборнике).

Как представляется автору, приведенные примеры показывают, что инициативные специализированные регистры, представляя неоспоримую ценность для решения очевидных прикладных задач, могут быть не менее значимыми для проведения фундаментальных исследований и тем самым еще более заслуживать соответствующую поддержку. Как уже отмечалось, в отсутствие участия государства в основании и поддержке инициативных специализированных регистров, дополнительные исследовательские задачи зависят от интересов и ресурсов основателей таких регистров. Причем дополнительные задачи могут существенно меняться по мере развития интересов основателя. При этом оказывается, что первоначально заданную структуру регистра сложно менять или возникает проблема невосполнимости данных за предыдущие периоды. Это приводит к тому, что основатель решает интересующие его вопросы, проводя дополнительные исследования, не внося новые данные в регистр. Таким образом, основатель профессионально развивается, а регистр – нет. В перспективе окажется невозможным проведение многомерного анализа, учитывающего все выявленные при дополнительных исследованиях значимые факторы.

Другая хорошо просматриваемая опасность – исчезновение регистра с прекращением профессиональной деятельности основателя или с его переключением на другую проблематику. Достаточно часто ведение регистра прекращается с окончанием работы над диссертацией. С таким положением нельзя мириться, необходимо рассматривать каждый инициативный специализированный регистр как ценнейший ресурс, как точку роста.

Предлагается создание реестра инициативных специализированных регистров, придание им официального статуса с соответствующим финансированием, возможно, на грантовой основе. Для выяснения масштаба проблемы, обмена опытом, а также в целях разработки нормативных документов предлагается провести конференцию с предварительным названием

Список литературы

1. Ковалева Н.В. 2002. Соотношение полов при болезни Дауна. Обзор литературы. *Цитол. генет.*, Т. 36, №6, С. 90-105.
2. Kovaleva N.V. 2011. Gender affects clinical suspicion of Down syndrome. In: *Prenatal Diagnosis and Screening for Down Syndrome*. Chapter 13, Subrata Dey (Ed.), InTech, Vienne, P. 203-216. ISBN: 978-953-307-355-2. Available from: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/gender-affects-clinical-suspicion-of-down-syndrome>
3. Kovaleva N.V. 2005. Sex-specific chromosome instability in early human development. *Am. J. Med. Genet.*, V.136A< P. 401-413.
4. Kovaleva N.V. 2010. Germ-line transmission of trisomy 21: Data from 80 families suggest an implication of advanced grandmaternal age and a high frequency of female-specific trisomy rescue. *Mol Cytogenet* 3, 1:7.
5. Ковалева Н.В. 2013. Повышенный риск трисомии 21 у потомства носителей сбалансированных перестроек аутосом, не вовлекающих хромосому 21, не обусловлен межхромосомным эффектом. *Генетика*, Т. 49, № 2, С. 259-268.
6. Kovaleva N.V. 2012. Trisomy 21 in offspring of carriers of balanced non-contributing autosomal rearrangement. Interchromosomal effect and nonhomologous meiotic co-orientation. In: *New Developments in Down Syndrome Research*, Chapter V, Alard van den Bosch & Elise Dubois (Eds.), Nova Science Publishers, Inc., NY, P.149-176. ISBN: 978-1-62081-893-0. Available from: https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=376
7. Kovaleva N.V., Verlinskaya D.K., Morris J.K. 2007. Economic change. *DSNews*, V.14, No 2, P. 17.
8. Ковалева Н.В., Рудник В.А., Мельников Е.К. 1999. Влияние геологически активных зон (ГАЗ) на здоровье и наследственность человека. *Сб. научн. тр. КМАПО им.П.Л.Шурика*, Вып. 8, Т. 2, С. 418-427.

Рождение dizygотных близнецов от разных мужчин

Козлова О.А.

Санкт-Петербургское Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Бюро судебно-медицинской экспертизы», Россия 195067, Санкт-Петербург, Екатерининский пр. д.10
Тел.: +7 812 545-03-77, e-mail: DNALab80@mail.ru

Ключевые слова: Судебно-медицинская генетика, анализ ДНК dizygотных близнецов, спонтанная овуляция, проблемы установление отцовства

Dizygotic twins fathered by different persons

Kozlova O.A.

Bureau of Forensic Medical Examination», Russia, 195067, St.Peterburg, Ekaterininskiy prospect, 10, tel. +7 812 545 03 77, e-mail: DNALab80@mail.ru

Key words: forensic genetics, DNA analysis dizygotic twins, spontaneous ovulation, the problems of establishment of paternity

Феномен близнецов во все времена привлекал внимание людей. О близнецах сложены легенды и сказания, близнецы являются героями многих произведений художественной литературы.

Существуют два основных типа близнецов – монозиготные и dizygотные (МЗ и ДЗ), или однойцевые и двуйцевые. Первый тип, МЗ близнецы, – это дети от многоплодной беременности, которые развиваются из одной оплодотворенной яйцеклетки (зиготы) в результате деления одного зародыша на два самостоятельных организма на ранних стадиях эмбрионального развития. При делении оплодотворенной яйцеклетки из каждой половины развивается плод с одним и тем же набором генов. МЗ близнецы всегда одного пола и имеют идентичные генотипы. Второй тип, ДЗ близнецы, – это дети от многоплодной беременности, которые развиваются как минимум из двух яйцеклеток, оплодотворенных разными сперматозоидами (из двух зигот). По своей генетической конституции ДЗ близнецы соответствуют обычным братьям и сестрам (сиссам), то есть имеют в среднем 50% общих генов. ДЗ близнецы могут быть разного пола.

Теоретически обосновано существование еще одного типа, наиболее вероятно, довольно редкого – «полуторазиготные» близнецы [1], механизм их возникновения описан ниже.

Возможны различные варианты оплодотворения, приводящие к возникновению многоплодной беременности. Наиболее частый, когда две яйцеклетки оплодотворяются разными сперматозоидами (ДЗ близнецы). Вариант оплодотворения, когда яйцеклетку оплодотворяют сразу два сперматозоида, обнаруживается в 1% случаев. Получившиеся триплоидные эмбрионы почти всегда нежизнеспособны и гибнут на ранних стадиях эмбрионального развития. Коррекция (диплоидизация) триплоидов является причиной образования полных или частичных пузырных заносов, а также индивидов (химер), сочетающих в себе две генетически различные линии: обе с одним материнским геномом, но с различными отцовскими геномами, то есть «полуторазиготные» близнецы [2, 3]. Один из выявленных и описанных в литературе случаев исследован в Университете Гринвеля, штат Северная Каролина в марте 2007 года. Один ребёнок был гермафродитом, то есть имел женские и мужские половые железы. Оба ребёнка являлись химерами, имея клетки с набором половых хромосом XX и XY в разных тканях организма.

Очень редки случаи, когда происходит повторная овуляция на фоне уже имеющейся беременности. Если вторая яйцеклетка была оплодотворена сперматозоидом другого мужчины, близнецы могут походить друг на друга не больше, чем сводные братья и сестры.

Дизиготные близнецы рождаются в два раза чаще, чем монозиготные. Соотношение мальчиков и девочек у монозиготных близнецов 48% и 52 %, соответственно. Среди дизиготных близнецов в 51% случаев рождаются дети разного пола, оставшуюся половину делят пары мальчиков и пары девочек практически в равном соотношении. Показано, что частота рождения ДЗ близнецов может быть этнической характеристикой. Чаще всего близнецы рождаются у жительниц Нигерии – 1 пара на каждые 22 родов, за ними по частоте следуют норвежки, датчанки и жительницы Нидерландов – 1 пара на каждые 49 родов. Европейки, англичанки и чернокожие американки рожают близнецов приблизительно с одинаковой частотой, в среднем 1 на 68 родов. близнецов жительницы В Китае близнецы рождаются реже, чем в других странах – одна пара на 250 родов [4].

В норме процессы, обеспечивающие нормальное течение менструального цикла, регулируются единой функциональной нейроэндокринной системой, включающей в себя центральные отделы и периферические структуры с определенным числом промежуточных звеньев. Для возникновения многоплодной беременности можно выделить несколько предрасполагающих факторов: 1) повышение уровня фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ) в возрасте после 30-35 лет может способствовать полиовуляции; 2) спонтанная овуляция на фоне сильных положительных эмоций сексуального характера, стрессовые ситуации, сезонный гормональный пик ; 3) генетическая предрасположенность, которая наследуется по отцовской линии [1, 5].

Зачатие близнецов от разных отцов, известное как гетеропатернальная суперфекундация, возможно лишь в том случае, если за один менструальный цикл в организме женщины созреют несколько яйцеклеток, а она при этом будет состоять в половой связи с несколькими партнерами. Такое явление распространено у некоторых видов животных, например кошек, однако у людей встречается чрезвычайно редко [6]. Первый случай гетеропатернальной суперфекундации описан американским врачом Джоном Арчером в 1810 году, когда белая женщина родила близнецов с разным цветом кожи после половой связи с белым и черным мужчинами [7].

В молекулярно-генетической лаборатории Санкт-Петербургского ГБУЗ «БСМЭ» был выявлен и генетически доказан случай рождения близнецов от разных мужчин. В 2008 году в нашей лаборатории была проведена экспертиза на предмет установления отцовства гражданина А. в отношении ребёнка Маши по иску гражданки Ф. к гражданину А. По результатам исследования отцовство гражданина А. подтвердилось с вероятностью 99,99%. В 2009 году в лабораторию Санкт-Петербургского ГБУЗ «БСМЭ» поступило определение о назначении повторной экспертизы с целью установления отцовства гражданина А., но уже в отношении двоих детей, матерью которых является гражданка Ф. Из определения судьбы и представленных свидетельствах о рождении установлено, что дети родились в один день 2005 года.

При заборе образцов крови экспертом отмечено различие фенотипических признаков у близнецов. Девочка М., ДНК которой ранее исследовалась – смуглая, кареглазая, черноволосая. Имеет

фенотипическое сходство с заявленным отцом. Вторая девочка Т. – в противоположность сестре имеет светлую кожу, голубые глаза, светло-русые волосы. Визуальное сходство не прослеживалось ни с предполагаемым отцом, ни с матерью.

Выделение ДНК из образцов сухой крови матери, М., Т. и предполагаемого отца проводили методом фенол-хлороформной экстракции стандартным набором реагентов: «Комплект реагентов для выделения ДНК (ExtraPhen)» "АТГ-Биотех" Россия. Исследование ДНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции на термоциклере «Терцик -2» (Москва, Россия) с использованием указанных генетических локусов: LPL, D7S820, F13A01, vWA, TH01, D16S539, CSF1PO, F13B, D13S317, D18S51, D5S818, D19S433 «АТГ-Биотех» Россия. Продукты полимеразной цепной реакции фракционировали с помощью электрофореза в 8% ПААГ в денатурирующих условиях и анализировали в проходящем свете после окрашивания нитратом серебра. Размеры амплифицированных фрагментов ДНК определяли с использованием локус-специфических аллельных маркеров.

Сравнивали индивидуальные генотипические комбинации аллельных вариантов указанных локусов у детей и заявленных родителей. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Объект локус	Образцы крови			
	Матери	Ребёнка М.	Ребёнка Т.	Предполагаемого отца
LPL	10,10	10,11	10,11	11,11
20 D7S8	10,11	10,11	11,11	10,11
01 F13A	5,6	5,15	5,5	3,2,15
vWA	14,20	17,20	14,16	16,17
TH01	8,9	8,8	8,9,3	6,8
539 D16S	11,12	11,12	11,12	11,13
PO CSF1	11,13	12,13	12,13	11,12
F13B	8,9	9,9	8,10	9,9
317 D13S	11,12	8,12	12,14	8,11
51 D18S	15,16	13,16	16,21	13,17
18 D5S8	11,13	13,13	13,13	11,13
433 D19S	14,15	13,15	14,15.	13,13

Таблица 1. Результаты сравнения генотипические комбинации аллельных

вариантов локусов у детей и заявленных родителей. Курсив в генотипах детей - аллели, унаследованные от матери; жирный шрифт - аллели, имеющие аналоги в генотипе отца; серым фоном в выделены аллели в генотипе ребёнка Т., которые унаследованы от другого отца.

В результате исследований установлено, что для каждой из изученных STR-систем в геноме заявленного отца обнаруживается аллель, который формально совпадает с аллелем условно отцовского (не материнского) происхождения в геноме ребенка М., а именно: LPL – 11, D7S820 –10 или 11, F13A01 –15, vWA-17, TH01- 8, D16S539 – 11, CSF1PO- 12, F13B- 9, D13S317-8, D18S51-13, D5S818-13, D19S433- 13. Следовательно, генотип ребенка формально полностью соответствует таковым заявленных родителей. Проведенная оценка статистической значимости указывает на то, что такое совпадение можно считать закономерным, т.е. обусловленным кровнородственными родительскими отношениями заявленного отца и ребенка, с вероятностью (PP) не ниже 99,99%.

Для расчета вероятности отцовства использованы консервативные значения аллельных частот указанных локусов для населения Европы и России. Приведенное выше значение вероятности PP соответствует Байесовой вероятности при 50%-ной априорной вероятности отцовства и показывает вероятность того, что полученный результат не является следствием случайного совпадения признаков у неродственных лиц (п.7.3.7.1 Раздела VII «Инструкции по организации и производству экспертных исследований в бюро судебно-медицинской экспертизы» Приказ Минздрава РФ от 24.04.2003 г. № 161).

Из Табл. 1 следует, что генотипы детей не совпадают между собой по восьми из двенадцати исследованных систем, т.е. дети имеют разные генотипы и являются дизиготными близнецами.

Также при экспертизе установлено, что для шести из двенадцати исследованных систем в геноме заявленного отца не обнаруживается аллель, который формально совпадал бы с аллелем условно отцовского (не материнского) происхождения в геноме ребенка Т., а именно: F13A01-5, TH01-9.3, F13B-10, D13S317-14, D18S51-21, D19S433-15.2. Следовательно, указанные аллели не имеют аналогов в ПДАФ-профиле заявленного отца и, очевидно,

произошли от другого мужчины, который является биологическим отцом ребенка. Полученные результаты были повторно перепроверены и подтверждены.

Данный факт заинтересовал экспертов. Поскольку исследование проводилось в рамках судебного процесса, у судьи было получено устное разрешение на общение с гражданкой Ф.. Сама женщина также пошла навстречу и разрешила задать ей несколько интересующих нас вопросов. Из анамнеза женщины известно, что она росла и развивалась соответственно возрасту, менархе в 14 лет, цикл регулярный 28 дней. Хронических заболеваний не имеет, постоянно у врачей не наблюдается. Оральные контрацептивы не принимала. На момент зачатия детей возраст матери 35 лет, беременность вторая по счету, роды первые срочные. На сроке 39 недель плановое кесарево сечение. Послеродовый период без особенностей. Дети при рождении имели вес и рост: ребёнок М. – 3200 г, 50 см; ребёнок Т. – 2900 г, 51 см. Было заметно доминирующее развитие одного из близнецов, а именно М., которая как выяснилось, была зачата первой. Со слов матери дети были зачаты с интервалом в 2,5 дня от разных мужчин. В данном случае у гражданки Ф. имели место несколько предрасполагающих факторов для возникновения многоплодной беременности. Весенний гормональный пик, возраст матери на момент зачатия 35 лет, сильные положительные эмоции (встреча с любимым мужчиной).

В литературе источниках очень мало информации по данной теме, на сегодняшний момент она является недостаточно изученной. По последним данным, в подобные случаи отмечены в США – в 2008 г., в Турции – в 2006 г., в Китае – в 2009 г.

Возможно, этих случаев гораздо больше, но в силу того, что генетическое исследование проводится редко, выявить и проанализировать точные данные не представляется возможным. По некоторым данным, каждая 12 пара dizygотных близнецов теоретически может иметь разных отцов.

Список литературы

1. Голубовский М.Д., Голубовская И.Н. 1984. Возможные цитогенетические механизмы прямого отцовского влияния на близнецовость у человека и их следствия: гипотеза. *Генетика*, Т. 20, N 6, С. 1043-1051.

2. Голубовский М.Д. 1986. Отцы и близнецы. Природа, N 3, С. 23-34.
3. Golubovsky M.D. 2003. Postzygotic diploidization of triploids as a source of an unusual cases of mosaicism, chimerism and twinning. *Hum. Reprod.* V. 18, P. 236-242.
4. http://www.psyworld.ru/students/texts/osob_psrirazvit_detej.htm
5. Golubovsky M. 2002. Paternal familial twinning: hypothesis and genetic/medical implications. *Twin Res.*, V. 5, N 2, P. 75-86.
6. <http://medportal.ru/mednovosti/news/2009/05/18/superfecundation/>
7. [http://en.wikipedia.org/wiki/John_Archer_\(Maryland\)](http://en.wikipedia.org/wiki/John_Archer_(Maryland))

Генетическая диагностика Ph-отрицательных хронических миелопролиферативных заболеваний (ХМПЗ)

Козловская М.А. , Петрова Е.В., Мартыненко Л.С., Цыбакова Н.Ю., Иванова М.П., Шабанова Е.Л., Шуваев В.А., Абдулкадыров К.М., Мартынкевич И.С.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Россия

* Тел.: +7 921 653-81-11, email: maria_ko@inbox.ru

Ключевые слова: ХМПЗ, JAK2, MPL

Genetic abnormalities in diagnostics of BCR-ABL-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs)

Kozlovskaya M.A. ,Petrova E.V., Martynenko L.S., Ivanova M.P., Cybakova N.Y., Shabanova E.S., Shuvaev V.A., Martynkevich I.S., Abdulkadyrov K.M.*

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Saint-Petersburg, Russian Federation

*Phone: +7 921653-81-11, email: maria_ko@inbox.ru

Key words: MPN, JAK2, MPL

Введение. Молекулярные события, лежащие в основе патогенеза ХМПЗ, связаны с дефектами генов, кодирующих белки, которые обеспечивают нормальное поддержание миелопоэза. По данным литературы, частота диагностически значимых при ХМПЗ мутаций (V617F гена *JAK2*, в 12 экзоне гена *JAK2*, гена *MPL*) варьирует при различных нозологиях. Вместе с этим, ряд исследователей пытаются объяснить клональный гемопоэз при Ph-отрицательных ХМПЗ, основываясь на результатах цитогенетических исследований клеток костного мозга. Целью нашего исследования было определение частоты мутаций генов *JAK2* и *MPL* и выявление прогностических особенностей течения заболевания в зависимости от характера цитогенетических аберраций у пациентов с Ph-отрицательными ХМПЗ.

Материалы и методы. В исследование были включены 619 пациентов: с истинной полицитемией (ИП) 249 больных, с эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) -120, с хроническим идиопатическим миелофиброзом (ХИМФ) – 110, и 140 пациентов обследовались с целью дифференциальной диагностики с Ph(-) ХМПЗ. Возраст больных варьировал от 18 до 80 лет, медиана при этом составила 52 года. Пик заболеваемости приходится на возраст от 50-ти до 60-ти лет, в этой возрастной категории было 88 пациентов. Для детекции V617F мутации гена *JAK2* использовался метод аллель-специфической ПЦР, мутации 12 экзона гена *JAK2* определяли методом сиквенирования, мутации в гене *MPL* определяли методом Real-time PCR в двух повторностях.

Результаты. В результате проведенных исследований было выявлено, что частота мутации V617F в гене *JAK2* варьировала у пациентов в зависимости от варианта заболевания. Так, при ИП мутация V617F в гене *JAK2* определялась у 245 (98,3%) из 249 исследуемых больных, при ЭТ – у 65 из 120 (54,2%) пациентов, при ХИМФ – у 54 (49,1%) из 110 проанализированных больных. У 140 больных не гематологического профиля, обследованных с целью дифференциальной диагностики с Ph(-) ХМПЗ, V617F в гене *JAK2* обнаружена у 12 (8,6%), что позволило достоверно подтвердить Ph(-) ХМПЗ. Мутация в 12 экзоне гена *JAK2* выявлялась у 2 (2,9%) из 69 исследуемых V617F/*JAK2*-отрицательных больных исключительно с диагнозом ИП. В то время как мутация W515L гена *MPL* обнаруживалась при ЭТ и ХИМФ в 2,2% (у 1 из 46) и 2% (1 из 51) больных, соответственно. Цитогенетические исследования клеток костного мозга у 129 больных ХМПЗ позволили стратифицировать больных по

прогностическим группам. Так, нормальный кариотип обнаружен у 110 (85,3%) из 129 исследуемых. Среди 19 (14,7%) пациентов с патологическим кариотипом, у 5 (3,9%) из 129 выявлены изолированные хромосомные aberrации (del(20q), del(13q)), обуславливающие благоприятное течение заболевания, у 8 (6,2%) пациентов – аномалии кариотипа промежуточного риска, и у 6 (4,7%) из 129 – комплексные нарушения кариотипа, относящиеся к неблагоприятным вариантам кариотипа. Причем хромосомные aberrации благоприятного прогноза достоверно чаще ($p=0,0000$) обнаруживались у больных с ИП в сравнении ХИМФ, а частота множественных комплексных нарушений кариотипа была достоверно выше у больных с ХИМФ, чем у больных с ИП и ЭТ ($p=0,0000$). Причем у 2 из 6 больных с комплексным кариотипом констатирована трансформация заболевания в ОМЛ.

Заключение: Таким образом, установлено, что мутации в генах JAK2 и MPL являются высокоспецифичными диагностическими маркерами пациентов с Rh-отрицательными ХМПЗ, а включение цитогенетических исследований в алгоритм обследования больных в дебюте заболевания позволяет стратифицировать пациентов на группы риска.

Выявление микроперестроек при использовании хромосомного анализа высокого разрешения с подтверждающей молекулярно-цитогенетической диагностикой у детей с недифференцированными формами умственной отсталости и нормальным кариотипом

Выявление микроперестроек при использовании хромосомного анализа высокого разрешения с подтверждающей молекулярно-цитогенетической диагностикой у детей с недифференцированными формами умственной отсталости и нормальным кариотипом

Колотий А.Д.^{1,2}, Ворсанова С.Г.^{1,2,3}, Юров И.Ю.^{1,2,4*}, Демидова И.А.^{1,2,3}, Кравец В.С.^{1,2,3}, Куринная О.С.^{1,2,3}, Шаронин В.О.², Юров Ю.Б.^{1,2,3}*

¹ ФГБУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава РФ»

² ФГБУ "Научный центр психического здоровья РАМН" Российской академии медицинских наук

³ ГБОУ ВПО «Московский городской психолого-педагогический университет»

⁴Кафедра медицинской генетики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России.

*Загородное шоссе 2, Москва 117152, Россия

Тел. +7 4959528990, e-mail: svorsanova@mail.ru;
ivan_iourov@yahoo.com

Ключевые слова: медицинская генетика, цитогенетическая диагностика, недифференцированная умственная отсталость, молекулярное кариотипирование, вариации генома, геномные аномалии, хромосомные микроабберации

The identification of microaberrations using high-resolution chromosome banding with following confirmation by molecular cytogenetic technology in children with idiopathic mental retardation and normal karyotype

Kolotii A.D.^{1,2}, Vorsanova S.G.^{1,2,3}, Iourov I.Y.^{1,2,4}, Demidova I.A.^{1,2,3}, Kravets V.S.^{1,2,3}, Kurinnaia O.S.^{1,2,3}, Sharonin V.O.², Yurov Y.B.^{1,2,3}*

¹FGBU "Moscow Institute of Pediatrics and Pediatric Surgery, Ministry of Health of the Russian Federation"

²FGBU "Mental Health Research Center of Medical Sciences" of the Russian Academy of Medical Sciences

³Moscow City University of Psychology and Education

⁴Medical Genetics Department Russian Academy of Postgraduate Education

*Zagorodnoe sh.2, Moscow 117152, Russian Federation

Тел. +7 4959528990, e-mail: svorsanova@mail.ru;
ivan_iourov@yahoo.com

Key words: autism, medical genetics, idiopathic mental retardation, molecular karyotyping, genomic variations, genome anomalies, chromosomal microaberrations

Введение. Структурные хромосомные аномалии в виде делеций и дупликаций небольшого размера (менее 5-7 млн пн) составляют значительную долю хромосомной патологии, выявляемую у детей с задержкой развития, аутизмом, пороками и/или малыми аномалиями развития [1]. Перестройки небольшого размера (микрперестройки) можно выявить лишь на хромосомных препаратах, позволяющих получить дифференциальное окрашивание (G- окрашивание, или GTG) высокого разрешения.

Кроме того, подобные аномалии требуют уточнения молекулярно-цитогенетическими методами, включая различные варианты гибридизации *in situ* и сравнительной геномной гибридизации [2-4]. В лаборатории молекулярной цитогенетики нервно-психических заболеваний ФГБУ МНИИ ПидХ Минздрава России наблюдались несколько случаев, когда у больных детей, поступивших на обследование с нормальным кариотипом, определенным ранее по месту жительства, были обнаружены различные хромосомные микроперестройки. Поводом для проведения повторного цитогенетического исследования у 14 детей с нормальным кариотипом и клиническими проявлениями, характерными для хромосомных синдромов, являлась высокая вероятность наличия у пациентов несбалансированных хромосомных микроперестроек.

Материалы и методы. Цитогенетические и молекулярно-цитогенетические исследования проводили на хромосомных препаратах, позволяющих анализ высокого разрешения (около 550 G-сегментов на гаплоидный хромосомный набор), как описано ранее. При FISH исследовании применялись сайт-специфичные ДНК зонды из коллекции лаборатории цитогенетики и геномики психических заболеваний ФГБУ «НЦПЗ» РАМН с использованием оригинальных протоколов [5]. Молекулярное кариотипирование на ДНК-микроматрицах проводили как описано нами ранее [6, 7]. Были обследованы 14 пациентов с идиопатическими формами умственной отсталости, задержкой развития, пороками и/или малыми аномалиями развития.

Результаты. В результате повторного кариотипирования некоторых пациентов с "нормальным" кариотипом, определенным при "стандартном" кариотипировании, с применением специального алгоритма цитогенетического исследования, основанного на хромосомном анализе высокого разрешения и молекулярно-цитогенетических исследования, были обнаружены аномалии следующих хромосом: 1, 2, 4, 9, 12, 14, 16, 18, 20 и X. В двух случаях хромосомная патология наблюдалась у мальчиков и в 12 случаях - у девочек. Например, в одном случае микроперестройку, которая была причиной заболевания ребенка, нельзя было выявить хромосомахным анализом высокого разрешения, а именно микроделецию 4p16.3 у ребенка с транслокацией между хромосомами 4 и 6, цитогенетически определяемую как сбалансированная перестройка. В этом случае размер делеции, вероятно, составлял менее 1,5-2 млн пн. FISH исследование с субтеломерной ДНК пробой на короткое плечо

хромосомы 4 выявило делецию терминальной части хромосомы 4 (del4p16.3). Таким образом, транслокация у ребенка оказалась несбалансированной. Также были выявлены, а впоследствии и подтверждены молекулярно-цитогенетическими методами 7 случаев делеций, 4 случая наличия дополнительного матерниала неизвестного происхождения и 2 случая наличия дериватных хромосом. Следует отметить, что ещё более эффективным методом исследования (с уточнением пн) в подобных случаях является метод агау CGH (молекулярное кариотипирование). Все обнаруженные хромосомные перестройки требовали уточнения молекулярно-цитогенетическими методами исследования.

Выводы. Применение специального алгоритма анализа хромосомных нарушений, основанного на сочетании дифференциального окрашивания высокого разрешения хромосом, гибридизации на хромосомах in situ (FISH метод) и на ДНК-микроматрицах (агау CGH) позволило выявить микроаномалии кариотипа и определить этиологические причины умственной отсталости, задержки и аномалий развития у всех 14-ти детей. Недифференцированные формы умственной отсталости создают трудности врачам-генетикам при медико-генетическом консультировании, что может привести к повторному рождению больного ребенка или спонтанным абортam в семье. Применение современных диагностических технологий позволяет выявлять новые нозологические формы наследственной патологии в обширной группе детей с недифференцированной (идиопатической) умственной отсталостью и другими наследственными аномалиями.

Исследование частично поддержано грантом Президента Российской Федерации (МД-4401.2013.7).

Список литературы

1. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. 2006. *Медицинская цитогенетика (учебное пособие)*. М., Медпрактика, 2006, 300с.
2. Соловьев И.В., Ворсанова С.Г., Демидова И.А. и др. 1995.- Роль молекулярно-цитогенетической диагностики в пост- и пренатальном выявлении хромосомной патологии. *Ультразвуковая перинатальная диагностика*, № 6-7, С. 65-70.
3. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. 2005. Современные достижения в молекулярно-цитогенетической диагностике

- наследственных болезней. *Клиническая лабораторная диагностика*, №11, С. 21-29.
4. *ISCN 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature*. 2009. Shaffer L.G., Slovak M.L., Cambell L.J. (eds). S.Karger, Basel, P. 138.
 5. Soloviev I.V., Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Malet P. 1994. Microwave activation of fluorescence in situ hybridization: a novel method for rapid chromosome detection and analysis. *Focus*, V. 16, P. 115-116.
 6. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Куринная О.С. и др. 2012. Диагностика геномных нарушений у детей с умственной отсталостью и аутизмом с помощью серийной сравнительной геномной гибридизации (array CGH и HRCGH). *Клиническая генетика и перинатальная диагностика*. №1, С. 50-54.
 7. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Kurinnaia O.S. et al. 2012. Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy, and congenital anomalies. *Mol. Cytogenet.*, V. 5, P. 46.
 - 8.

Полиморфизм генов *STAT1*, *STAT3*, *IL-17A*, *IL-6*, *NFκB* у женщин с аутоиммунным тиреоидитом и ожирением

*Кочетова О.В.*¹, *Викторова Т.В.*²

¹ Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Россия

² Башкирский государственный медицинский университет, Россия

* Республика Башкортостан, Уфа, Проспект Октября, 71

Тел.: 8347 2356088, e-mail: Olga_mk78@mail.ru

Ключевые слова: (аутоиммунный тиреоидит, ожирение, полиморфизм генов)

Gene polymorphism *STAT1*, *STAT3*, *IL-17A*, *IL-6*, *NFκB* in women with autoimmune thyroiditis and obesity

*Kochetova O.V.*¹, *Victorova T. V.*^{1,2}

¹ Institute of Biochemistry and Genetics, Russia;

² Bashkir State Medical University, Russia

Key words: autoimmune thyroiditis, obesity, gene polymorphism

Введение. Аутоиммунные болезни щитовидной железы - полигенные многофакторные воспалительные заболевания, в основе патогенеза которых лежит различной выраженности деструкция фолликулов и фолликулярных клеток щитовидной железы. Известно, что нарушение иммунной толерантности и возникновение специфической иммунной реакции по отношению к клеткам щитовидной железы являются причиной развития аутоиммунного тиреоидита (АИТ). Исходом АИТ чаще всего является первичный гипотиреоз. Главной причиной поражения большинства органов при гипотиреозе является уменьшение выработки клеточных ферментов вследствие дефицита тиреоидных гормонов. Это приводит к снижению обменных процессов и значительному уменьшению потребности в кислороде, замедлению окислительно-восстановительных реакций и показателей основного обмена. Аутоиммунному тиреоидиту сопутствует ожирение. В последние годы большое внимание уделяется изучению Th17 – клеток, играющих существенную роль в воспалительных и аутоиммунных процессах. Выбор генов-кандидатов обусловлен белковыми продуктами генов, участвующих в реализации опосредованного Th17-клетками иммунного ответа. В своей работе мы остановились на анализе распределения частот генов *STAT1*, *STAT3*, *IL-17A*, *IL-6*, *NfκB* у женщин, имеющих диагноз аутоиммунный тиреоидит и ожирение.

Материалы и методы. В работе использованы образцы ДНК 236 женщин, проживающих на территории Республики Башкортостан. Диагнозы АИТ и ожирение были верифицированы на основании комплексного клинико-инструментального исследования лечащими врачами и сотрудниками отдела ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» Роспотребнадзора в соответствии с МКБ-10. Из 116 женщин с аутоиммунным тиреоидитом 55 (47.4%) страдали ожирением. Среди здоровых (N=120) доля женщин с ожирением составила 20.7%. От всех участников было получено информированное добровольное согласие на использование биологического материала в планируемых исследованиях.

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием фенольно-хлороформной экстракции. Полиморфные локусы генов rs12693591 *STAT1*, rs2293152 *STAT3*, rs4711998 *IL-17A*, rs1800795 *IL-6* анализировали методом

полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим расщеплением ферментами *RsaI*, *MspI*, *TaqI*, *Hsp92II*. Инсерционно-делеционный полиморфизм rs28362491 гена *NFkB* анализировали методом ПЦР. При сравнении частот качественных признаков использовался критерий χ^2 Пирсона. Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга анализировали, используя программу SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/>). Логистическая регрессия применялась для выявления ассоциации полиморфных локусов с учетом бинарных признаков (индекс массы тела до 29 и более 29), вводимых в уравнение регрессии в качестве независимых переменных. Расчеты проводились в программе SNPStats.

Результаты. Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга не выявлено. Ассоциация с аутоиммунным тиреоидитом была показана для локуса rs28362491 гена *NFkB*, возможно это связано со снижением числа носителей гетерозигот среди больных, частота носителей гетерозигот среди больных составила 15.74%, среди здоровых -45.05% ($\chi^2=25.37$; $p=0.0000$), OR=0.55 (0.33-0.92). Выявлена ассоциация полиморфного локуса rs12693591 гена *STAT1* с развитием АИТ (в доминантной модели), OR в этом случае составило 1.8 (CI95% 1.06-3.06) ($p=0.04$). При введении поправки на ИМТ в уравнение логистической регрессии ассоциация сохранилась также для вариантов AA-AC (OR_{adj}=2.08 (1.05-4.12) $p_{adj}=0.036$). Не была выявлена ассоциация полиморфных вариантов rs2293152 гена *STAT3*, rs4711998 гена *IL-17A*, rs1800795 гена *IL-6* с развитием аутоиммунного тиреоидита. Коррекция на ИМТ выявила статистически значимые различия для полиморфного локуса rs2293152 гена *STAT3*. Введение поправки на ИМТ показало наличие ассоциации генотипов GC-CC (в доминантной модели) локуса rs2293152 гена *STAT3* с развитием АИТ (OR_{adj}=2.16 (1.17-3.99) $p_{adj}=0.013$).

Заключение. Маркерами риска развития АИТ и ожирения у женщин являются полиморфные локусы rs12693591 гена *STAT1* и rs2293152 гена *STAT3*. На развитие АИТ оказывает влияние полиморфный локус rs28362491 гена *NFkB*.

Работа получила частичную финансовую поддержку Российского гуманитарного научного фонда №13-06-00101 и Российского фонда фундаментальных исследований №13-04-00287а.

Загрязнение материнскими клетками в плодных образцах при проведении инвазивной пренатальной диагностики

Кривенцова Н.В., Авруцкая В.В., Шокарев Р.А., Гимбут В.С., Кример С.Ю., Клочкова Н.Е.

Федеральное государственное бюджетное учреждение Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии Минздрава России

Мечникова ул., 43, Ростов-на-Дону, Российская Федерация, 344012
Тел.: +7 9054550662, e-mail: r715@yandex.ru

Ключевые слова: пренатальная диагностика, заражение материнскими клетками, количественная флуоресцентная полимеразная цепная реакция

Maternal cell contamination of prenatal samples

Krivenцова N.V., Avrutskaya V.V., Shokarev R.A., Gimbut V.S., Kriger S.Y., Klochkova N.E.

Federal State Institution Scientific Research Institute of Obstetrics and Pediatrics Minzdrav RF

Mechnikova street 43, Rostov-on-Don, Russian Federation, 344012
Tel.: +7 9054550662, e-mail: r715@yandex.ru

Keywords: prenatal diagnosis, maternal cell contamination, quantitative fluorescence polymerase chain reaction

Присутствие материнских клеток в плодных образцах (maternal cell contamination, MCC) составляет серьезный потенциальный источник для ошибок в пренатальной диагностике.

Особенно важно не допустить попадания материнской крови в образец пуповинной крови плода при получении материала методом кордоцентеза, так как при длительном культивировании материнские клетки могут пролиферировать и приводить к диагностическим ошибкам. Высокая квалификация оператора и использование качественных реакций на выявление примеси материнской крови позволяют избежать этого осложнения. Во многих странах эта процедура предусмотрена стандартами проведения пренатальной диагностики. К сожалению, в России нет стандартов определения MCC при пренатальной диагностике.

Однако лаборатории, проводящие инвазивную пренатальную диагностику, должны использовать методы для оценки наличия и определения уровня загрязнения пробы материнскими клетками.

Целью исследования являлось определение доли МСС при проведении пренатальной диагностики.

Материалы и методы. ДНК изолировалась из амниоцитов, ворсин хориона и крови плода. Материнская ДНК выделялась из периферической крови пациентки. МСС оценивали методом количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции (QF-ПЦР), которую проводили путем амплификации микросателлитных маркеров с помощью флуоресцентно меченных праймеров, с последующим количественным анализом аллель пиков на генетическом анализаторе. Для мультиплексной ПЦР были использованы 12 пар праймеров для четырех локусов на каждую из хромосом 13, 18 и 21.

Результаты. В общей сложности были выполнены 730 инвазивных пренатальных диагностик. Из 509 образцов амниотической жидкости 7,9% имели различную степень примеси крови (видимые или после центрифугирования). В 5-ти случаях была обнаружено МСС. Во всех этих образцах визуально наблюдалась примесь крови. Из 19 образцов плодовой крови, полученной при кордоцентезе, МСС была обнаружена в 1 случае. В 202 образцах хориона загрязнение материнской тканью обнаружено не было. Таким образом, 0,8% образцов, полученных в результате инвазивной диагностики, имели МСС. Предел обнаружения МСС в лабораториях США находится в диапазоне от 1 до 20%, но определяется не во всех лабораториях [1].

Заключение: Лаборатория, проводящая пренатальную диагностику наследственных заболеваний, должна использовать методы для обнаружения и оценки уровня МСС. Это может быть использование комбинации нескольких полиморфных STR или VNTR маркеров [2]. В нашей лаборатории МСС определяется с помощью мультиплексной системы QF-ПЦР по 12 маркерам [3], чем достигается большая точность и специфичность.

Список литературы

1. Iris Schrijver, Sarah C. Cherny, James L. Zehnder. Testing for maternal cell contamination in prenatal samples. *A Comprehensive Survey of Current Diagnostic Practices in 35*

Molecular Diagnostic Laboratories. J Мол Diagn 2007, 9, P. 394-400

2. [Batanian JR](#), [Ledbetter DH](#), [Fenwick RG](#). A simple VNTR-PCR method for detecting maternal cell contamination in prenatal diagnosis. [Genet Test](#). 1998; 2(4), P. 347-50.
3. Кривенцова Н.В., Шокарев Р.А., Аврутская В.В., Кригер С.Ю., Клочкова Н.Е., Гимбут В.С., Корниенко И.В. 2011. Количественная флюоресцентная полимеразная цепная реакция в инвазивной пренатальной диагностике для выявления частых трисомий. *Пренатальная диагностика*. №1. С.72-78.

Тепловое воздействие на мейоциты самцов *Drosophila melanogaster* индуцирует появление потомков с однородительской дисомией по половым хромосомам

Кьергаард А.В.^{1,2*}, *Мамон Л.А.*³

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,

191015 Россия, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д.41

E-mail: anna_kyergaard@mail.ru

² Национальный государственный университет физической культуры, спорта и здоровья им. П.Ф. Лесгафта,

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

Резюме. Разработана модельная система для изучения однородительской дисомии (ОРД) по X-хромосоме у *Drosophila melanogaster*. Показано, что при действии теплового шока (ТШ) (37° С, 1 ч.) на стадии куколки на самцов *D. melanogaster* повышается частота исключительных потомков, возникающих в результате нарушения сегрегации как отцовских, так и материнских половых хромосом. Использованный подход позволил предположить, что мейотический период сперматогенеза является теплочувствительным по данному критерию. Частота особей с ОРД по половым хромосомам в потомстве самцов, несущих мутацию *sbr*¹⁰, была в 3-4 раза выше таковой в потомстве самцов, не имеющих этой мутации.

Ключевые слова: однородительская дисомия, нерасхождение хромосом.

Hyperthermia of Male Drosophila melanogaster Meiocytes Induces Uniparental Disomy of Sex Chromosomes of the Offspring

K'ergaard A. V.^{1,2*} and *Mamon L. A.*³

¹ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
Kirochnaya ul. 41, Saint-Petersburg, Russian Federation 191015

E-mail: anna_kyergaard@mail.ru

² National State University of Physical Education, Sport and Health
named after P.F. Lesgaft

³ St. Petersburg State University, Russian Federation

Summary. A model system has been designed to study uniparental disomy (UPD) of the sex chromosomes in *Drosophila melanogaster*. Heat shock (HS) (37° C for 1 h) of males at the pupal stage has been demonstrated to increase the number of offspring with abnormalities of not only paternal, but also maternal sex chromosome sets. According to the criterion used, there is a temperature-sensitive period of spermatogenesis, which presumably coincides with meiosis. The frequency of UPD of the sex chromosomes in the offspring of male carriers of the *sbr*¹⁰ mutation is 3-4 times higher than in the offspring of males without this mutation.

Key words: uniparental disomy, chromosome nondisjunction.

Введение. Дрозофила относится к уникальным модельным объектам, позволяющим генетическими методами анализировать нарушение сегрегации всех хромосом генома. Использование мутаций эволюционно консервативного гена *sbr* [1], нарушающих веретено деления в мейозе у самок и повышающих частоту хромосомной нестабильности [2], которая может являться причиной онкологических заболеваний, хромосомных болезней и бесплодия, позволяет оценивать вклад генетических факторов и неблагоприятных воздействий в появление потомков с нарушением хромосомного набора [3]. Цель работы – создание модельной системы для определения частоты ОРД по половым хромосомам у *Drosophila melanogaster*.

Материалы и методы. В качестве отцовских использовали линии *D. melanogaster* с маркированными X- и Y-хромосомами, а также несущими мутацию гена *sbr* (*sbr*¹⁰), нарушающую сегрегацию хромосом, и без этой мутации:

$y\ ct / Dp\ (1;Y)\ y^+$ и $y\ cv\ sbr^{10} / Dp\ (1;Y)\ y^+$. В качестве материнской использовали линию $y\ ct\ B$. Тепловому воздействию (37°C , 1 ч.) подвергали куколок различного возраста (24, 48 и 60 ч.). После вылета взрослых особей из обработанных куколок отбирали самцов, которых скрещивали с девственными трехдневными самками. В течение 4-х суток самцов ежедневно пересаживали в другие пробирки к новым самкам, а самок оставляли в тех же пробирках еще на 6 суток. В каждой повторности ставили интактный контроль.

Использованная система скрещиваний позволяла по фенотипу потомков F1 относить их к тому или иному классу нарушения сегрегации хромосом, в том числе выявлять особей с ОРД как отцовского, так и материнского происхождения. Самки с нормальным набором половых хромосом (XX) имели следующий фенотип: желтое тело и овальные глаза. Самцы с нормальным набором половых хромосом (XY) имели следующий фенотип: вырезка на крыле и полосковидные глаза. Самки с ОРД материнского происхождения (изодисомия XX) имели следующий фенотип: желтое тело, вырезка на крыле и полосковидные глаза. Самки с ОРД отцовского происхождения (изодисомия XX) имели следующий фенотип: желтое тело, отсутствие поперечной жилки на крыле. Самцы с ОРД отцовского происхождения (гетеродисомия XY) были плодовиты (в отличие от бесплодных самцов X0) и характеризовались отсутствием поперечной жилки на крыле.

Данная система скрещиваний не позволяла выявлять мозаицизм, поэтому для его изучения нами были разработаны другие модельные системы.

Результаты. Показано, что тепловое воздействие (37°C , 1 ч.) на мейоциты самцов *D. melanogaster* повышает частоту потомков с нарушением числа и набора не только отцовских, но и материнских половых хромосом. Особи с ОРД по половым хромосомам появлялись с частотой 3-4% при наличии у самцов мутации sbr^{10} и с частотой около 1% при ее отсутствии. Примерно в половине случаев они имели обе материнские половые хромосомы (изодисомия), а в половине – отцовские (изодисомия или гетеродисомия). Особи с ОРД могли первоначально быть трисомиками и восстановить диплоидный набор хромосом в результате потери лишней хромосомы в первом митотическом делении зиготы. В интактном контроле потомки с ОРД не выявлены.

В зависимости от возраста обработанных куколок аномальные потомки появлялись в основном среди особей, полученных из первых двух суточных яйцекладок (возраст куколок в момент воздействия - 24 ч.), второй и третьей (48 ч.) или только в третьей (72 ч.). Это позволило заключить, принимая во внимание особенности биологии объекта, что теплочувствительный период в сперматогенезе самцов *D. melanogaster* приходится на стадию мейоза.

Заключение: Полученные нами результаты позволили предположить существование фактора или факторов, попадающих в яйцеклетку вместе со спермием и способных повлиять на процесс расхождения как отцовских, так и материнских хромосом после оплодотворения. Процесс формирования этих факторов приходится на мейотический период сперматогенеза и, по-видимому, осуществляется при участии продукта эволюционно консервативного гена *sbr*.

Поскольку продукт этого гена является мРНК-связывающим белком, целесообразно проведение молекулярного анализа транскриптома зрелых спермиев в интактном контроле и после теплового воздействия (37° С, 1 ч.) на мейоциты самцов.

Список литературы

1. Третьякова И.В., Лёзин Г.Т., Маркова Е.Г. и соавт. 2001.
2. Продукт гена *sbr* у *Drosophila melanogaster* и его ортологи у дрожжей и человека. *Генетика*, Т.37, № 6, С. 725-736.
3. Никитина Е.А., Комарова (Кьергаард) А.В., Голубкова Е.В. и соавт. 2003. Полудоминантное влияние мутации *l(1)ts403 (sbr10)* на нерасхождение половых хромосом в мейозе у самок *Drosophila melanogaster* при тепловом воздействии. *Генетика*, Т.39, № 3, С.341-348.
4. Мамон Л.А. 2010. Механизмы плейотропного действия гена *small bristles (Dm nxf1)* *Drosophila melanogaster*, принадлежащего эволюционно консервативному семейству *nxf (nuclear export factor)*. *Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук*. С.-Петербург. гос. ун-т. Санкт-Петербург. 310 с.

Преподавание основ молекулярной генетики спорта в системе последилового образования спортивных врачей

Кьергаард А.В. ^{1,2}

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова

191015, Россия, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д.41

E-mail: anna_kyergaard@mail.ru

² Национальный государственный университет физической культуры, спорта и здоровья им. П.Ф. Лесгафта,

Резюме. В работе отражены наиболее важные аспекты преподавания основ молекулярной генетики спорта в системе последилового образования спортивных врачей. Ключевыми разделами курса являются «Введение в молекулярную генетику спорта» «Молекулярные основы наследственности», «Генетические маркеры», «Генетическое тестирование в спорте», «Нутригеномика, нутригенетика и фармакогенетика в спорте».

Ключевые слова: молекулярная генетика спорта, генетические маркеры

Teaching Sports Physicians in Basics of Molecular Genetics of Sport in the System of Postgraduate Education

K'ergaard A. V. ^{1,2}

¹ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Kirochnaya ul. 41, Piskarevskij pr. 47, Saint-Petersburg, Russia, 191015;

E-mail: anna_kyergaard@mail.ru

² National State University of Physical Education, Sport and Health named after P.F. Lesgaft,

Summary. The paper deals with the most important aspects of the teaching sports physicians in basics of molecular genetics in the system of postgraduate education. The key sections of the course are “Introduction to molecular genetics of sport”, “The molecular basis of heredity”, “Genetic markers”, “Genetic testing in sport” “Nutrigenomics, nutri-genetics and pharmacogenetics in Sport”

Key words: molecular genetics of sport, genetic markers

Введение. На современном этапе развития медицины чрезвычайно важно умение спортивных врачей активно и компетентно применять в своей профессиональной деятельности достижения молекулярной генетики спорта – науки о закономерностях наследования признаков, значимых в условиях спортивной деятельности. Однако большая часть слушателей знакомится с этой молодой и бурно развивающейся областью науки лишь в системе последиplomного образования, где на ее изучение отводится всего несколько лекционных часов. Поэтому представляется актуальным выделить те аспекты изучения молекулярной генетики спорта, которые наиболее необходимы спортивным врачам.

В основе молекулярной генетики спорта лежит представление о том, что индивидуальные различия в степени развития тех или иных физических и психических качеств человека во многом обусловлены ДНК-полиморфизмами – структурными вариациями ДНК, определяющими генетическое разнообразие индивидуального реагирования организмов на любые изменения окружающей среды [1]. Исследуя фенотипическое проявление генных полиморфизмов, в спортивной генетике выделяют молекулярно-генетические маркеры (определенные аллели гена либо генотипы, различные комбинации аллелей и генотипов), ассоциированные с предрасположенностью или противопоказанием к занятиям теми или иными видами спорта, развитием и проявлением какой-либо двигательной способности (физического качества), а также с антропометрическими, биохимическими, физиологическими, психологическими и другими показателями [2, 3]. Генетические маркеры исследуют с помощью молекулярно-генетического тестирования, которое становится все доступнее и дешевле. На его основе следует формировать научно обоснованную систему отбора, воспитания и укрепления здоровья будущих выдающихся спортсменов. Генетические маркеры можно анализировать сразу после (и даже до) рождения ребенка и, следовательно, составлять ранние прогнозы развития показателей, значимых в условиях спортивной деятельности.

Комплексное использование клиничко-лабораторных и генетических методов диагностики в работе спортивного врача представляет собой необходимую предпосылку для индивидуального подхода к каждому спортсмену. В диагностический комплекс должны входить и генетические маркеры, не меняющиеся на протяжении всей жизни, и значимые

фенотипические маркеры (генетически детерминированные признаки, изменяющиеся под воздействием среды и проявляющиеся в полной мере в разные периоды онтогенеза), поскольку только они могут отражать влияние среды на формирование наследственно закрепленных признаков в процессе онтогенеза.

Основные области применения молекулярной генетики в спортивной медицине:

- 1) Медико-генетическое консультирование по вопросам противопоказаний / предрасположенности к занятиям спортом и т.д.
- 2) Адекватный генетическим особенностям выбор спортивной специализации, режима тренировок и стиля соревновательной деятельности.
- 3) Научно обоснованные рекомендации относительно режима дня спортсмена, его питания, приема биологически активных веществ и т.д.
- 4) Профилактическая работа со спортсменом на основе его наследственной предрасположенности к тем или иным заболеваниям и нарушениям функций организма.
- 5) При необходимости – выбор оптимального способа лечения и дозировки лекарственных препаратов в соответствии с индивидуальными генетическими особенностями спортсмена.

Важными разделами курса являются нутригеномика, описывающая влияние компонентов пищи на экспрессию генов, нутригенетика, определяющая оптимальную диету для конкретного человека на основе его генотипа, и спортивная фармакогенетика, изучающая генетические особенности спортсмена, влияющие на его фармакологический ответ. Общая задача спортивной фармакогенетики, нутригеномики и нутригенетики - расширение возможностей адаптации организма спортсмена к физическим нагрузкам за счет индивидуализации выбора режима питания и компонентов пищи, разрешенных биологически активных веществ, а также фармакологических средств и их дозирования в зависимости от его генетической конституции.

Заключение. Таким образом, преподавание основ молекулярной генетики спорта в системе последиplomного образования спортивных врачей представляется весьма полезным и перспективным. Полученные знания окажут им помощь в выявлении противопоказаний к занятиям тем или иным видом

спорта, консультировании по вопросам спортивной ориентации и отбора, интенсивности тренировочного процесса и стиля соревновательной деятельности, оптимизации образа жизни и характера питания, а также в профилактике и лечении профессиональных заболеваний и травм с учетом генетических особенностей организма спортсмена.

Список литературы

1. Ахметов И.И. 2009. *Молекулярная генетика спорта*. Монография. М.: Советский спорт, 268 с.
2. Тарковская И. В., Глотов О. С., Диткина Е. Ю. и соавт. 2012. Анализ ассоциации полиморфизма генов метаболизма липидов с индексом массы тела, обхватом талии и параметрами липидограммы крови у женщин. *Экологическая генетика*, Т. 10, № 4, С. 66-76.
3. Глотов А. С., Вашукова Е. С., Глотов О. С. и соавт. 2012. Исследование молекулярно-генетических маркеров роста человека. *Экологическая генетика*, Т. 10, № 4, С. 77-84.

ПЦР-метод для обнаружения и идентификации патогенных грибов у пациентов с онихомикозом

Лавникевич Д.М.^{1}, Медведева Т.В.¹, Чилина Г.А.¹, Васильева Н.В.¹, Полищук А.Г.¹*

¹Институт Медицинской Микологии им.П.Н. Кашкина Северо-Западного Государственного Медицинского Университета им. И.И.Мечникова, Российская Федерация.

* ул. Сантьяго-де-Куба, д. 1/28, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194291

Тел.: +7 9119567134, e-mail: Dmitrii.Lavnikovich@spbmapo.ru.

Ключевые слова: онихомикоз, ПЦР, клиническая чувствительность и специфичность

PCR-based method for detection and identification of pathogenic fungi in patients with onychomycosis

Lavnikovich D.M.^{1}, Medvedeva T.V.¹, Chilina G.A.¹, Vasiljeva N.V.¹, Polischouk A.G.¹*

¹Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Russian Federation

*Santiago-de-Cuba str., 1/28, Saint-Petersburg, Russian Federation, 194291
Tel.: +7 9119567134, e-mail: Dmitrii.Lavnikovich@spbmapo.ru.

Key words: onychomycosis, PCR, clinical sensitivity and specificity

Введение. Онихомикозы относятся к широко распространенным заболеваниям микотической природы у человека [1]. На сегодняшний день практически нет чувствительных методов выявления спектра патогенных грибов-возбудителей данного заболевания [2]. Применяемые культуральные и гистологические методы недостаточно чувствительны, а кроме того, трудоемки и занимают продолжительное время [2]. В связи с этим, актуальность приобретает поиск новых способов диагностики данного заболевания. В настоящее время в России и за рубежом активно разрабатываются молекулярно-генетические методы диагностики различных заболеваний, в том числе и микозов. Целью нашей работы являлась разработка и оценка мультиплексного ПЦР-теста для обнаружения и идентификации патогенных грибов, наиболее часто обнаруживаемых у пациентов с онихомикозом в Санкт-Петербурге, и оценка возможности использования ПЦР-теста для мониторинга эффективности терапии.

Материалы и методы. Метод разрабатывался для определения принадлежности патогенных грибов, выделенных из ногтевых пластинок, к одному из четырех родов: *Trichophyton* как представителю дерматомицетов, *Aspergillus*, *Candida* и *Fusarium* как представителям недерматомицетов. Создаваемый тест представляет собой мультиплексную ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов реакции. Оценку клинической чувствительности и специфичности ПЦР-теста проводили по отношению к результатам КОН-микроскопии, которая, на сегодняшний день является “золотым стандартом” лабораторной диагностики онихомикоза, а также по отношению к результатам культурального исследования и совместного использования КОН-микроскопии и культурального исследования.

Результаты. На данный момент система протестирована на 63 образцах ногтевых пластинок от двух групп пациентов: с диагнозом “онихомикоз кистей и стоп” - 56 образцов и диагнозом “ониходистрофия” – 7 образцов. В исследовании использовался

материал от больных, обратившихся в микологическую клинику НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина в период с мая 2012 по май 2013. По предварительной оценке, клиническая чувствительность ПЦР-теста по отношению к КОН-микроскопии, посеву и КОН-микроскопии+посев составила 77%, 86% и 78% соответственно, а специфичность – 70%, 52% и 76% соответственно. Во всех образцах с ониходистрофией ПЦР-тест дал отрицательный результат. В трех случаях проводилось последующее врачебное наблюдение для контроля эффективности лечения с параллельным проведением ПЦР-анализа. В одном из них, на основании результатов ПЦР-теста была изменена терапия: у пациента с первоначальным диагнозом “кандидоз” ПЦР-тест показал наличие грибов рода *Trichophyton*, и терапия была изменена на другую, направленную против дерматомицетов, которая впоследствии дала положительный результат. В двух других случаях результаты ПЦР-теста соответствовали наблюдаемой клинической картине.

Выводы. Мы разработали мультиплексную ПЦР систему для обнаружения и идентификации патогенных грибов четырех родов- *Trichophyton*, *Aspergillus*, *Fusarium* и *Candida*. ПЦР-тест позволяет, в отличие от КОН-микроскопии, определять род возбудителя онихомикоза. При этом необходимое время для проведения этого теста составляет один день, в то время как для культурального исследования это 14-28 дней. Сравнительно низкая клиническая специфичность ПЦР-теста может быть связана с тем, что она оценивалась по отношению к КОН-микроскопии и посеву, чувствительность которых в настоящий момент является предметом научных дискуссий. Для более точной оценки чувствительности и специфичности ПЦР-теста требуется проведение исследования на большем количестве случаев с наблюдением клинической картины заболевания и эффективности лечения антимикотическими препаратами.

Список литературы

1. Кожичкина Н.В. 2013. Этиология микозов стоп и онихомикоза. *Вестник дерматологии и венерологии*, №1. С. 9-13.
2. Singal A., Khanna D. 2011. Onychomycosis: diagnosis and management. *Indian Journal of Dermatology, venereology and leprology*, Vol. 77(N 6), P. 659-672.

Атаксия-телеангиэктазия: диагностические критерии

Ледашчева Т.А.^{1,2*}, Тулуш Е.К.², Куранова М.Л.^{3,4}, Спивак И.М.³

¹ ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И.Мечникова Минздрава России

² СПб ГКУЗ Диагностический центр (медико-генетический)

* Тобольская ул., 5, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194191

Тел.: +7 812 294 70 02, e-mail:ledashcheva@mail.ru, tulushik@mail.ru

³ Институт цитологии РАН, Российская Федерация

⁴ Санкт-Петербургский Государственный Политехнический Университет, Российская Федерация

Ключевые слова: атаксия-телеангиэктазия, ангиоматоз, хромосома, экзон, мутация, онкоген, иммуноглобулин.

Ledashcheva T.A.^{1,2}, Tulush E.K.², Kuranova M.L.^{3,4}, Spivak I.M.³*

¹ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov

² St. Petersburg Centre for Medical Genetics

³Institute of Cytology RAS, Russian Federation

⁴ St.Petersburg Polytechnic University, Russian Federation

* Tobolskaya str. 5, St. Petersburg, Russian Federation, 194191

Тел.: +7 812 294 70 02, e-mail:ledashcheva@mail.ru, tulushik@mail.ru

Key words: ataxia-teleangiectasia, angiomatosis, chromosome, exon, mutation, oncogenes, immunoglobulin.

Введение. Атаксия-телеангиэктазия (АТ) относится к моногенным генодерматозам, которые обусловлены дефектами онкогенов. Молекулярной основой их является повреждение генов-супрессоров опухолевого роста. Развитие АТ связано с мутацией в гене *ataxia teleangiectasia mutated* (АТМ), функциональный дефект которого приводит к нарушению репарации 2х-нитевых разрывов ДНК, контроля клеточного цикла в критических точках, регуляции длины теломеры и предотвращает переключение на апоптоз. Тип наследования аутосомно-рецессивный. Частота АТ варьирует в различных популяциях от 1:40000 до 1: 100000-300000 населения, доля гетерозиготных носителей гена *atm* составляет от 1 до 7%. Основными клиническими проявлениями являются патология центральной нервной системы, кожи, глаз, иммунодефицитное состояние, высокая предрасположенность к неоплазиям, а также значительно повышенная чувствительность к ионизирующему

излучению, ограниченная пролиферативная способность клеток и значительное укорочение теломер уже при рождении ребёнка. Цель исследования. Проведение клиничко-молекулярно-генетических корреляций у больных АТ в исследуемой группе.

Материалы и методы. Исследованы 16 семей с 18 больными, из них семейные случаи составили 18,8%. Проведено клиническое, молекулярно-генетическое, цитогенетическое и инструментальное обследование.

Результаты. Все пациенты были детского возраста, пик диагностики отмечен в возрастной группе с 5-10 лет и составил 60%. Молекулярно-генетические исследования были проведены в 18,5% семей, у всех обследуемых пробандов были определены мутации, приводящие к развитию АТ, а также определено носительство мутации в гене АТМ у 6 родственников I и II степени родства. Данные анализа иммунологических исследований у 30% пациентов выявили нарушение иммунного статуса в виде Т-лимфоцитопении, выраженной гипогаммаглобулинемии IgA (100%). Снижение показателей IgG наблюдалось лишь у 33,3% больных. 76,9% пациентов были отнесены к группе часто и длительно болеющих. 46,2% больных страдали пневмониями, из них в 56,7% с развитием бронхоэктазов, пневмосклероза и летальным исходом в раннем детском возрасте. Также иммунодефицитные состояния способствовали развитию злокачественных опухолей лимфатической системы. По нашим данным, неоплазии лимфоидной ткани составили 25% случаев от всех новообразований. Также было отмечено повышение частоты злокачественных неоплазий у облигатных гетерозигот и кровных родственников больных (6 человек), про которых достоверно было известно, что они являются гетерозиготными носителями гена АТМ.

Выводы. Клиническая картина АТ представлена преимущественно неврологическими симптомами, из которых ведущим симптомом является мозжечковая атаксия, также специфичны явления первичного иммунодефицита. Определяющими методами, позволяющими уточнить диагноз АТ, являются: клинический осмотр, ДНК-зондовая диагностика, исследование иммунного статуса, функций ЦНС (ЭЭГ, КТ и/или МРТ головного мозга), органов зрения (биомикро- и гониоскопия глаз). Дополнительные исследования проводятся по показаниям с целью диагностики интеркуррентных заболеваний. Ранняя диагностика АТ способствует своевременному началу лечебно-

профилактических мероприятий у пробандов и проведению инвазивной пренатальной диагностики в семьях, отягощенных по данной патологии.

Маркеры воспалительного ответа у больных эпилепсией

Липатова Л.В.^{1}, Серебряная Н.Б.², Сивакова Н.А.¹*

¹Санкт-Петербургский научно-исследовательский психоневрологический институт им. В.М. Бехтерева

*ул. Бехтерева д.3, Санкт-Петербург, Россия, 192019

Тел.: +78124127280, e-mail: epilepsy-net@ya.ru

² ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет

им. И.И.Мечникова» Минздравсоцразвития России

Ключевые слова: эпилепсия, воспаление, цитокины

The markers of inflammation response in epileptic patients

Lipatova L.V.^{1}, Serebryanaya N.B.², Sivakova N.A.¹*

¹ St. Petersburg V.M. Bekhterev Psychoneurological Research Institute,

*Bekhterev str. 3, St. Petersburg, Russia, 192019

Tel.: +74128127280, e-mail: epilepsy-net@ya.ru

² North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov

Key words: epilepsy, inflammation, cytokines

Введение. Эпилепсия является следствием особого воспалительного процесса в центральной нервной системе, который связан как с индукцией судорожного синдрома, так и с его прогрессированием. Имеются многочисленные экспериментальные и клинические данные о роли воспаления в патогенезе эпилепсии, в частности, о связи повышенных уровней провоспалительных цитокинов и белков острой фазы воспаления с риском развития судорожных припадков [2, 4]. Хроническому воспалительному процессу при эпилепсии способствует активация микроглии и развитие астроглиоза, что сопровождается повреждением нейронов [5]. В результате нарушается citoархитектура гиппокампа с развитием локальной нейродегенерации [1].

Участие процесса воспаления в патогенезе эпилепсии наглядно подтверждается эффективностью различных противовоспалительных средств в лечении форм эпилепсии, резистентных к традиционным антиконвульсантам [3]. Природными модуляторами иммунного ответа и специфическим классом регуляторных молекул являются цитокины. Воспалительные факторы и посредники, такие как IL-1 β , IL-8 и TNF, влияют на нейрональную трансмиссию медиаторов, способствуют развитию гиперсинхронности и гипервозбудимости нейронов головного мозга за счет ингибирования поглощения глутамата астроцитами, что создает условия для предиктального состояния и глутаматной эксайтотоксичности [6]. В связи с вышеизложенным, актуальным представляется изучение маркеров воспаления у больных эпилепсией (БЭ).

Цель исследования. Изучить концентрацию цитокинов семейства IL-1 β , IL-8 и рецепторного антагониста RAIL-1 у БЭ, выявить особенности воспалительного ответа у БЭс различными вариантами течения заболевания.

Материалы и методы. Исследование иммунологических маркеров воспаления проводилось в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) у 29 БЭ. Среди пациентов было выделено две подгруппы: с контролируемой эпилепсией (КЭ) - 12 человек и с резистентной формой заболевания (РЭ) - 17 человек. Контрольную группу составили здоровые лица (21 донор крови), у них исследовалось содержание про- и противовоспалительных факторов только в сыворотке крови.

Результаты. Концентрации в плазме крови цитокинов IL-1 β и IL-8 у БЭ существенно превышали показатели в контроле: в первой группе они были равны $306,5 \pm 14,0$ и $490,1 \pm 99,4$ пг/мл; во второй- $0,36 \pm 0,01$ и $0,94 \pm 0,2$ пг/мл ($p < 0,0005$), соответственно. При этом концентрация RAIL-1 была существенно ниже в плазме крови у БЭ, чем у здоровых лиц ($133,4 \pm 83,1$ и 420 ± 116 пг/мл, соответственно, $p(t) < 0,01$). В ЦСЖ пациентов RAIL-1 не определялась, то есть была ниже 10 пг/мл, величины, характеризующей чувствительность используемых ИФА тест-систем. При этом концентрации IL-1 β и IL-8 в ЦСЖ была определима и даже выше, чем в плазме крови здоровых лиц: $77,1 \pm 17,3$ и $6,4 \pm 2,5$ пг/мл.

Выводы. Выявлено значительное статистически значимое увеличение содержания провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-8 у БЭ в сравнении со здоровыми лицами, что свидетельствует о

значении воспаления в патогенезе эпилепсии. Установлено наличие недостаточности эндогенных антагонистов–модуляторов воспаления у БЭ: снижение концентрации RAIL-1 на фоне повышения концентрации IL-1 β . Имеются различия по степени воспалительного ответа организма у больных эпилепсией с различными вариантами течения заболевания: отмечается достоверно более высокая концентрация провоспалительного цитокина IL-1 β как в сыворотке крови, так и в ликворе у больных РЭ, в сравнении с пациентами с КЭ. Учитывая связь изученных лабораторных данных с клиническими особенностями течения эпилепсии, представляется перспективным дальнейшее изучение маркеров воспаления у БЭ и использование модуляторов воспаления в качестве патогенетической терапии эпилепсии.

Список литературы

1. Allan S.M., Rothwell N.J. 2001. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.*, Vol. 2, P.734–744.
2. De Simoni M.G., Perego C., Ravizza T., et al. 2000. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur. J. Neurosci.*, Vol. 12, P. 2623–2633.
3. Dinkel K., MacPherson A., Sapolsky R.M. 2003. Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS. *J. Neurochem.* Vol. 84, P. 705–716.
4. Lehtimäki K.A., Keränen T., Huhtala H., et al. 2004. Regulation of IL-6 system in cerebrospinal fluid and serum compartments by seizures: the effect of seizure type and duration. *J. Neuroimmunol.*, Vol. 152, P. 121–125.
5. Vezzani A., Moneta D., Richichi C., et al. 2002. Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia*, Vol. 43, P. 30–35.
6. Zou J.Y., Crews F.T. 2005. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition.; *Brain Res.*, Vol.1034, P. 11—24.

Стратегия молекулярно-генетической диагностики при злокачественных новообразованиях женской репродуктивной системы

*Любченко Л.Н. , Филиппова М.Г. , Портной С.М., Любченко Л.Н.**
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН», Россия
115478, Москва, Каширское шоссе, 24
Тел.: +7(495)324-43-21, e-mail: clingen@mail.ru

Ключевые слова: наследственный рак молочной железы и яичников, молекулярно-генетическая диагностика

The strategy of molecular genetic diagnosis of malignant tumors of the female reproductive system

Lyubchenko L.N.¹, Philippova M.G.², Portnoy S.M.³, Lyubchenko L.N.^{3}*

FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» RAMS, Russia
115478, Moscow, Kashirskoe shosse, 24
Tel.: +7(495)324-43-21, e-mail: clingen@mail.ru

Key words: hereditary breast and ovarian cancer, molecular and genetic diagnostics

Введение. Своевременная диагностика злокачественных опухолей во многом определяет успех лечения: 80-90% больных с начальными стадиями рака после радикального лечения переживают пятилетний период – критерий излеченности злокачественной опухоли. Инновационные геномные и протеомные технологии, совершенствование биохимических, морфологических, цитологических, иммуногистохимических и других методов лабораторной диагностики позволяют решать проблему ранней диагностики наследственных и sporadических форм злокачественных новообразований в комплексе.

С использованием молекулярно-биологических инновационных технологий выявляют наиболее характерные структурно-функциональные перестройки и дефекты генов, ответственных за предрасположенность к возникновению наследственных форм рака, определяют риск развития неоплазий, прогнозируют течение заболевания, определяют тактику лечения и профилактики. Целью работы было создание, разработка и

внедрение в клиническую практику комплексной методики использования молекулярно-генетических диагностических тест-систем и клиничко-рентгенологической диагностики при злокачественных новообразованиях женской репродуктивной системы (ЖРС).

Материал и методы. В работе, выполненной в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина, изучен вклад молекулярно-генетических факторов в развитие и патогенез рака молочной железы и яичников. Для определения основных полиморфных вариантов генов при злокачественных новообразованиях ЖРС использованы методы диагностики аллель-специфичной гибридизации на биологических микрочипах и генотипирование методом ПЦР в режиме реального времени с использованием разработанных диагностических панелей.

Результаты. Результаты использования комплексной методики с применением молекулярно-генетических диагностических тест-систем, разработанного алгоритма клиничко-генетической и лучевой диагностики, рекомендаций по наблюдению и профилактике у пациентов с наследственной предрасположенностью позволяют существенно улучшить раннюю и дифференциальную диагностику, индивидуализировать лечебную тактику и профилактику злокачественных опухолей ЖРС, тем самым снизить онкологическую смертность.

Заклучение. Разработанные методы ориентированы на широкое применение в научно-исследовательских и лечебных организациях медицинского профиля и являются конкурентоспособными на мировом рынке.

Список литературы

1. Lynch H., Snyder C., Lynch J. 2012. Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation. *Ann. Surg. Oncol.* Jun;19(6), P.1723-31. doi: 10.1245/s10434-012-2256
2. Любченко Л.Н. «Наследственный рак молочной железы и/или яичников: ДНК-диагностика, индивидуальный прогноз, лечение и профилактика», *Автореферат док. диссертации*. Москва, 2009, 49 с.
3. *PDQ® Cancer Information Summary. National Cancer Institute; Bethesda, MD. Genetics of Breast and Ovarian Cancer (PDQ®) – Health Professional.* Date last modified 04/24/2009. Available at <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/genetics/breast-and-ovarian/healthprofessional>. Accessed 05/15/2009.

Преимущества новой парадигмы экспериментальной онкологии: индивидуальный прогноз исхода иммунотерапии на основании анализа суррогатных биомаркеров

Моисеева Е.В.^{1*}, Аронов Д.А.¹, Семушина С.Г.¹, Боженко В.К.²

¹ ФГБУ науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия

² ФГБУ Российский научный центр рентгенорадиологии Минздравсоцразвития РФ, Россия

* ул. Миклухо-Маклая 16/10, Москва, Россия, 117997

Тел. +7 9175356549, e-mail: evmoise@gmail.com

Введение. В параллели с современной концепцией персонализированной, предсказательной и превентивной медицины (так называемой концепцией «3-х П») в области онкологии нами разработана оригинальная персонализированная «3С»-парадигма доклинического тестирования противоопухолевых препаратов, которая включает в себя: (1) *Сет*, или многоуровневый комплекс взаимодополняющих конвенциональных мышинных моделей, воспроизводящих широкий спектр различных типов рака молочной железы (РМЖ) человека; (2) *Стадии* тестирования, включающие последовательные этапы исследований *in vitro* и *in vivo* на перевиваемых и спонтанных моделях РМЖ, а также апробирование профилактических режимов применения; (3) *Стратификацию* как методологию выделения наиболее гомогенных подгрупп из достаточно гетерогенной популяции инбредных линий мышей как до (стратифицированная выборка вместо рандомизированной), так и после проведения эксперимента (выявление успешных и неуспешных подгрупп), что позволяет выявить как положительный, так и отрицательный эффект препарата в каждом эксперименте, соответственно.

Иммунотерапия РМЖ считается привлекательным дополнением к стандартной адьювантной терапии. Целью противораковой терапии интерлейкином-2 (ИЛ-2) является опосредованное Т-клетками и/или натуральными киллерами отторжение опухоли. Однако в ряде случаев была продемонстрирована прямая стимуляция ИЛ-2 клеток РМЖ человека *in vitro*. Более того, двойственный эффект терапии ИЛ-2 был показан *in vivo*: наблюдалось как замедление, так и ускорение опухолевого роста в рамках одного эксперимента. Таким образом, успешность применения ИЛ-2 для пациента с РМЖ до сих пор

остаётся неясной. Цель исследования - показать преимущества новой парадигмы, используя в качестве примера изучение эффектов терапии ИЛ-2 РМЖ мыши с целью выявления как успешных, так и неуспешных подгрупп реципиентов в одном и том же эксперименте и демонстрации прогностической ценности исходных рутинных биохимических показателей сыворотки, ассоциированных с исходом терапии.

На день 0 у интактных мышей линии BLRB (n=64) были индивидуально взяты образцы крови. Были измерены 13 биохимических показателей сыворотки крови. На день 14 всем мышам был подкожно перевит спонтанный сингенный РМЖ. На день 27 мыши с рано проявившимися опухолями (n=8) были дважды пролечены 2.5×10^5 МЕ ИЛ-2/мышь/инъекцию, контрольные мыши (n=11) получили растворитель таким же образом. Ежедневно оценивали состояние здоровья и выживание мышей, ежедневно измеряли размер опухоли. Значимость различий параметров оценивали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента.

Показано, что скорость роста опухоли пролеченных ИЛ-2 мышей была в среднем замедлена по сравнению с ростом опухоли в контроле, что привело, однако, только к незначительному увеличению средней продолжительности жизни (СПЖ) пролеченных мышей. При этом как у пролеченных, так и у контрольных реципиентов наблюдались два определенных периода на кривых выживания относительно СПЖ в контроле (41^{ый} день). Соответственно, в обеих группах были выявлены короткоживущие мыши (КЖ, прожившие короче СПЖ в контроле) и долгоживущие реципиенты (ДЖ, прожившие дольше СПЖ в контроле). Доля ДЖ мышей была больше среди пролеченных ИЛ-2 животных по сравнению с контрольными (63% против 46%, соответственно). У пролеченных ИЛ-2 КЖ мышей (неуспешная подгруппа) по сравнению с пролеченными ДЖ мышами (успешная подгруппа) было выявлено достоверное изменение в исходном уровне биомаркеров хронического воспаления печени: повышение уровня билирубина и аспаратаминотрансферазы при снижении уровня альбумина сыворотки крови ($p < 0.05$), тогда как подобного различия между показателями контрольных КЖ и ДЖ мышей не наблюдалось.

Новая персонализированная концепция проведения доклинического испытания позволила (1) продемонстрировать двойственность иммунотерапии ИЛ-2 даже для мышей-

опухоленосителей инбредной линии и (2) показать, что ограничением для успешной терапии в данном случае являлось наличие исходных воспалительных процессов в печени. Полученные данные говорят (1) о необходимости индивидуального прогноза успешности иммунотерапии для данного пациента и (2) о полезности рутинных биохимических показателей сыворотки крови как биомаркеров воспалительных процессов.

Ключевые слова: парадигма, прогноз, биомаркеры, рак молочной железы

Advantages of a new paradigm in experimental oncology: individual prognosis of immunotherapy outcome based on surrogate marker analysis

*Moiseeva E.V.*¹, Aronov D.A.¹, Semushina S.G.¹, Akhvlediani S.D.¹, Bojenko V.K.²*

¹ M.M. Shemyakin–Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Russian Federation ² Russian Scientific Center of Radiology and Nuclear Medicine, Russian Federation * Ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, Russia, 117997
Tel: +7 9175356549, e-mail: evmoise@gmail.com

Keywords: paradigm, prognosis, biomarkers, breast cancer.

Introduction. A novel “3S”- paradigm of experimental anti-cancer drug testing was developed in parallel with a modern conception of personalized, predictive, and preventive medicine in oncology. This paradigm was grounded on (1) Set of complementary mouse models to reproduce a wide range of human breast cancer (BC) types; (2) Steps of preclinical anti-cancer drug testing procedure starting from *in vitro* and *in vivo* research on transplanted and spontaneous BC mouse models followed by probing of preventive regimen(s); (3) Stratified sampling as a methodology to distinguish more homogeneous subgroups within a heterogeneous population of experimental inbred mice before and after testing procedure to show both positive and negative effects of a given drug in each experiment.

Immunotherapy to cure breast cancer may be attractive adjuvant therapy as standard methods of BC treatment are currently failed to prolong overall patient survival. The main purpose of interleukin-2 (IL-2) treatment was to stimulate tumor destruction by T-cells and/or natural killers. However, IL-2 sometimes may cause proliferation of human BC cells *in vitro*. Moreover, the dual nature of IL-2 treatment has been

shown in several mouse models *in vivo* as cancer growth rate of some tumors may be inhibited, while other tumors may be stimulated in the same experimental set. Therefore, the medical implication of IL-2 treatment in personalized BC clinic is still unclear.

The aim of the study is to show the advantage of the new paradigm using an example of preclinical IL-2 testing in a mouse BC model to distinguish both positive and negative therapy effect and demonstrate predictive value of routine laboratory clinical parameters associated with prolonged and shortened survival of individual tumor-bearing mice, i.e. beneficial and non-beneficial subgroups, correspondingly.

Materials and methods. At day 0 individual blood samples were collected from intact BLRB male mice (n=64) under ether narcosis; 13 biochemical serum parameters were measured individually. Two weeks later tumor cells from syngeneic female spontaneous breast cancer were transplanted s.c. to all BLRB males. Two weeks later males with early appeared tumors were selected: experimental males (n=9) were treated with IL-2 twice (2.5×10^5 IU of IL-2/mouse/injection); while control mice (n=11) were injected with saline in the same manner. Mice were inspected each day for health condition and survival, tumor size was measured once a week. Parametric Student's t-test was used for statistical estimation.

Results. Tumor growth rate of IL-2 treated mice was reduced comparing with an average value in controls. However, the average life span of treated males was only slightly prolonged *versus* survival of controls. Both treated mice and controls showed two distinct periods in their survival curves: before (short survivors) and after (long survivors) the average survival of control mice (day 41). The ratio of long survivors (beneficial subgroup) was higher in treated group than in controls (namely, 63% vs. 46%). No differences were observed in initially measured biochemical serum parameters for short and long control survivors. However, IL-2 treated short survivors showed the significantly increased levels of bilirubin and aspartate aminotransferase, and decreased level of albumin in serum ($p < 0.05$). These parameter changes are well-known biomarkers of chronic liver inflammation.

Conclusion. The new methodology to stratify mice individually according to their short and long survival in both treated in control group allowed (1) to reveal benefit and detriment effects of IL-2 treatment in the same experiment, (2) to show limitations of IL-2 treatment for 37% of non-beneficial mice based on their individual

biochemical parameters as surrogate markers of chronic liver inflammation.

Иммунограмма при инфекционном мононуклеозе у детей

Нишева Е.С.^{1,2}, Макарова Т.А.², Соколова Н.Е.², Маларева Е.В.², Каплин Н.Н.¹, Майхуб М.¹.

¹ Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия

* Литовская ул., 2, Санкт-Петербург, Россия, 194100

Тел.: +7 9112626370, e-mail: nisheva@rambler.ru

² Санкт-Петербургское учреждение здравоохранения Детская городская больница №1.

Immunograms in acute infectious mononucleosis in children

Nisheva E.S.^{1,2}, Makarova T.A.², Sokolova N.E.², Malareva E.V.², Kaplin N.N.¹, Mayhub M.¹

¹ St. Petersburg State Pediatric Medical Academy

* Litovskaya str. 2, St. Petersburg, Russia, 194100

Tel.: +7 0112626370, e-mail: nisheva@rambler.ru

² Children's Hospital № 1

Введение. Инфекционный мононуклеоз – инфекционное заболевание, которое вызывает вирус Эпштейна-Барр. Вирус проникает в В-лимфоциты и вызывает их трансформацию и пролиферацию. Для борьбы с инфекцией активируются цитотоксические Т-лимфоциты, которые уничтожают инфицированные вирусами В-лимфоциты и которые в анализах крови выглядят как атипичные мононуклеары. Цель исследования состояла в изучении особенностей иммунограммы у детей с инфекционным мононуклеозом.

Материалы и методы. Обследованы 15 детей с инфекционным мононуклеозом в возрасте от 2 до 13 лет. Диагноз подтвержден выявлением вируса в периферической крови с помощью полимеразной цепной реакции, высокими титрами Ig-M-антител к вирусу Эпштейна-Барр и наличием атипичных мононуклеаров в клиническом анализе крови. Субпопуляции лимфоцитов исследовались с помощью проточной цитметрии: изучался уровень Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов (CD4+), Т-

цитотоксических лимфоцитов (CD8+), В-лимфоцитов (CD19+), натуральных киллеров (CD16+CD56+). Уровень иммуноглобулинов периферической крови оценивался с помощью турбидиметрического метода.

Результаты. При исследовании субпопуляций лимфоцитов у всех пациентов с инфекционным мононуклеозом выявлено повышение количества цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+). У всех пациентов значительно снижалось соотношение Т-хелперов (CD4+) и Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8+) – от 0,16 до 0,46 (при норме выше 1,0). При исследовании уровня В-лимфоцитов (CD19+) у всех пациентов с инфекционным мононуклеозом выявлено резкое уменьшение относительного количества В-лимфоцитов - до 2-4,5%, при этом их абсолютное количество было незначительно снижено или соответствовало нормальному возрастным показателям. При исследовании уровня иммуноглобулинов сыворотки крови у всех детей выявлено увеличение концентрации IgM, а у 70% обследованных увеличение и IgM и IgG. Несмотря на то, что клинические симптомы мононуклеоза исчезали через 2-3 недели, изменения в иммунограмме, хотя и не такие выраженные, как в острой фазе инфекции, сохранялись значительно дольше. Так, при обследовании пациентов через 2 месяца после выписки из стационара у всех пациентов выявлено повышение относительного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+), снижение относительного количества В-лимфоцитов при нормальном их абсолютном количестве, снижение соотношения CD4/ CD8+ (0,64-0,8). 6 детей обследованы через 6-8 месяцев после выписки из стационара, у 4-х из них соотношение CD4/ CD8+ все еще не достигло нормальных значений. У 2-х детей процент В-лимфоцитов был ниже нижней границы возрастной нормы.

Заключение. Инфекционный мононуклеоз – вирусное заболевание, при котором вирусы поражают лимфоциты и вызывают глубокие изменения в иммунограмме. Для острого мононуклеоза характерно повышение относительного и абсолютного количества цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+), резкое снижение относительного количества В-лимфоцитов при незначительном снижении их абсолютного количества, снижение соотношения хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD4/ CD8+) - в 5-6 раз ниже возрастных норм, повышение уровня IgM и в части случаев - IgG в сыворотке крови. Изменения в

иммунограмме, хотя и менее выраженные, сохраняются в течение нескольких месяцев после перенесенной острой инфекции.

Дифференциальный диагноз иммунограмм при В-клеточных иммунодефицитах и инфекционном мононуклеозе у детей

Нишева Е.С.^{1,2}, Макарова Т.А.², Соколова Н.Е.², Маларева Е.В.², Каплин Н.Н.¹, Майхуб М.¹

¹ Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия

* Литовская ул., 2, Санкт-Петербург, Россия, 194100, Тел.: +7 911 2626370, e-mail: nisheva@rambler.ru ² Санкт-Петербургское учреждение здравоохранения Детская городская больница №1.

Differential diagnosis of immunograms in primary B-cell immunodeficiencies and infectious mononucleosis in children

Nisheva E.S.^{1,2}, Makarova T.A.², Sokolova N.E.², Malareva E.V.², Kaplin N.N.¹, Mayhub M.¹

¹ St. Petersburg State Pediatric Medical Academy

* Litovskaya str. 2, St. Petersburg, Russia, 194100, Tel.: +7 911 2626370, e-mail: nisheva@rambler.ru ² Children's Hospital № 1

В-клеточные (гуморальные) иммунодефициты относятся к достаточно редким заболеваниям. Наиболее тяжелые В-клеточные иммунодефициты (агаммаглобулинемия Брутона, общий переменный иммунодефицит) характеризуются резким снижением или отсутствием В-лимфоцитов и иммуноглобулинов в периферической крови. Пациенты с этими синдромами требуют срочной заместительной терапии препаратами иммуноглобулинов, без которой любая инфекция дыхательных путей может привести к смерти пациента. Некоторые инфекционные заболевания также могут вызывать существенные изменения в иммунограмме и поэтому требуют дифференциальной диагностики с врожденными иммунодефицитами. Ниже мы приводим описание клинического случая, представившего некоторые диагностические затруднения.

Клинический пример 1. Мальчик 2 лет поступил в стационар с жалобами на частые простудные заболевания и длительный субфебрилитет. До поступления в стационар мальчик неоднократно

амбулаторно обследовался, в анализах крови выявлена легкая гипохромная анемия, дважды проводилось вирусологическое обследование, вирусов Эпштейна-Барр и антител к ним не выявлено. При поступлении в стационар в общем клиническом анализе крови широкоплазменных лимфоцитов не выявлено. Для исключения врожденного иммунодефицита через 1 неделю после поступления ребенка в стационар назначено исследование крови на субпопуляции лимфоцитов и уровень иммуноглобулинов крови. Субпопуляции лимфоцитов исследовались с помощью проточной цитометрии: изучался уровень Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов (CD4+), Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8+), В-лимфоцитов (CD19+), натуральных киллеров (CD16+CD56+). Уровень иммуноглобулинов периферической крови оценивался с помощью турбидиметрического метода. При иммунологическом обследовании выявлено резкое снижение относительного содержания В-лимфоцитов – до 2%, однако их абсолютное количество было в пределах возрастной нормы. Также выявлено резкое снижение соотношения хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD4/ CD8+) - до 0,16 (в 10 раз ниже нормы), повышение относительного и абсолютного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+). Проводился дифференциальный диагноз с агаммаглобулинемией Брутона, для которой также характерно резкое снижение количества В-лимфоцитов. Однако нормальный уровень иммуноглобулинов и незначительно сниженное абсолютное количество В-лимфоцитов позволили отвергнуть диагноз агаммаглобулинемии. Проводилась также дифференциальная диагностика с синдромом приобретенного иммунодефицита, однако все вирусологические исследования на СПИД дали отрицательные результаты. Глубокие нарушения в иммунограмме пациента оставались непонятными, на следующий день пациенту сделан повторный анализ крови, и в нем впервые выявлены атипичные мононуклеары. Диагноз инфекционного мононуклеоза был также подтвержден с помощью целенаправленного вирусологического обследования (полимеразной цепной реакции, исследования уровня антител к вирусу). Выявление инфекционного мононуклеоза позволило объяснить изменения в иммунограмме у данного пациента, поскольку вирус инфекционного мононуклеоза поражает В-лимфоциты и вызывает их трансформацию и пролиферацию. Для борьбы с инфекцией активируются цитотоксические Т-лимфоциты, которые уничтожают инфицированные вирусами В-лимфоциты и

которые в анализах крови выглядят как атипичные мононуклеары. Пациенту назначена противовирусная терапия, состояние пациента улучшилось, в течение 9 месяцев после выписки из стационара пациент чувствовал себя хорошо, ничем не болел.

Новый способ исследования хемотаксиса

Нишева Е.С.^{1,2}, Акопян А.С.², Каган А.В.², Каплин Н.Н.¹, Майхуб М.¹

¹ Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия

* Литовская ул., 2, Санкт-Петербург, Россия, 194100, Тел.: +7 9112626370, e-mail: nisheva@rambler.ru ² Санкт-Петербургское учреждение здравоохранения Детская городская больница №1.

A new method of chemotaxis testing

Nisheva E.S.^{1,2}, Akopian A.S.², Kagan A.V.², Kaplin N.N.¹, Mayhub M.¹

¹ St. Petersburg State Pediatric Medical Academy

* Litovskaya str. 2, St. Petersburg, Russia, 194100, Tel.: +7 0112626370, e-mail: nisheva@rambler.ru ² Children's Hospital № 1

Фагоцитоз – защитная реакция организма, состоящая из нескольких последовательных этапов – хемотаксиса лейкоцитов к объекту фагоцитоза, адгезии к нему, поглощения и переваривания. В настоящее время для исследования хемотаксиса лейкоцитов используются сложные и дорогостоящие методы, доступные лишь хорошо оснащенным иммунологическим лабораториям. Хемотаксис живых клеток – это физиологическая реакция, использующаяся различными животными и растительными организмами не только для защиты, но и для репарации тканей, а также для процессов оплодотворения. В частности, у опыляемых растений именно процессы хемотаксиса клеток растения к пыльцевому зерну лежит в основе процесса оплодотворения. Хемотаксис происходит за счет того, что пыльцевые зерна содержат огромное количество эйкозаноидо-подобных веществ, которые высвобождаются из пыльцевого зерна при контакте с водной фазой. Нами разработан новый способ оценки хемотаксиса, в котором мы использовали пыльцу некоторых растений в качестве корпускулярного объекта, содержащего хемоаттрактанты, высвобождающиеся в водной среде, для исследования процессов

фагоцитоза у человека. На данный способ нами подана заявка на изобретение, и получена приоритетная справка (заявка № 2012140659 от 21.09.2012). Согласно заявленному нами способу, создается смесь с фиксированным соотношением лейкоцитов и пыльцевых зерен. Смесь наносится в виде горизонтального монослоя на стекло, подсчитывается процент пыльцевых зерен, к которым прикрепился хотя бы один лейкоцит до и после инкубации в термостате. Для постановки способа требуется небольшое количество крови, которое можно взять из пальца у детей даже самого раннего возраста. С помощью предложенного нами способа обследованы 46 практически здоровых детей, обратившихся в поликлинику для плановой вакцинации, и 128 детей с различными соматическими, инфекционными и хирургическими заболеваниями, госпитализированных в стационар. У здоровых детей исходные показатели хемотаксиса составляли 32% и более, т.е. сразу после смешивания лейкоцитов с пыльцевыми зернами наиболее авидные лейкоциты адгезировались с пыльцевыми зернами. После инкубации смеси лейкоцитов с зернами пыльцы в термостате еще значительная часть лейкоцитов продвигалась к пыльцевым зернам и адгезировалась с ними. У здоровых детей конечные показатели хемотаксиса (процент пыльцевых зерен, присоединивших хотя бы 1 лейкоцит, после инкубации в термостате) составили 60% и более. При обследовании детей с различными соматическими, инфекционными и хирургическими заболеваниями у части детей выявлены нарушения хемотаксиса. В частности, у всех пациентов с рецидивирующим фурункулезом выявлено снижение исходных и/или конечных показателей хемотаксиса. Выраженные нарушения хемотаксиса выявлены у пациентов с остеомиелитом, первичным перитонитом, у больных с частыми ангинами, рецидивирующими ячменями, у 40% пациентов из группы часто болеющих детей, у пациентов с поллинозами, а также у пациентов с синдромом Швахмана. Предложенный нами способ исследования хемотаксиса очень прост в исполнении, занимает мало времени, не требует специального оборудования и реактивов и может использоваться в любой клинической лаборатории.

Нарушения хемотаксиса у детей с первичным перитонитом

Нишева Е.С.^{1,2}, Акопян А.С.², Каган А.В.², Каплин Н.Н.¹, Майхуб М.¹

¹ Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия

* Литовская ул., 2, Санкт-Петербург, Россия, 194100

Тел.: +7 9112626370, e-mail: nisheva@rambler.ru

² Санкт-Петербургское учреждение здравоохранения Детская городская больница №1.

Chemotaxis defects in primary peritonitis

Nisheva E.S.^{1,2}, Akopian A.S.², Kagan A.V.², Kaplin N.N.¹, Mayhub M.¹

¹ St. Petersburg State Pediatric Medical Academy

* Litovskaya str. 2, St. Petersburg, Russia, 194100

Tel.: +7 0112626370, e-mail: nisheva@rambler.ru

² Children's Hospital № 1

Первичный перитонит – воспалительное заболевание брюшины, при котором не удается обнаружить интра-абдоминальный источник инфекции. Первичный перитонит чаще обнаруживается у детей младше 6 лет. Во многих случаях первичный перитонит поражает детей с асцитом или нефротическим синдромом, при этом возбудители перитонита проникают в брюшную полость из кишечника, однако первичный перитонит обнаруживается и у «практически здоровых» детей. Цель работы состояла в изучении иммунологических показателей у детей с первичным перитонитом для выявления возможных иммунных дефектов, предрасполагающих к гнойно-септическим заболеваниям.

Материалы и методы. Обследованы 8 детей с первичным перитонитом, 11 детей с аппендикулярным перитонитом, а также 14 практически здоровых детей. Обследованные группы были сходными по возрастному и половому составу. Дети с первичным перитонитом до поступления в стационар считались практически здоровыми, хотя у 7-ми из них в анамнезе отмечены частые простудные заболевания и/или ангины, у 3-х детей – рецидивирующий фурункулез.

Дети с первичным и вторичным (аппендикулярным) перитонитом обследованы до операции, в первый, третий и

седьмой день после операции, а также через 1, 3, 6 и 12 месяцев после выписки из стационара. При обследовании детей использовался широкий набор иммунологических методов для оценки иммунной системы, в частности предложенный нами способ оценки хемотаксиса лейкоцитов. Нами разработан новый способ оценки хемотаксиса, в котором мы использовали пыльцу некоторых растений в качестве корпускулярного объекта, содержащего хемоаттрактанты, для исследования процессов фагоцитоза у человека. На данный способ нами подана заявка на изобретение, получена приоритетная справка (заявка № 2012140659 от 21.09.2012). Согласно заявленному нами способу, создается смесь с фиксированным соотношением лейкоцитов и пыльцевых зерен. Смесь наносится в виде горизонтального монослоя на стекло, подсчитывается процент пыльцевых зерен, к которым прикрепился хотя бы один лейкоцит до и после инкубации в термостате.

У здоровых детей исходные показатели хемотаксиса составляли 32% и более, т.е. сразу после смешивания лейкоцитов с пыльцевыми зернами наиболее avidные лейкоциты адгезировались с пыльцевыми зернами. После инкубации смеси лейкоцитов с зернами пыльцы в термостате еще значительная часть лейкоцитов продвигалась к пыльцевым зернам и адгезировалась с ними. У здоровых детей конечные показатели хемотаксиса (процент пыльцевых зерен, присоединивших хотя бы 1 лейкоцит, после инкубации в термостате) составили 60% и более. У пациентов с аппендикулярным перитонитом отмечалась активация процессов хемотаксиса (исходные и конечные показатели выше нормы) в предоперационный период, показатели оставались выше нормы в послеоперационный период (1-7 дней после операции), при обследовании через 1 месяц и в более поздние сроки показатели хемотаксиса нормализовывались. У пациентов с первичным перитонитом как в дооперационный, так и в послеоперационный период показатели хемотаксиса были снижены по сравнению как с пациентами со вторичным перитонитом, так и со здоровыми детьми. При обследовании детей в динамике оказалось, что через 1-12 месяцев после перенесенного первичного перитонита у них сохранялись нарушения хемотаксиса, и показатели хемотаксиса были еще ниже, чем в дооперационный или ранний послеоперационный период, что мы объясняем активацией фагоцитов на фоне текущего инфекционного воспаления брюшины. Со стороны других звеньев иммунитета таких выраженных

дефектов не выявлено, поэтому мы считаем, что у пациентов с первичным перитонитом имеется врожденный дефект хемотаксиса лейкоцитов, который и предрасполагает их к этому заболеванию.

Редкий случай мозаицизма в результате диплоидизация триплоидии и нарушения сегрегации хромосомы 18 и половых хромосом

*Осадчук Т.В.**, *Новикова И.В.*, *Савенко Л.А.*, *Шепелевич Е.В.*,
Плевако Т.А., *Крицкая Т.М.*, *Подлещук Л.В.*

ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»,
МЗ РБ

Орловская ул., 66/7, Минск, Республика Беларусь, 220053

Тел.: +375172335575, e-mail: t.asadchuk@gmail.com

Unusual case of mosaicism resulted from diploidization of triploid and errors of segregation of chromosome 18 and sex chromosomes

*Asadchuk T.V.**, *Novikova I.V.*, *Savenko L.A.*, *Shepelevich E.V.*, *Plevako T.A.*,

Kritskaya T.M., *Padliashchuk L.V.*

Republican Medical Center “Mother and Child”

Orlovskaya str., 66/7, Minsk, Belarus, 220053

Tel.: +375172335575, e-mail: t.asadchuk@gmail.com

Существование тетрагаметного химериза было известно давно. Возможность образования тригаметного химеризма путем постзиготической диплоидизации («коррекции») триплоидии, а также разнообразные следствия этого явления были теоретически обоснованы российским ученым Михаилом Давыдовичем. Голубовским почти 30 лет тому назад [1] и подтверждены рядом молекулярно-генетических исследований в последние годы. Мы представляем результаты исследования редкого случая мозаицизма, который может быть интерпретирован как подтверждение одного из предсказанных следствий явления диплоидизации триплоидии.

При исследовании биопсии ворсин хориона в краткосрочной культуре был выявлен кариотип 47,XX,+18. В длительной культуре амниоцитов был определен следующий кариотип: 67,XX,-18 [14]/47,XX,+18 [1]. Проведена молекулярно-

генетическая диагностика с использованием микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X и Y, которая подтвердила наличие кариотипа 67,XX,-18, то есть триплоидного набора с нехваткой половой хромосомы и хромосомы 18. С помощью ДНК-анализа были обследованы родители пробанда и установлено, что дополнительный набор в триплоидном клоне имел отцовское происхождение.

Этот случай можно было бы трактовать как «обычный» химеризм, то есть слияние двух эмбрионов. Однако совпадение двух событий – отсутствие хромосомы 18 в триплоидной линии и наличие дополнительной хромосомы 18 в анеуплоидной линии, а также отцовское происхождение дополнительного набора – свидетельствуют в пользу другого механизма, а именно коррекции триплоидии, причем с нерасхождением хромосомы 18 и потерей гомосомы. Такая хромосомная нестабильность в процессе диплоидизации триплоидии была предсказана как следствие этого феномена [2]. Таким образом, мы предполагаем, что исследованный нами случай является тригаметной химерой в результате оплодотворения яйцеклетки двумя сперматозоидами и последующей коррекцией триплоидии с образованием квазидиплоидной линии.

В последние годы, благодаря внедрению в практику молекулярных методов, появились исследования, подтверждающие существование такого механизма коррекции триплоидии и описывающих предсказанные варианты мозаицизма/химеризма: мозаицизм по пloidности при врожденной гиперинсулинемии [3], сосуществование андрогенного пузырьного заноса с нормальным плодом, образованные из одной яйцеклетки [4], андрогенный/двуродительский диплоидный химеризм при аномалиях плаценты [5], одинаковый материнский геном и разные отцовские геномы у «полуторазиготных» близнецов [6]. Описанный нами случай, насколько нам известно, является первым, подтверждающим одно из предсказанных последствий феномена коррекции триплоидии, а именно нестабильность хромосомного набора и образование анеуплоидных (квазидиплоидных) клеток [2].

Химеризм до самого недавнего времени считался исключительно редким явлением, поскольку отсутствовали методы его детекции. Возможно, вскоре эта точка зрения будет пересмотрена. Тригаметный химеризм, как и тетрагаметный, могут обуславливать целый спектр клинических и социальных проблем, включая нарушения репродукции, проблемы трансплантации,

эпигеномные заболевания, спорное отцовство и даже спорное материнство.

Список литературы

1. Голубовский М.Д., Голубовская И.Н. 1984. Возможные цитогенетические механизмы прямого отцовского влияния на близнецовость у человека и их следствия: гипотеза. *Генетика*, Т. 20, N 6, С. 1043-1051.
2. Golubovsky M.D. 2003. Postzygotic diploidization of triploids as a source of an unusual cases of mosaicism, chimerism and twinning. *Hum. Reprod.* V. 18, P. 236-242.
3. Giurgea i., Sanlaville D., Fournet J.-C., et al. 2006. Congenital hyperinsulinism and mosaic abnormalities of the ploidy. *J. Med. Genet.* V. 43, p. 248-254.
4. Hsu C.-C., Lee I-W., Su M.-T., et al., 2008. Triple genetic identities for the complete hydridiform mole, placenta and co-existing fetus after transfer of a single *in vitro* fertilized oocyte: case report and possible mechanisms. *Hum Reprod.*, 23, P. 2686-2691.
5. Morales C., Soler A., Badenas C., et al. 2009. Reproductive consequences of genome-wide paternal uniparental disomy mosaicism: description of two cases with different mechanisms of origin and pregnancy outcomes. *Fertil. Steril.*, V. 92, No 1, 393.e5.
6. Souter V.L., Parisi M.A., Nyholt D.R., et al. 2007. A case of true hermaphroditism reveals an unusual mechanism of twinning. *Hum. Genet.*, V. 121, P. 179-185.

Экспрессия сигнальных молекул в буккальном эпителии: новые возможности молекулярной диагностики заболеваний человека

Пальцев М.А.¹, Полякова В.О.^{*2}, Кветной И.М.², Коновалов С.С.³,
Кветная Т.В.³ Линькова Н.С.³, Крылова Ю.С.², Дурнова А.О.²,
Толибова Г.Х.², Литвякова О.М.³, Седов Е.В.³, Козлов К.Л.³

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Россия,

²НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН, Россия

³Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии,
Россия
*199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3
Тел.:

Ключевые слова: буккальный эпителий, сигнальные молекулы, патология, диагностика

The expression of signal molecules in buccal epithelium: new abilities of molecular diagnostics of human diseases

¹National Research Centre «Kurchatov Institute»

²Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Russian Academy of Medical Sciences, Russia

³Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, Russia
*199034, Russia, Saint-Petersburg, Mendeleevskaia linia, 3
vopol@yandex.ru, 8-911-921-08-49

Key words: buccal epithelium, signal molecules, pathology, diagnostics

Введение. Актуальной задачей современной молекулярной медицины является поиск клеточных и тканевых объектов исследования, получение которых возможно неинвазивным путем, что открывает возможности прижизненной диагностики заболеваний. Одним из перспективных и многообещающих объектов для этого является буккальный эпителий (БЭ), клетки которого экспрессируют большое число сигнальных молекул, участвующих в локальной и системной регуляции процессов жизнедеятельности. Изменения функциональной активности клеток БЭ во многом отражают состояние локального и системного гомеостаза организма или его нарушений при патологических состояниях. БЭ, доступный для прижизненного гистологического исследования, может служить источником важной диагностической и прогностической информации о состоянии здоровья, стрессорных воздействиях, влиянии факторов внешней среды, соматической патологии и биологического возраста человека [1, 2].

Цель работы - сравнительная оценка экспрессии сигнальных молекул в БЭ у людей в норме и при патологии.

Материал и методы. Для исследования были использованы образцы буккального эпителия, взятые у пациенток с раком молочной железы без отдаленных метастазов (РМЖ), у лиц с

болезнью Альцгеймера (БА) и атеросклерозом аорты и коронарных артерий (АТ). Цитологические мазки БЭ готовили методом жидкостной цитологии. Все обследуемые были разделены на две группы: 1 – контроль (без патологии), 2 – женщины с РМЖ, 3 – пациенты с БА, 4 – лица с АТ. Для иммуноцитохимического исследования использовали первичные моноклональные антитела к CD64, CD90, Oct2 (при РМЖ), тау-протеину, предшественнику β -амилоида (β -APP) (при БА), коннекسينам Cx37 и Cx40 (при АТ) и вторичные антитела – биотинилированные антимишьяные иммуноглобулины. Определение средней площади экспрессии маркеров проводили морфометрическим методом на системе компьютерного анализа изображений Nikon Eclipse400 с использованием лицензионной программы Morphology 5.0 (Videotest) с последующей статистической обработкой результатов.

Результаты исследования. В 1 группе (контроль) были верифицированы все исследуемые маркеры и определена их средняя площадь экспрессии. Во 2-й группе (РМЖ) наблюдалось снижение экспрессии маркеров иммунных клеток CD64 – на 92%, CD90 – на 46%, Oct2 – на 28% по сравнению с контролем. В 3-й группе (БА) выявлено повышение синтеза тау-протеина и β -APP соответственно на 45% и 37% по сравнению с 1-й группой. В 4-й группе (АТ) верифицировано снижение экспрессии Cx37 и Cx40 соответственно на 61% и 39% по сравнению с контролем.

Заключение. Установлено, что в БЭ при РМЖ снижается экспрессия маркеров функциональной активности и дифференцировки иммунных клеток, при БА – повышается синтез тау-протеина и предшественника β -амилоида, при атеросклеротическом поражении сосудов снижается синтез коннексинов – белков межклеточных взаимодействий эндотелиоцитов. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения БЭ в качестве адекватного объекта исследования для неинвазивной молекулярной диагностики социально-значимых заболеваний.

Список литературы

1. Mornex F., Girard N., Merle P., et al. 2005. Tolerance and efficacy of conformal radiotherapy for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. Results of the French RTF1 phase II trial. *Cancer Radiother.* Vol. 9, N 6-7. P. 470-476.

2. Yogesh T., Narayan T., Shreedhar B., et al. 2011. The expression of E-cadherin and cathepsin-D in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: A comparative analysis between immunohistochemistry and routine histopathology. *J Oral Maxillofac Pathol.* Vol. 15., N 3. P. 288-294.

**Нейроиммуноэндокринология: сигнальные молекулы как
диагностические и прогностические маркеры социально
значимых заболеваний**

Пальцев М.А.¹, Кветной И.М.^{2}*

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Россия,

²НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН, Россия
*199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3,
igor.kvetnoy@yandex.ru, 8-911-927-84-14

Ключевые слова: нейроиммуноэндокринология, сигнальные молекулы, диагностика, маркеры, заболевания

**Neuroimmunoendocrinology: signal molecules as diagnostic and
prognostic markers of social-significant diseases**

Paltsev M.A.¹, Kvetnoy I.M.^{2}*

¹National Research Centre «Kurchatov Institute»

²Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation

199034, Russia, Saint-Petersburg, Mendeleevskaia linia, 3
igor.kvetnoy@yandex.ru, 8-911-927-84-14

Key words: neuroimmunoendocrinology, signal molecules, diagnosis, markers, diseases

Стремительное развитие новых физико-химических технологий и использование их в биомедицинских исследованиях в конце XX века способствовало разработке новой методологии, позволяющей на молекулярном уровне изучать закономерности функционирования клеток. Выявление общего молекулярного "языка" для обмена сигнальной информацией между клетками и тканями стерло привычные структурно-функциональные границы

между тремя классическими регуляторными системами организма - нервной, эндокринной и иммунной. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что различные клетки нервной, иммунной и эндокринной систем синтезируют идентичные сигнальные молекулы - медиаторы межклеточных взаимодействий. Участие единых молекул в функционировании нервной, эндокринной и иммунной систем стимулировало на рубеже XX и XXI веков становление и развитие новой области биомедицины – нейроиммуноэндокринологии [1], что позволило открыть новые многообещающие перспективы в персонализированной диагностике и лечении социально-значимых заболеваний.

Если ранее считалось, что лекарственные препараты могут являться универсальными при лечении какого-либо заболевания, то современные биомедицинские исследования свидетельствуют о том, что эффективность применения лекарственных средства зависит от генетических и эпигенетических факторов, среди которых ключевое место занимают сигнальные молекулы, экспрессируемые клетками диффузной нейроиммуноэндокринной системы (ДНИЭС), осуществляющие межклеточные взаимодействия, нарушения которых лежат в основе патогенеза многих заболеваний [2, 3]. Таким образом, исследование индивидуальных особенностей экспрессии сигнальных молекул при различных заболеваниях является перспективным и многообещающим направлением для разработки эффективных методов профилактики, диагностики и лечения различной патологии [4, 5].

Проведенные нами исследования показали, что, например, оценка экспрессии сигнальных молекул – маркеров функциональной активности сердечно-сосудистой системы (ICAM, CD38, CD106, NOS, Cx40, TNF- α) в буккальном эпителии может успешно применяться для оптимизации дифференциальной диагностики, прогнозирования течения и оценки эффективности лечения гипертонической болезни, инфаркта миокарда и ишемической болезни сердца.

Верификация экспрессии таких сигнальных молекул, как бета-амилоид, тау-протеин и убиквитин в тканях вне мозга, доступных для биопсии (лимфоциты крови, буккальный эпителий, гастробиопсии) позволяет прижизненно диагностировать болезнь Альцгеймера и оценить степень индивидуальных нейродегенеративных изменений у конкретных пациентов на разных стадиях заболевания. Прогрессирование хронической

обструктивной болезни легких сопряжено с изменением уровня экспрессии сигнальных молекул HLA, ICAM, CD4, CD8, CD16, CD25, CD38, CD50, CD54, CD95 в плазме крови пациентов [6].

Нами разработана панель маркеров для персонифицированной диагностики различных социально-значимых заболеваний и алгоритм их определения в каждом конкретном случае с учетом полиморбидной патологии и индивидуальных особенностей пациентов. Изучение экспрессии сигнальных молекул, продуцируемых клетками ДНИЭС, проведенное на широкой когорте пациентов с различной патологией позволяет рассматривать их в качестве многообещающих маркеров для диагностики, оценки прогноза и выбора оптимального таргетного лечения при различных социально-значимых заболеваниях.

Список литературы

1. Пальцев М.А., Кветной И.М. 2008. *Руководство по нейроиммуноэндокринологии*. 2-е изд. М.: ОАО Медицина, 512 с.
2. Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О. и соавт. 2012. Сигнальные молекулы: место и роль в персонифицированной диагностике, лечении и профилактике социально значимых заболеваний. *Молекулярная медицина*. №5. С. 3-8.
3. Kvetnoy I.M., Hernández-Yago J., Hernández J.M. et al. 2000. Diffuse neuroendocrine system and mitochondrial diseases: molecular and cellular bases of pathogenesis, new approaches to diagnosis and therapy. *Neuroendocrinol Lett*. Vol. 21, N 2. P. 83-99.
4. Ong F.S., Das K., Wang J. et al. 2012. Personalized medicine and pharmacogenetic biomarkers: progress in molecular oncology testing. *Expert Rev Mol Diagn*. Vol. 12, N 6. P. 593-602.
5. Perrone S., Tataranno M.L., Stazzoni G., Buonocore G. 2012. Biomarkers of oxidative stress in fetal and neonatal disease. *J Matern Fetal Neonatal Med.* Vol. 137. P. 1243-1249.
6. Невзорова В.А., Голотина О.В., Шекунова О.И. и соавт. 2010. Состояние системного воспаления и показатели легочной гемодинамики при хронической обструктивной болезни легких, ассоциированной с ишемической

Практика применения микроскопии в доказательной медицине

Директор по развитию ООО «ВидеоТест» к.т.н.
Пантелеев В.Г.

Анализаторы изображений (АИ), используемые для нахождения и классификации объектов (клеток, хромосом, сперматозоидов и т.п.), широко применяются в практике медицинских лабораторий.[1-7]. Анализаторы позволяют резко повысить производительность обработки серий изображений, получить достоверную информацию об искомых объектах, сформировать полученные результаты с известной точностью. Анализатор изображений должен не просто осуществлять совокупность измерительных процедур, а «узнавать» объекты, используя обучающую выборку.

Распознавание объектов в изображении не базируется на одной или двух измерительных процедурах, поддающихся метрологической проверке [8]. В этом процессе используется множество признаков равнозначных для идентификации объектов. Формирование этого множества параметров и является одной из главных задач распознавания объектов.

В общем виде можно сказать, что используются основные морфологические параметры: форма, размеры, оптические свойства и топология. При этом АИ, наиболее точно определяет морфологические параметры, но не формирует клиническое заключение, предоставляя это врачам.

Опыт применения АИ показывает высокую скорость обработки препаратов, получение статистически достоверных результатов, удобство их хранения, поиска, охраны и сетевого обмена.

Описываемая в докладе практика применения методов распознавания относится к оптической и электронной микроскопии. Данный доклад не претендует на обобщение мировой практики, в нём изложен двадцатидвухлетний опыт работы фирмы «ВидеоТест».

Список литературы:

1. В.Г. Пантелеев, О.В. Егорова, Е.И. Клыкова «Компьютерная микроскопия», ЗАО «РИЦ «Техносфера», 2005, 304 с.
2. Кузнец С.М., Пантелеев В.Г. «Серия журналов для специалистов «Лаборатория №4» 17/2009, Медицинский Алфавит, Статья «АПК в лабораторной диагностике».
3. Костючек И.Н., Прияткин Н.С., Клещев М.А., Балашова Н.Н., Литвякова О.М., Материалы V Международной конференции «Проблемы диагностики и лечения рака молочной железы», Статья «Иммуногистохимическое исследование гормональной чувствительности ткани молочной железы при фиброаденоматозе с использованием методики измерения оптических параметров ядер клеток на цифровых микроскопических изображениях», Санкт-Петербург, 2008 год.
4. М.Н. Зенина, Н.И. Балакова, А.В. Козлов «Лабораторные методы исследования семенной жидкости», Учебное пособие для врачей, СпбМАПО, 2009 год, 54стр.
5. Савичева А.М., Рыбина Е.В., Соколовский Е.В., Домейка М., Пантелеев В.Г., Булатова Е.В., ФГБУ «НИИАГ им. Д.О. Отта» СЗО РАМН Международное содружество по охране репродуктивного здоровья ООО «ВидеоТест», «Микроскопическое исследование клинических материалов урогенитального тракта с использованием АПК ВидеоТест-Урогин (методические рекомендации для специалистов лабораторной диагностики), Санкт-Петербург, 2013 год, 40стр.
6. С.Я. Максимов, В.И. Новик, А.А. Сидорук, А.Ф. Урманчеева, ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии имени Н.Н. Петрова», «Метод верификации цитологического диагноза карциномы IN SITU шейки матки при расхождении его с гистологическими данными», Медицинская технология, Санкт-Петербург, 2012 год, 17стр.
7. Абдулкадыров К.М., Мартынкевич И.С., бакай М.П., Зенина М.Н., Пантелеев В.Г., Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ВидеоТест, «Цитогенетическое исследования в гематологии с использованием современных компьютерных технологий», Пособие для врачей, Санкт-Петербург, 2003 год, 29 стр.
8. Пантелеев В.Г. (ООО «ВидеоТест»), Слаев В.А., Чуновкина А.Г. (ВНИИ Метрологии им Д.И. Менделеева), «Метрологическое обеспечение анализаторов изображений», ООО

«ВидеоТест», «Современные технологии в металлографии», материалы III ежегодного практического семинара 2007 год.

Особенности и прогностическая ценность молекулярно-генетических повреждений у больных ОМЛ и МДС

Петрова Е.В.^{1}, Козловская М.А.¹, Мартыненко Л.С.¹, Иванова М.П.¹, Цыбакова Н.Ю.¹, Зюзгин И.С.², Карягина Е.В.³, Грицаев С.В.¹,*

Абдулкадыров К.М.¹, Мартынкевич И.С.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Россия

²Ленинградская клиническая областная больница, Россия

³Городская больница №15, Россия

* Тел.: +7 950 0202248, e-mail: katteerina@mail.ru

Ключевые слова: ОМЛ, МДС, FLT3, NPM1, CKIT, NRAS

Characteristics and prognostic value of molecular-genetic abnormalities of patients with AML and MDS

Petrova E.V.^{1}, Kozlovskaya M.A.¹, Martynenko L.S.¹, Ivanova M.P.¹, Sybakova N.Y.¹, Zyuzgin I.S.², Karyagina E.V.³, Gritsaev S.V.¹, Abdulkadyrov K.M.¹, Martynkevich I.S.¹*

¹Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Russia

²Leningradskii regional hospital, Russia

³Saint-Petersburg Hospital №15, Russia

*Phone: +7 950 0202248, e-mail: katteerina@mail.ru

Key words: AML, MDS, FLT3, NPM1, CKIT, NRAS

Введение. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и миелодиспластический синдром (МДС) – гетерогенные заболевания, возникающие в результате злокачественной трансформации и нарушения дифференцировки гемопоэтических клеток на уровне миелоидных клеток-предшественниц. Наиболее частыми цитогенетическими нарушениями при ОМЛ и МДС являются цитогенетические aberrации, которые обнаруживаются

до 80% случаев. Вместе с этим биологические свойства клеток патологического клона, эпигенетические изменения и повреждения генов у больных ОМЛ и МДС занимают важное место в определении прогностических особенностей заболевания. Целью нашего исследования было изучение частоты, характера и прогностического значения молекулярно-генетических повреждений у больных ОМЛ и МДС.

Материал и методы. В исследование были включены 280 пациентов с ОМЛ de novo в возрасте от 11 до 86 лет (медиана 55 лет). Среди них были 146 (52,1%) женщин и 134 (47,9%) мужчины. По морфологическим вариантам ОМЛ больные распределялись следующим образом: с M0 вариантом – 10 (3,6%) пациентов, с M1 вариантом – 56 (20,0%) пациентов, с M2 вариантом – 82 (29,3%), с M3 вариантом – 29 (10,4%), с M4 вариантом – 58 (20,7%), с M5 вариантом – 19 (6,8%), с M6 вариантом – 12 (4,3%), с M7 вариантом – 1 (0,3%), недифференцированные – 13 (4,6%) больных. У всех пациентов было выполнено цитогенетическое исследование клеток костного мозга (анализ не менее 20 метафаз) и был установлен кариотип. Для определения мутаций в генах FLT3, KIT, NPM1 и NRAS использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с дальнейшей рестрикцией или прямым секвенированием. Для FLT3 рецептора исследовались 2 основных типа мутаций – внутренняя тандемная дупликация (FLT3-ITD) и точечная мутация в «А-петле» (FLT3-TKD); для KIT - инсерции 8 экзона, ITD 11 экзона, мутация D816V; инсерции в гене NPM1; мутации 12,13,61 кодонов NRAS.

Результаты и обсуждение. Мутации в генах FLT3 и NPM1 были обнаружены у 90 из 280 обследованных пациентов (32,1%). Всего были выявлены 107 мутаций генов FLT3 и NPM1: 54 – FLT3-ITD, 21 – FLT3-TKD и 32 - в гене NPM1. У 73 (26,1%) пациентов были обнаружены одиночные мутации: у 41 (14,6%) пациента - FLT3-ITD, у 15 (5,6%) больного – FLT3-TKD и у 17 (6,1%) больных - в гене NPM1. У 17 больных мутации носили сочетанный характер: у 11 (3,9%) пациентов FLT3-ITD и в гене NPM1, у 4 (1,4%) больных FLT3-ITD и FLT3-TKD и у 2 (0,7%) больных FLT3-TKD и в гене NPM1. По результатам цитогенетического исследования пациенты были распределены на следующие группы: с нормальным кариотипом (благоприятный прогноз) – 151 пациент (53,9%), с комплексным кариотипом (3 и более хромосомные aberrации – неблагоприятный прогноз) – 39 больных (13,9%), с другими хромосомными aberrациями (группа с промежуточным прогнозом) – 90 пациентов (32,2%). Достоверно чаще ($p=0,02$) мутации

определялись у больных с нормальным кариотипом – у 57 (35,8%) из 151 изученных пациентов (у 44 пациента обнаружена одиночная мутация (24 – FLT3-ITD, 6 – FLT3-TKD и 14 - в гене NPM1) и у 13 – сочетанные мутации (8 - FLT3-ITD и в гене NPM1, 4 - FLT3-ITD и FLT3-TKD, 2 - FLT3-TKD и в гене NPM1)) и в группе промежуточного прогноза – у 28 (31,1%) из 90 больных. Тогда как в группе больных с комплексным кариотипом мутации были выявлены у 5 (12,8%) из 39 больных. В результате анализа общей выживаемости больных ОМЛ с нормальным кариотипом и FLT3-ITD было достоверно ($p=0,012$) обнаружено неблагоприятное влияние данной мутации на прогноз течения заболевания.

Исследование наличия мутаций в гене KIT проводили у 128 пациентов с ОМЛ. Из них у 9 пациентов был поставлен диагноз CBF-ОМЛ: 5 пациентов с $t(8;21)$ и 4 пациента с $inv(16)$. Нами не были обнаружены мутации в 8 и 11 экзонах гена KIT в данной группе, точечная мутация D816V была найдена у 2 пациентов (что составило 1,6% от общего числа обследованных больных и 11,1% от числа больных с CBF-ОМЛ). У одного из пациентов с мутацией D816V при цитогенетическом исследовании была обнаружена $t(8;21)$, что позволило отнести его к группе CBF-ОМЛ и рассматривать как вариант благоприятного прогноза. Несмотря на это, у пациента было констатировано развитие раннего рецидива, что может служить основанием рассматривать мутации в гене KIT в качестве маркера неблагоприятного прогноза.

Исследование мутаций в гене NRAS проводили у 72 пациентов с ОМЛ. Мутации были обнаружены у 9 пациентов (12,5%): 4 (44,4%) мутации в 12 кодоне (у 1 пациента - G12A и у 3 больных - G12D) и 5 (45,6%) мутаций в 13 кодоне (G13D – у 2 больных, G13C – у 1 и G13V – у 2 пациентов). При анализе общей и безрецидивной выживаемости больных с и без мутаций в гене NRAS не были выявлены достоверно значимые отличия ($p=0,075$ и $p=0,105$, соответственно).

Также были обследованы 97 пациентов с диагнозом МДС de novo, 51 женщина и 46 мужчин в возрасте от 20 до 85 лет (медиана 63 года). При изучении мутационного статуса у 15 (16,5%) из 97 обследованных пациентов были обнаружены 16 мутаций: 6 FLT3-ITD (6,2%), 1 FLT3-TKD (1,0%) и 9 NPM1 (9,3%). У одного больного (1,0%) были выявлены две мутации одновременно (сочетанные мутации) – в генах FLT3 (TKD) и NPM1. Достоверно чаще ($p=0,041$) мутации определялись в группе больных с нормальным кариотипом и хромосомными aberrациями

промежуточного риска (у 11 (16,4%) из 67 пациентов и у 3 (25,0%) из 12 больных, соответственно) по сравнению с пациентами с комплексным кариотипом (у 1 (5,6%) пациента из 18).

Выводы: Таким образом, мутации в генах FLT3 и NPM1 чаще определялись у больных ОМЛ и МДС в группе с нормальным кариотипом и промежуточным прогнозом по сравнению с группой пациентов с комплексным кариотипом. Мутации гена KIT чаще определялись у пациентов с благоприятным кариотипом, а обнаружение мутации D816V было связано с неблагоприятным исходом заболевания, риском прогрессии и резистентностью к проводимой терапии. Обнаружение мутаций в гене NRAS достоверно не являлось прогностическим маркером у больных ОМЛ.

Клеточная модель для фармакологического изучения молекулярно-клеточных механизмов действия гестагенов

Петросян М.А.^{1}, Толибова Г.Х.¹, Горячая Т.С.², Крылова Т.А.², Дурнова А.О.¹,*

Петрова Л.И.¹, Полякова В.О.¹

¹ ФГБУ «НИИАГ им. Д.О.Отта» СЗО РАМН

* Менделеевская линия, д.3, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 199034,

Тел. +7 9217481212, e-mail: mariya@labpharm.spb.ru

² ИИЦ РАН, Российская Федерация

Ключевые слова: гестагены, эндометрий, клеточная модель, рецепторы, иммунофенотип

Cellular model for pharmacological study of molecular and cellular mechanisms of action of gestagens

Petrosyan M.A.¹, Tolibova G.H.¹, Goryachaya T.S.², Krylova T.A.², Durnova A.O.¹, Petrova L.I.¹, Polyakova V.O.¹

¹ D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS, Russian Federation

Mendeleevskaya Line, 3, St.-Petersburg, Russian Federation, 199034

Tel.: +7 9217481212, e-mail: mariya@labpharm.spb.ru

² Institute of Cytology, RAS

Key words: gestagens, endometrium, cellular model, receptors, immunophenotype

Введение. Гестагенные препараты занимают ведущее место в профилактике и терапии многих гинекологических заболеваний, они незаменимы в акушерской практике, а наличие противоопухолевого и химиосенсибилизирующего действия на фоне низкой токсичности позволяет использовать эти стероиды для лечения гормонозависимых опухолей. За последние годы был разработан целый ряд синтетических гестагенов, обладающих широким спектром действия. Такие молекулы отличаются от естественных гормонов рядом структурных особенностей. Особенности химического строения формируют индивидуальный фармакологический профиль каждого препарата, который определяется способностью соединения связываться с различными типами стероидных рецепторов и его метаболической активностью. В связи с этим, несомненно, большой интерес представляет разработка и создание оригинальных высокоселективных препаратов избирательного действия. В качестве модели для изучения молекулярно-клеточных механизмов действия новых оригинальных стероидов гестагенного ряда предлагается использовать культуру клеток эндометрия человека – основной ткани-мишени для реализации биологического действия аналогов прогестерона. Целью работы явилась разработка методологии выделения, получения и субкультивирования клеток эндометрия человека, а также характеристика полученной клеточной линии в качестве модели для изучения молекулярно-клеточных механизмов действия гестагенов.

Материалы и методы. Фрагменты ткани эндометрия были получены из матки здоровых пациенток в результате проведения диагностической гистероскопии и аспирационной биопсии. Клеточная суспензия была получена после механической дезагрегации и действия диссоциирующих агентов. Культивирование проводили в стандартных условиях при 37°C и 5% CO₂, в среде DMEM/F₁₂ с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и гентомицина. Фенотипический анализ проводили с помощью проточного цитофлуориметра Beckman Coulter (США). Окраску выполняли моноклональными антителами, мечеными различными флюорохромами. Для иммуногистохимических исследований клеточные образцы инкубировали с первичными антителами к маркерам рецепторов к эстрогенам и прогестерону (Dako), а затем со вторичными

антителами, конъюгированными с пероксидазой (EnVision Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit, Mouse). Цитогенетический анализ клеточной линии, полученной из фрагментов ткани эндометрия, проводили на 12-м и 16-м пассажах. Для кариотипирования использовали QFH метод дифференциального окрашивания.

Результаты. Эндометриальная клеточная линия представляет собой гетерогенную популяцию фибробластоподобных клеток, имеет высокие показатели пролиферации и жизнеспособности после криоконсервации (80-85%, окраска трипановым синим). Иммунофенотип клеточной популяции эндометрия был определен как CD9⁺, CD13⁺, CD31⁺, CD34⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD146⁺, Cytokeratin⁻ и CD45⁻. Экспрессия иммуногистохимических маркеров к рецепторам эстрогенов и прогестерона была верифицирована на 4-м, 12-м и 16-м пассажах. Цитогенетический анализ не выявил аномалий кариотипа в метафазных пластинках клеток культивируемой эндометриальной линии.

Заключение. Полученная нами в результате выделения и культивирования эндометриальная клеточная линия имеет необходимые характеристики, позволяющие рассматривать ее в качестве приемлемой модели для изучения молекулярно-клеточных механизмов реализации биологической активности оригинальный гестагенных соединений, а также для решения целого ряда вопросов в области фундаментальной репродуктивной медицины.

Моделирование фармакокинетики анастрозола на целевой популяции женщин в постменопаузе

Платова А.И., Мирошниченко И.И.

ФГБУ «НЦПЗ» РАМН, Россия

115522, Москва, Каширское шоссе, 34

Тел.: +7(499)615-93-19; e-mail: Platova6283@mail.ru

Ключевые слова: анастрозол, фармакокинетическое моделирование, ВЭЖХ с tandemной масс-спектрометрией, множественное дозирование

Pharmacokinetic modeling of anastrozole in a target population of women at postmenopausal period

Platova A.I., Miroshnichenko I.I.

The Mental Health Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences 34, Kashirskoye shosse

115522, Moscow, Russia

Tel.: +7(499) 615-93-19; e-mail: Platova6283@mail.ru

Key words: anastrozole, pharmacokinetic modeling, multiple dosing, HPLC-MS/MS.

Введение. Рак молочной железы на протяжении последних десятилетий занимает лидирующие позиции среди злокачественных новообразований женского населения. Заболеваемость в России составляет 38,2 на 100000 населения. Пик развития рака приходится на возраст от 50 до 60 лет, т.е. на женщин, находящихся в менопаузе [1]. Несомненно, что появление новых селективных ингибиторов ароматазы III поколения, таких как Аримидекс (МНН: анастрозол), позволит значительно повысить продолжительность и качество жизни больных раком молочной железы [2]. Широкое распространение онкологических заболеваний молочной железы является серьезной медицинской проблемой, в связи с чем актуально изучение фармакокинетики сравнительно нового противоопухолевого препарата, селективного ингибитора ароматазы – анастрозола. Цель исследования: получить значения фармакокинетических параметров и прогнозировать диапазон значений равновесной концентрации при курсовом введении.

Материал и методы. Фармакокинетику анастрозола изучали при приеме препарата Аримидекс® (таблетки, покрытые пленочной оболочкой 1 мг, «АстраЗенека Фармасьютикалс ЛП», США) на целевой популяции женщин в постменопаузе. Демографические данные: вес = $60,8 \pm 5,1$ кг; возраст = $50,6 \pm 4,1$ гг. Время отбора образцов: до приема препарата и через 0,5; 1,0; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 48; 72; 96; 120; 144; 168 часов после приема однократного приема препарата в дозе 1 мг. Измерение концентрации анастрозола в биообразцах осуществлялось методом тандемной масс-спектрометрии с ВЭЖХ, с ионной ионизацией электроспреем, в режиме множественного мониторинга масс. MRM переход 294, 2→225,1 для анастрозола и 448,2→285,1 для внутреннего стандарта арипипразола. Предел количественного обнаружения (LOQ) для анастрозола при отношении

сигнал/шум=9,21 составлял 0,25 нг/мл. Для расчета параметров фармакокинетики использовали программу WinNonLin в. 5.2. Для расчета профилей фармакокинетических кривых при многократном введении применяли программу PharmaCalc в. 1.0, статистическая обработка проводилась с применением port.SAS® v 9.0.

Результаты. Получены следующие значения фармакокинетических параметров: клиренс $Cl = 74 \pm 17$ л, константа абсорбции $K_a = 4,16 \pm 3,18$ ч⁻¹; период полувыведения $t_{1/2} = 49,6 \pm 15,2$ ч. Величина биодоступности была принята равной 85% на основе базовых популяционных фармакокинетических исследований [3]. При моделировании приема препарата в дозе 1 мг однократно в сутки с интервалом 24 часа, т.е. при рекомендованной схеме дозирования пациентам, показано, что время достижения 90% равновесной концентрации должно составить не менее 12 приемов. Были рассчитаны величины максимальной и минимальной равновесных концентраций анастрозола: $C_{ss_max} = 41,0 \pm 16,2$ нг/мл и $C_{ss_min} = 31,2 \pm 13,5$ нг/мл, соответственно. Средняя равновесная концентрация составила $35,8 \pm 14,8$ (среднее геометрическое).

Заключение. Полученные значения концентраций согласуются с данными других исследований фармакокинетики анастрозола при многократном дозировании [3], а полученный диапазон концентраций является оптимальным, что будет иметь значение при интерпретации результатов терапевтического лекарственного мониторинга у онкологических больных. Индивидуальный режим дозирования противоопухолевых препаратов у онкологических больных должен подбираться так, чтобы прогнозируемая концентрация находилась в пределах оптимального терапевтического диапазона. Это позволит максимизировать оптимальный ответ на проводимую терапию при минимизации рисков побочных явлений.

Список литературы

2. Anderson W.F. et al. 2002. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res. Treat.*, Vol. 76, P. 27–36.
3. Вышинская Г.В. 2005. Аримидекс в терапии больных раком молочной железы. *РМЖ*, Т. 13, № 10, 660—663.
4. FDA. CDER. Application number 22-214. *Clinical pharmacology and biopharmaceutics*. Review(s). P. 82-83. Available from:

Устойчивость к низким температурам клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки

Райдан М.^{1*}, Шубин. Н.А.¹, Блинова М.И.¹, Прохоров Г.Г.², Пинаев Г.П.¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Тихорецкий пр., 4, Санкт-Петербург, Россия, 194064
Тел: +79214161565, e-mail: raydanmazen@yahoo.com

² Международный институт криомедицины

Ключевые слова: Кератиноциты, стромальные клетки костного мозга, адипоцитарная и остеогенная дифференцировка, низкая температура

Resistance of cells at different stages of differentiation to low temperatures

Raydan. M.^{1*}, Shubin N.A.¹, Blinova M.I.¹, Prokhorov G.G.², Pinaev G.P.¹

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russian Federation
Tikhoretsky ave., 4, St. Petersburg, Russian Federation, 194064
Tel: +79214161565, e-mail: raydanmazen@yahoo.com

² International Institute of Cryomedicine

Key words: Keratinocytes, bone marrow stromal cells, adipogenic and osteogenic differentiation, low temperature

Различные клетки теплокровных животных в зависимости от их локализации в теле по-разному подвергаются стрессам, вызванным изменением температуры окружающей среды, в данном случае холодом. Клетки, подвергающиеся постоянным изменениям температуры, могут стать более адаптированными и более устойчивыми, например, клетки кожи и клетки жировой или костной тканей. На сегодняшний день неизвестно, отличаются ли клетки по устойчивости к холоду в зависимости от типа клеток и стадии их дифференцировки. В связи с этим нами было проведено в условиях *in vitro* исследование устойчивости к холоду клеток,

находящихся на разных стадиях дифференцировки, в частности, кератиноцитов (дифференцированных и недифференцированных), стромальных клеток костного мозга, экспериментально направленных в адипогенную и остеогенную дифференцировки (до и после их дифференцировки), а также 2 типа клеток опухолевого происхождения: трансформированной линии A431 (эпидермоидная карцинома человека) и клетки первичной культуры, выделенной из EHS саркомы мыши.

Для этой цели необходимо было сначала определить диапазон действующих низких температур, при которых сохраняется жизнеспособность клеток. Далее необходимо было изучить устойчивость к холоду кератиноцитов, выделенных из фрагментов кожи человека, взятой из разных участков тела, и определить устойчивость кератиноцитов к холоду в зависимости от степени их дифференцировки. Также следовало определить устойчивость стромальных клеток, выделенных из костного мозга крыс, до и после индукции их в остеогенном и адипогенном направлениях, изучить устойчивость опухолевых клеток трансформированной линии A 431 и свежевыделенных опухолевых клеток EHS к холоду, что позволило бы провести сравнительный анализ по устойчивости к холоду нормальных и дифференцированных кератиноцитов, а также клеток опухолевого происхождения (трансформированной линии и свежевыделенных).

Результаты показали, что молодые кератиноциты (стволовые и транзиторные, находящиеся в составе базального слоя эпидермиса) являются более устойчивыми к воздействию холода, чем дифференцированные, расположенные в супрабазальных слоях. Что касается клеток костного мозга, то оказалось, что нативные стромальные клетки более устойчивы, чем стромальные клетки, индуцированные в адипогенную или остеогенную дифференцировку. Кроме того, выяснилось, что клетки A431 являются менее устойчивыми к воздействию низких температур по сравнению с нормальными кератиноцитами и клетками EHS саркомы.

Полученные результаты имеют значение для медицины, поскольку обработка тканей организма жидким азотом часто применяется в целях криодеструкции, вызывающей разрушение опухолевых клеток путем воздействия на них низкими температурами; в косметологии такие воздействия являются методом омоложения кожи; в клеточной биологии могут применяться для обогащения популяции клеток молодыми

недифференцированными клетками, устойчивыми к холодовому стрессу.

Стандартизация биоаналитических измерений нуклеиновых кислот

Рунов А.Л.^{1,2*}, *Вонский М.С.*^{1,2}, *Кулябина Т.В.*¹, *Крылов А.И.*¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт им. Д.И. Менделеева, Российская Федерация

² Институт Цитологии РАН, Российская Федерация

* Московский пр., 19, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 190005

Тел.: +7 952 3733973, e-mail: tsinakan@gmail.com

Ключевые слова: биоаналитика, ПЦР-РВ, стандартный образец

Standardization of nucleic acids bioanalytical measurements

Runov A.L.^{1,2*}, *Vonskii M.S.*^{1,2}, *Kulyabina T.V.*¹, *Krillov A.I.*¹

¹ The State Research Center of the Russian Federation "D.I. Mendeleev All-Russian Institute for Metrology"

² Institute of Cytology RAS, Russian Federation

* Moskovsky pr., 19, St.Petersburg, Russian Federation, 190005

Tel.: +7 952 3733973, e-mail: tsinakan@gmail.com

Key words: bioanalytical measurement, real time-PCR, standard material

Введение. Исследования, связанные с измерениями нуклеиновых кислот – ДНК и РНК – устойчиво вошли в арсенал современной аналитики. Анализ нуклеиновых кислот стал неотъемлемой частью клинической лабораторной диагностики и судебной медицины. Исследования ДНК лежат в основе тестирования ГМО в пищевых продуктах и агропромышленном сырье. Широкое применение методов анализа нуклеиновых кислот обуславливает необходимость развития соответствующего метрологического обеспечения.

Создание системы метрологического обеспечения биоаналитических измерений включает разработку адекватной панели стандартных образцов, комплекса аппаратуры для их

аттестации, разработку поверочной схемы и требований к метрологическим характеристикам рабочих эталонов. В рамках работ в научно-исследовательской лаборатории аналитической метрологии, нами были проведены работы по созданию стандартного образца состава ДНК и разработана методика поверки для прибора, реализующего ПЦР в реальном времени.

Материал и методы. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) – метод количественного анализа нуклеиновых кислот. ПЦР-РВ – циклическая реакция, её проведение требует точного соблюдения режима термостатирования, быстрого изменения температур и однородности температурного поля термоблока. Для приборной реализации этого метода используют амплификаторы, представляющие программируемый термостат, снабжённый системой детектирования флуоресценции.

Биоаналитической задачей, решаемой с применением ПЦР-РВ, является определение количества копий молекул ДНК-мишени. Определение производится относительным методом, количество копий ДНК-мишени определяют по отношению к количеству копий ДНК-калибратора. В большинстве практических задач необходимо определить именно отношение количества последовательностей ДНК одного типа к количеству последовательностей ДНК другого типа (например, т.н. отношение числа копий ДНК ГМ сои к ДНК натуральной сои).

Результаты. Нами был разработан стандартный образец состава ДНК сои ГМ-СОЯ-ВНИИМ, представляющий собой раствор смеси ДНК натуральной сои и ГМ сои линии 40-3-2. Была разработана методика препаративного получения ДНК высокой степени очистки. Образцы были аттестованы с использованием сертифицированного референтного материала ERM – BF410gk, (IRMM, Бельгия). Образец ДНК получил статус ГСО № 9866-2011, свидетельство № 2010, действительно до 16.09.2016 г. Разработана методика поверки для биоанализатора Rotor-Gene Q, позволяющая оценить его метрологическую пригодность как прибора для проведения ПЦР-РВ.

Основой для разработки ГСО послужило также успешное участие в международных межлабораторных сличениях, таких как исследования измерительных возможностей в области количественного анализа ДНК и РНК методами ПЦР в реальном времени (ССQM P103, P103.1, K61), количественного анализа ГМ кукурузы MON810 (ССQM K86), анализа продуктов AFLP (ССQM P53), передачи массовой доли белка в растворе методом

флуоресцентного иммуноферментного анализа (CCQM P58, P58-1), метилирования ДНК (CCQM P94.1).

Выводы. Разработан стандартный образец состава ДНК сои, методика поверки прибора для ПЦР-РВ с его применением. Участие в международных сличениях обеспечивает прослеживаемость измерений нуклеиновых кислот, выполняемых ВНИИМ, к международным стандартам.

Эпимутации импринтированных генов при невынашивании беременности

Саженова Е.А., Скрябин Н.А., Лепшин М.В., Минаичева Л.И., Вовк С.Л., Лебедев И.Н.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики СО РАМН

Набережная р. Ушайки, д. 10, . Томск , Россия, 634050

Тел: (3822)51-31-46, e-mail: elena.sazhenova@medgenetics.ru

Ключевые слова: геномный импринтинг, неразвивающаяся беременность, эпимутации импринтированных генов

Epimutation of imprinting genes in the pregnancy loss

Sazhenova E. A., Skryabin N.A., Lepshin M.V., Minaicheva L.I., Vovk S.L., Lebedev I.N.

Institute of Medical Genetics SB RAMS

Naberezhnaya Ushaika, 10, Tomsk, Russian Federation, 634050

Keywords: genomic imprinting, pregnancy loss, epimutations of imprinted genes

Введение. Невынашивание беременности – одна из основных проблем репродукции человека, частота которой составляет 15-27%. В этой группе 20% женщин имеют привычное невынашивание беременности (ПНВ) – наличие в анамнезе трёх и более спонтанных аборт [1]. В структуре привычных потерь беременности выделяют генетические и нейроэндокринные нарушения, инфекционные заболевания у матери, возраст, иммунологические конфликты между матерью и плодом, неблагоприятное воздействие окружающей среды. При исключении

всех перечисленных причин остаются около 40 % супружеских пар, происхождение привычного выкидыша у которых представляется неясным (идиопатические выкидыши). Причина гибели этих зародышей с нормальным кариотипом, как правило, не выявляется [2].

Геномный импринтинг – один из ключевых эпигенетических феноменов, вовлеченных в обеспечение эмбрионального развития плацентарных млекопитающих и человека. Молекулярные механизмы нарушений импринтинга при патологии пре- и постнатального онтогенеза в значительной степени связаны с аномалиями дифференциального метилирования импринтированных генов. Ранее нами, при исследовании статуса метилирования отдельных импринтированных генов и центров импринтинга при остановке эмбрионального развития, было показано наличие эпимутаций одновременно в двух импринтированных локусах - в центре импринтинга KCNQ10T1 и гене PLAGL1 у 2,3% спонтанных абортусов (СА). Примечательно, что их матери имели ПНБ. Также было показано, что гипометилирование гена PLAGL1 статистически значимо чаще ($p < 0,05$) выявляется в плацентарных тканях СА от женщин с ПНБ, чем без него [3, 4]. Кроме того, с применением новых биочиповых технологий стало возможным оценить одновременно профили метилирования CpG динуклеотидов практически всех импринтированных генов, что позволяет проводить непредвзятый подход к выбору таких генов. Таким образом, целью настоящего исследования стал анализ статуса метилирования импринтированных генов при остановке эмбрионального развития в I триместре беременности как без, так и с ПНБ у матери.

Материал и методы. Работа выполнена на плацентарных тканях спонтанных абортусов (СА) I триместра беременности, полученных от женщин с клиническим диагнозом ПНБ (группа I, 9 эмбрионов) и без него (группа II, 6 эмбрионов). В качестве контрольной группы были исследованы плацентарные ткани 4-х медицинских абортусов I триместра беременности от женщин, не пожелавших сохранить нормально протекавшую беременность по социальным показаниям. Анализ статуса метилирования был выполнен с помощью метилочипа «GoldenGate Methylation Cancer Panel I» (Illumina, США) после бисульфитной модификации ДНК, согласно протоколу производителя. Эта панель содержит 108 CpG-сайтов, локализованных в 47 импринтированных генах, как с отцовской, так и с материнской экспрессией.

Результаты. У каждого из эмбрионов показано наличие множественных эпимутаций, затрагивающих от 4 до 12 импринтированных генов. Большинство эпимутаций (78 %) имели постзиготическое происхождение. Анализ групп абортусов от женщин с ПНБ и без ПНБ показал, что эпимутации импринтированных генов статистически значимо чаще регистрируются в группе I, в отличие от группы II (9,0% и 4,5%, соответственно, $p < 0,05$). При этом не были выявлены отличия по частоте гаметических эпимутаций в анализируемых группах (1,1% и 0,8%, $p = 0,08$). В то время как соматические эпимутации значимо чаще выявлялись в группе I (7,6%) по сравнению с группой II (3,5%) ($p < 0,05$). Частота гипометилирования материнских аллелей, формирующих отцовский эпигенотип, в группе I более чем в два раза превышала данный показатель в группе II (7,1% и 3,5% соответственно, $p < 0,05$). Гиперметилирование как материнского, так и отцовского аллелей также статистически значимо чаще выявлялось в группе I (2,6%) по сравнению с группой II (0,7%) ($p < 0,05$). Показано, что эпимутации, ведущие к супрессии развития зародыша, статистически значимо чаще формируются в группе I (9,1%) по сравнению со второй группой – 3,9% ($p < 0,01$).

Выводы. Результаты проведенного исследования позволяют сделать заключение о том, что эпигенетическая изменчивость импринтированных генов в соматических клетках зародышей является тем самым молекулярным механизмом, который обуславливает ожидаемый негативный эффект нарушения их дозы при патологии эмбрионального развития человека. Статистически значимая высокая частота эпимутаций в СА от женщин с ПНБ по сравнению с СА без данной патологии у женщин свидетельствует в пользу того, что возможно, супружеские пары с ПНБ у жены являются носителями определённых вариантов генотипов или эпигенотипов, которые делают геном их потомства подверженным эпигенетической изменчивости, несовместимой с нормальным эмбриональным развитием.

Список литературы

1. Ford H.B., Schust D.J. 2009. Recurrent Pregnancy Loss: Etiology, Diagnosis, and Therapy. *Reviews in obstetrics & gynecology*, V. 2, N 2, P. 76-83.

2. Stephenson M., Kutteh W. 2007. Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clin. Obstet. Gynecol.*, V.50, P.132-145.
3. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. 2008. Эпимутации центра импринтинга KCNQ1OT1 хромосомы 11 при ранней эмбриональной гибели у человека. *Генетик*, Т. 44, N 12, С. 1609-1616.
4. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. 2010. Эпимутации импринтированного гена *PLAGL1* при привычном невынашивании беременности. *Медицинская генетика*, Т. 9, N 11, С. 34-39.

Однородительская дисомия в клинической практике: синдром Прадера-Вилли

Саженова Е.А., Лебедев И.Н.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики СО РАМН

набережная р. Ушайки, д. 10, Томск, Россия, 634050

Тел: (3822)51-31-46, e-mail: elena.sazhenova@medgenetics.ru

Ключевые слова: однородительская дисомия, синдром Прадера-Вилли, фено-кариотипические корреляции

Uniparental disomy in clinical practice

Sazhenova E. A., Lebedev I. N.

Institute of Medical Genetics SB RAMS

Naberezhnaya Ushaika, 10, Tomsk, Russian Federation, 634050

Keywords: uniparental disomy, Prader-Willi syndrome, genetic subtype differences

Введение. Однородительская дисомия (ОРД) – ошибочное наследование потомком двух гомологичных хромосом от одного родителя, нарушающее баланс хромосом материнского и отцовского происхождения, который принципиально важен для нормального развития человека. ОРД могут оказать негативное влияние на здоровье по двум возможным причинам: вследствие эффекта родительского геномного импринтинга в результате

гетеро- или изодисомии и вследствие демаскировки рецессивных мутантных генов в случае изодисомии [1].

Одним из примеров заболеваний, где в основе одной из причин может быть ОРД, а именно ОРД хромосомы 15 материнского происхождения, является синдром Прадера-Вилли (СПВ, MIM 176270). Развитие заболевания связано с нарушением моноаллельной экспрессии импринтированных генов, считываемых с хромосомы отца, и расположенных в регионе 15q11-q13. Кроме ОРД хромосомы 15, существует ряд других цитогенетических механизмов, выключающих экспрессию импринтированных генов на отцовском гомологе, среди которых различают: микроделецию критической области хромосомы 15 на отцовской хромосоме и мутации в центре импринтинга (ЦИ) [2]. Все эти механизмы обуславливают формирование генетической гетерогенности СПВ. Определение корреляций между изменениями генома и их клиническим проявлением представляет центральную проблему медицинской генетики. В случае генетически гетерогенных синдромов, обусловленных нарушением различных механизмов реализации наследственной информации, установление связи «генотип-фенотип» имеет существенное значение как для понимания механизмов формирования патологического фенотипа, так и для дифференциальной диагностики и прогноза течения заболевания.

Исследования пациентов с различными молекулярными формами СПВ (преимущественно с делеционным вариантом и с ОРД) показали, что пациенты с делеционным вариантом синдрома имеют более низкий интеллект и у них чаще обнаруживается гиперпигментация, по сравнению с пациентами с ОРД [3, 4]. В то же время, психоз и аутизм более характерны для больных с ОРД [5]. Тем не менее, до сих пор до конца не определены критерии фенотипа, по которым можно было бы дифференцировать различные молекулярные варианты этого заболевания. Целью настоящего исследования и явилось определение таких признаков в группах пациентов с клинической картиной СПВ и различной генетической конституцией.

Материал и методы. Материалом для исследования служила ДНК и препараты хромосом, полученные из культивированных лимфоцитов периферической крови от 57 пациентов с фенотипической картиной СПВ и их родителей. Описание фенотипа больных с СПВ проводили путем заполнения карты, в которую вошли 64 клинических признака, выявленных у

пациентов. Для сравнения особенностей совокупности фенотипических показателей (признаков) у пробандов с диагностически верифицированными формами молекулярной патологии при СПВ и у пациентов с неподтвержденным в результате молекулярных исследований диагнозом использовали метод *анализа соответствий* (correspondence analysis). Этот метод позволяет визуализировать структуру взаимосвязи между анализированными признаками в системе координат. При парных сравнениях использовали точный критерий Фишера и критерий χ^2 . Для коррекции небольших значений использовали χ^2 с поправкой Йетса.

Результаты. Молекулярно-генетический анализ пациентов с клинической картиной синдрома СПВ выявил 3 группы больных: 1) с микроделецией 15q11-13 на отцовском гомологе (54%), 2) с ОРД хромосомы 15 материнского происхождения (23%) и 3) с клинической картиной заболевания, но нормальным статусом метилирования критической области хромосомы 15 (21%). Анализ соответствий позволил дифференцировать признаки, специфичные для каждой из обследованных групп. Диастема была характерна только для пациентов с ОРД. Гидроцефалия и круглое лицо отличали больных с делеционным вариантом заболеванием. Гипотиреоз сопровождал оба варианта синдрома. Пациенты с фенотипической картиной заболевания, но нормальным статусом метилирования характеризовались микростомией, дефектом сердечной перегородки и эпикантом. Индивиды с ОРД хромосомы 15 имели меньшую частоту нарушений нервной системы, позвоночника и конечностей, по сравнению с пациентами с делеционным вариантом синдрома.

Выводы. Полученные данные указывают на возможность формирования специфических нарушений фенотипа при различных формах молекулярной патологии импринтированной области хромосомы 15 человека. Учет таких фенотипических особенностей может иметь прогностическую значимость для определения стратегии молекулярно-генетической диагностики генетически гетерогенных наследственных заболеваний.

Список литературы

1. Yamazawa K., Ogata T., Ferguson-Smith A.C. 2010. Uniparental disomy and human disease: an overview. *Am. J. Med. Genet.* V. 15, P. 329-334.

2. Cassidy S.B., Schwartz S., Miller J.L., Driscoll D.J. 2012. Prader-Willi syndrome. *Genet. Med.*, V.14, P. 10-26.
3. Quaio C.R., de Almeida T.F., Albano L.M., et al. 2012. A clinical follow-up of 35 Brazilian patients with Prader-Willi syndrome. *Clinics*, V.67, P. 917-921.
4. [Whittington J.](#), [Holland A.](#), [Webb T.](#) 2009. Relationship between the IQ of people with Prader-Willi syndrome and that of their siblings: evidence for imprinted gene effects. *J. Intellect Disabil Res.*, V. 53, P. 411-418.
5. Veltman M.W., Thompson R.J., Roberts E., et al. 2004. Prader-Willi syndrome – a study comparing deletion and uniparental disomy cases with reference to autism spectrum disorders. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry*, V.13, P. 42–50.

**Частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах
периферической крови больных с солидными опухолями**

Семёнов А.В.

ФБГУ РНЦ радиологии и хирургических технологий
197758, Россия, Санкт-Петербург, Песочный, Ленинградская ул.
70/4

Тел.: +7 812 596-87-23, e-mail: radgenetika@mail.ru

Ключевые слова: хромосомные aberrации, онкологические пациенты, генетическая нестабильность.

**The frequency of chromosomal aberrations in peripheral blood
lymphocytes
of patients with solid tumor**

Semenov A.V.

*Russian National Centre of Radiology and Surgical Technologies
Leningradskaya str., 70/4, Pesochny, St. Petersburg, Russian Federation
197758*

Key words: chromosomal aberrations, cancer patients, genetic instability

Введение. Известно, что злокачественная трансформация клеток связана с нарушением контроля клеточного цикла. При этом

снижается эффективность репарации спонтанных и индуцированных повреждений ДНК, что приводит к генетической нестабильности. Клетки многих раковых опухолей содержат мутации геномного (анеуплоидия и полиплоидия) и хромосомного (транслокации, делеции, дупликации и др.) типов. Цель настоящей работы: оценить частоту хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах периферической крови больных с солидными опухолями до начала противоопухолевой терапии.

Материалы и методы. У 14 пациентов с различными видами солидных опухолей в возрасте от 23 до 75 лет проводили анализ частоты спонтанных ХА на препаратах культивируемых лимфоцитов на стадии метафазы. В качестве контроля использованы препараты 45 здоровых доноров соответствующего возраста.

Результаты. У пациентов общее количество ХА, частота клеток с ХА, двойных (ДФ) и одиночных фрагментов (ОФ) оказались достоверно выше, чем в контроле. Сравнение данных по каждому пациенту с аналогичными средними значениями в контрольной группе с использованием точного критерия Фишера показало, что у 11 из 14 пациентов наблюдаются достоверное превышение по частоте ДФ, по частоте ОФ, либо по обоим этим показателям. Возможно, это свидетельствует о генерализованном характере генетической нестабильности у этих пациентов, что, в свою очередь, может быть связано с индивидуальными генетическими особенностями. У трёх пациентов достоверные отличия частоты ХА от контрольных значений не обнаружены. Возможно, генетическая нестабильность у этих лиц носит локальный характер, ограничена лишь тканями, подвергшимися злокачественной трансформации и не распространяется на нормальные ткани.

На основе полученных данных были рассчитаны уравнения линейной регрессии частоты ХА на возраст. Сравнение коэффициентов регрессионных моделей для пациентов с коэффициентами уравнений, полученных для контрольной выборки, показало: для параметров «общая частота хромосомных aberrаций» и «частота ДФ» – линейные коэффициенты оказались достоверно выше, чем в контроле (t-критерий Стьюдента). Это означает, что у онкологических пациентов увеличение частоты хромосомных aberrаций с возрастом происходит быстрее, чем в контроле, что может свидетельствовать о прогрессирующей генетической нестабильности.

Заключение. Установление факта генерализованного характера генетической нестабильности по повышенной частоте спонтанных ХА в лимфоцитах периферической крови может послужить основой для планирования противоопухолевой терапии с учётом повышенной вероятности индукции потенциально онкогенных мутаций в интактных тканях и появления так называемых вторичных опухолей после проведённого лечения.

В дальнейшем планируется исследовать наличие корреляции между генетической нестабильностью, выявляемой по частоте спонтанных ХА в лимфоцитах периферической крови, и полиморфизмами наиболее известных генов репарации ДНК. Для этого будут использованы замороженные суспензии лимфоцитов онкологических пациентов, обследованных цитогенетическим методом.

Применение алгоритма лабораторного молекулярно-генетического исследования для оценки функционального состояния тромбоцитов и оптимизации антиагрегантной терапии у больных, оперированных на артериях нижних конечностей

Сироткина О.В.^{1,3}, Суринт Н.А.², Горбунов Г.Н.¹, Вавилова Т.В.¹*

¹ ГБОУ ВПО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздравсоцразвития России * Пискаревский пр., 47, Санкт-Петербург, Россия, 195067
E-mail: olgasirotkina@list.ru

² ГБУЗ «Городской консультативно-диагностический центр №1», Санкт-Петербург

³ ФГБУ ПИЯФ им. Б.П.Константинова, г. Гатчина, Ленинградская обл.

Антиагрегантная терапия, клопидогрел, аспирин, функциональная активность тромбоцитов, ишемическая болезнь нижних конечностей

Algorithm of molecular-genetic assay for platelet's evaluation and optimization of antiplatelet therapy in patients with peripheral arterial disease

Sirotkina O.^{1,3}, Surint N.², Gorbunov G.¹, Vaviliva T.¹*

¹ North-Western State Medical University named after I.I Mechnikov

Piskarevskiy, 47, St.Petersburg, Russia, 195067, olgasirotkina@list.ru

² Municipal Advisory Diagnostic Center № 1, St.Petersburg, Russian Federation

³ B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, Leningrad district, Russian Federation

Key words: Antiplatelet therapy, clopidogrel, aspirin, platelet reactivity, peripheral arterial disease

Введение. Несмотря на развитие современных хирургических технологий, фармацевтического рынка, достаточную изученность патогенеза облитерирующего атеросклероза, до сих пор не существует алгоритма ведения пациентов, перенесших оперативное лечение по поводу ишемической болезни нижних конечностей. Вариантом решения данной проблемы может служить комплексный подход к лечению данных пациентов и персонализированный подбор медикаментозной терапии, на основании полученных клинико-лабораторных данных. Целью данной работы явилось применение оригинального алгоритма лабораторного молекулярно-генетического исследования для оценки функционального состояния тромбоцитов и оптимизации антиагрегантной терапии у амбулаторных больных, перенесших операции на артериях нижних конечностей.

Материалы и методы. В исследование вошли 105 пациентов обоего пола (возраст от 40 до 79 лет), перенесшие реконструктивные операции на артериях по поводу облитерирующего атеросклероза нижних конечностей, наблюдавшиеся в ГКДЦ №1 с 2008 по 2013 год. Контроль функциональной активности тромбоцитов осуществлялся по показателям АДФ- (10 мкМ) и коллаген- (2 мкг) индуцированной импедансной агрегатометрии на импедансноагрегометре «Chrono-log» (Chrono-log Corporation, США). Генотипирование Leu33Pro GP IIIa, C807T GP Ia, G36T P2Y12, CYP2C19*2 (G681A), CYP2C19*3 (G636A), CYP2C19*17 (C(-806)T), CYP3A5*3 (A6986G) проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием реактивов НПФ «ДНК-Технология» (Россия) и «Литех» (Россия).

Результаты. У всех включенных в данную работу больных был использован оригинальный алгоритм контроля функционального состояния тромбоцитарного гемостаза и индивидуальным ответом на антиагрегантную терапию на основе

функциональных лабораторных тестов и генетического тестирования. Шаг 1: исходный визит пациентов, оценка клинического состояния (первичная оценка состояния периферического кровообращения нижних конечностей, степени поражения атеросклерозом других артериальных бассейнов на основании УЗДГ артерий нижних конечностей с измерение ЛПИ, УЗДС нижних конечностей, УЗДС брахиоцефальных артерий), контроль функциональной активности тромбоцитов на основе анализа АДФ- и коллаген-индуцированной агрегатометрии, при необходимости – генетический анализ (пациентам с установленной на основании лабораторных данных высокой активностью тромбоцитов), назначение антиагрегантной терапии или ее коррекция (добавление клопидогрела при высокой функциональной активности тромбоцитов, если исходно была монотерапия ацетилсалициловой кислотой). Шаг 2: контроль ответа на назначенную (или скорректированную) терапию в сроки от 2 недель до 1 месяца от исходного визита, оценка клинического состояния, определение функциональной активности тромбоцитов на основе анализа АДФ- и коллаген-индуцированной агрегатометрии, сравнение данных агрегатометрии при исходном и текущем визите пациента, анализ данных генетического исследования, стратификация риска повторных эпизодов, при необходимости – коррекция терапии, как в случае недостаточного ответа на антиагреганты, так и в случае чрезмерного подавления функции тромбоцитов, минимизация риска возможных геморрагических осложнений. Шаг 3: визит пациента в сроки 3, 6 и 12 месяцев, оценка клинического состояния, субъективных ощущений пациента, его социальной реабилитации (восстановление трудоспособности), контроль функциональной активности тромбоцитов на фоне проводимой антиагрегантной терапии на основе анализа АДФ- и коллаген-индуцированной агрегатометрии, при необходимости коррекция или отмена терапии клопидогрелом и/или ацетилсалициловой кислотой. За время наблюдения у пациентов, обследованных с применением описанного алгоритма, не наблюдалось прогрессирования атеросклероза, атеротромботических событий, геморрагических осложнений.

Заключение: применения алгоритма, включающего комплексную оценку клинического состояния пациента, исследования функции тромбоцитов и генетические варианты, определяющие функциональную активность тромбоцитов и

чувствительность к антиагрегантным препаратам, позволит индивидуально подобрать дозу и сроки комбинированной терапии ацетилсалициловая кислота+клопидогрел для повышения эффективности лечения у амбулаторных больных, перенесших операции на артериях нижних конечностей.

Морфофункциональная оценка причин замершей беременности

Траль Т. Г.^{1}, Толибова Г. Х.¹, Сердюков С. В.²*

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта» СЗО РАМН. Санкт-Петербург, Российская Федерация

* Тел.: +7 9117601509, e-mail: ttg2008@bk.ru

² ФБУН Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Ключевые слова: замершая беременность, эстроген, прогестерон, морфологическое и иммуногистохимическое исследование

Morphofunctional evaluation of the causes of stilled pregnancy

Tral T.G.^{1}, Tolibova G.Kh.¹, Serdiukov S.B.²*

¹ FSBI «The D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology »
NWB RAMS. Saint Petersburg, Russian Federation

* Phone.: +7 9117601509, e-mail: ttg2008@bk.ru

² Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the
Pasteur. Saint Petersburg, Russian Federation

Key words: stilled pregnancy, estrogen, progesterone, morphological and immunohistochemical study.

Введение. Замершая беременность первого триместра является актуальной проблемой современного акушерства и приобретает медико-социальное значение в связи увеличением числа бесплодных пар. По данным литературы, большая часть выкидышей раннего срока обусловлена хромосомной патологией. Этиологическими факторами могут быть так же инфекционные, гормональные, иммунологические и другие нарушения.

Достаточно часто при замершей беременности отмечается сочетание нескольких факторов [1]. Причиной осложнений на начальных этапах гестации является не абсолютное содержание стероидных гормонов, а морфологическая зрелость эндометрия и количество функционально полноценных рецепторов в ткани эндометрия [2, 3].

Материалы и методы. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование абортного материала было проведено в 99 случаях на сроке от 5 до 11 недель, поступивших в отдел патоморфологии за период с сентября 2011 по март 2012 года. Проводка материала для гистологического исследования проведена по стандартной методике. Срезы окрашивались гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование включало в себя определение экспрессии рецепторов эстрогенов α (альфа), рецепторов прогестерона. Оценка экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона оценивали путем подсчета процента окрашенных ядер методом Histochemical Score с контролем системой компьютерного анализа изображений «Морфология 5.0» (ВидеоТест, Россия).

Результаты. Прерывание беременности при эмбриогистологическому сроке 5-7 недель выявлено в 67,7% (67 случаев), на сроках от 8-11 недель - в 32,3% (32) случаев. Хромосомная патология подтверждена генетическим методом в 63% случаев от общего числа исследуемых случаев. Приём гормональных препаратов во время беременности был у 39 женщин, что составляет 39% от общего числа обследуемых. Из общего числа ранних самопроизвольных выкидышей на фоне приёма гормональных препаратов хромосомная патология трофобласта выявлена в 22 случаях, что составило 56,5%.

Проведённое исследование показало, что не только хромосомная и гормональная, но и сочетанная патология играет важную роль в проблеме перинатальных потерь первого триместра беременности. При иммуногистохимическом исследовании экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона в железах и децидуальной ткани выявлено, что гормональная патология присутствовала более чем в 80% случаев исследований от слабой до выраженной степени.

Выводы. На этом основании возможно предполагать, что наличие в децидуальной ткани определенного соотношения

рецепторов эстрогена и прогестерона с преобладанием последних является важным условием для сохранения беременности. Нарушение циклических превращений эндометрия и его рецепторного аппарата, несмотря на гормональную поддержку, часто приводит к прерыванию беременности.

Список литературы

1. Айламазян, Э.К. 1997. Репродуктивное здоровье женщины как критерий биоэкологической диагностики и контроля окружающей среды. *Ж. акуш. и жен. болезн.*, № 1, С. 6-10.
2. Милованов А.П., Болтовская М.Н., Фокина Т.В., и др. 2008. Незривающаяся беременность: гистологические и иммуногистохимические маркеры эндокринных нарушений в соскобах эндометрия. *Архив патологии*, № 6, С 22-25.
3. Walch K.T., Huber J.C. 2008. Progesterone for recurrent miscarriage: truth and deceptions. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, Vol.22, N.2, P. 375-389.

Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* и клинико-анамнестических данных с гипергомоцистеинемией у женщин Югорского региона

Шульгин Д.А.^{1*}, Колбасин Л.Н.^{1,2}, Донников М.Ю.¹, Сичинава Е.П.¹, Урванцева И.А.^{1,2}

¹ Центр диагностики и сердечно-сосудистой хирургии

* ул. Ленина 69/1, Сургут, Российская Федерация, 628400

Тел.: +7 3462528532, e-mail: shulginx@gmail.com

²Сургутский государственный университет, Медицинский институт, Российская Федерация

Ключевые слова: гомоцистеин, генетический полиморфизм, метаболизм фолатов

Analysis of association of genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* polymorphic variants and clinical anamnestic data with hyperhomocysteinemia in Yugra region inhabitants

Shulgin D.A.^{1*}, Kolbasin L.N.^{1,2}, Donnikov M.Y.¹, Sichinava E.P.¹,
Urvanceva I.A.^{1,2}

¹ The Center of Diagnostics and Cardiovascular Surgery

* Lenina str. 69/1, Surgut, Russian Federation, 628400

Tel.: +7 3462528532, e-mail: shulginx@gmail.com

² Surgut State University, Medical Institute, Russian Federation

Key word: homocystein, genetic polymorphism, folate metabolism

Цель исследования. Изучение связи полиморфизмов 677C>T, 1298A>C гена *MTHFR*, 2756A>G гена *MTR* и 66A>G гена *MTRR*, клинико-анамнестических данных с высоким уровнем гомоцистеина в сыворотке крови у женщин, проживающих на территории ХМАО-Югры, оценить возможность использования оригинальной методики оценки риска гипергомоцистеинемии.

Материал и методы. В исследовании участвовали 98 женщин с установленным диагнозом: Привычное невынашивание беременности (ВОЗ), средний возраст пациенток составил 32±6 лет. Обследованные прошли анкетирование с использованием оригинального шаблона медицинской карты. Выделение геномной ДНК проводилось методом экспресс-экстракции на основе температурного лизиса. Для детекции однонуклеотидных полиморфизмов 677C>T, 1298A>C гена *MTHFR*, 2756A>G гена *MTR* и 66A>G гена *MTRR* использовали ПЦР в режиме реального времени с анализом кривых плавления на амплификаторе CFX96 («Bio-Rad», США). Исследование уровня общего L-гомоцистеина в сыворотке крови проводили на планшетном фотометре Multiskan Ascent («Thermo Electron Corporation», Финляндия). Оценка комбинированного риска гипергомоцистеинемии проводилась по оригинальной балльной методике. Статистическая обработка данных осуществлялась в соответствии с правилами вариационной статистики с применением программы «Биостат», при $p \leq 0,05$.

Результаты. Средний уровень гомоцистеина составил 10,1±5,9 мкмоль/л, при этом высокий (> 15 мкмоль/л) уровень гомоцистеина выявлен у 12,2% лиц. Распределение частот исследованных генотипов не соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга, среднему для российских [1] и мировых [2] популяций, вероятно, по причине нерепрезентативности выборки. Статистически значимой ассоциации изучаемых генотипов и аллелей с уровнем гомоцистеина не получено. При изучении связи уровня

гомоцистеина в крови обследованных лиц с клинико-анамнестическими данными установлена ассоциация табакокурения и гипергомоцистеинемии ($p=0,003$). При оценке комбинированного риска показана статистически значимая корреляция количества баллов риска, рассчитанных по оригинальной методике, с уровнем гомоцистеина у обследованных лиц ($r=0,17$; $p=0,018$).

Заключение. Изучена связь однонуклеотидных полиморфизмов 677C>T, 1298A>C гена *MTHFR*, 2756A>G гена *MTR*, 66A>G гена *MTRR*, клинико-анамнестических данных с высоким уровнем гомоцистеина в сыворотке крови у женщин, проживающих на территории ХМАО-Югры. Получена статистически значимая корреляция баллов риска, рассчитанных по оригинальной методике, с уровнем гомоцистеина. Разработанная методика может быть использована для оценки риска гипергомоцистеинемии.

Список литературы

1. Деревянчук Е.Г., Машкина Е.В., Коваленко К.А., Александрова А.А. 2011. Биохимические и генетические критерии фолатного метаболизма и нарушения эмбриогенеза человека. *Современные проблемы науки и образования* [Электронный ресурс], № 4. URL: www.science-education.ru/98-4738.
2. Wilcken B., Bamforth F., Li Z., et al. 2003. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J. Med. Genet.*; Vol. 40, P. 619–625.

Молекулярно-генетическое исследование продолжительности жизни: анализ полиморфизма генов-кандидатов

Эрдман В.В., Туктарова И.А., Насибуллин Т.Р., Каримов Д.Д., Сахаутдинова Г.М., Мустафина О.Е.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
Проспект Октября, 71, Уфа, Россия, 450054
Тел.: +7 3472356088, e-mail: danivera@mail.ru

Molecular genetic study of lifespan: analysis of candidate genes polymorphism

Erdman V.V., Tuktarova I.A., Nasibullin T.R., Karimov D.D., Sakhautdinova G.M., Mustafina O.E.

Institute of biochemistry and genetics Ufa scientific centre RAS

Tel.: +7 3472356088, e-mail: danivera@mail.ru

Summary. The study of the molecular-genetic basis of aging and longevity essential to the development of approaches correct "anti-aging" treatment. In the implementation of the aging mechanisms are important genes, the protein products of which are in key positions in the regulation of free radical, inflammatory and apoptotic processes, hemostasis, insulin/IGF-like signaling, and have pleiotropic effects. It is assumed that one of the main molecular events that modify the rate of aging and leading to longevity is SNP (single nucleotide polymorphism). Aim of our study was to estimate alleles and genotypes frequencies dynamic of number of genes with age. 1786 unrelated persons (Ethnic Tatars from Bashkortostan) from 20 to 109 years were attended in research. Gene polymorphism was analyzed by PCR and PCR-RFLP. Search of genetic markers associations with age was performed using logistic regression analysis (SPSS18.0). It was found that among elderly there were an increase of *IL6**G/*G and *FOXO1**C/*G genotype frequencies in females and *NFKB1**T/*T genotype frequency in males; a decrease of *IL10**A/*C genotype frequency in males and *FOXO1**G/*G genotype frequency in females. By senile age in males, there were increased frequencies of *SOD2**V/*V, *TP53**P/*P and *BCL2**C/*C genotypes and decreased frequencies of *CASP8**I/*I and *BCL2**T/*T genotypes. In females reaching the stage of senile age was positively associated with *SIRT1**C/*C, *STAT5A**C/*T, *JAK3**C/T and *FV**C/*C genotypes and negatively – with *STAT5A**T/*T genotype. Among long-lived females there was increased proportion of *SOD2**V/*V, *TNFA**G/*A, *BCL2**T/*T, *BAX**A/*A and *STAT5A**C/*C genotypes carriers and decrease in proportion of *SOD2**A/*V, *TNFA**G/*G, *BCL2**C/*C, *BAX**A/*G and *BAX**G/*G genotypes carriers. In group of long-lived males, the probability of identifying of *MSRA**C/*C, *BAX**G/*G, *STAT5A**T/*T, *FOXO3A**A/*G and *FGB**G/*G genotypes was reduced while the probability of identifying of *FOXO3A**G/*G and *FGB**A/*G genotypes was increased. Thus, it is possible to assume that polymorphisms of the studied genes are associated with survival rate at mature, advanced, and senile age.

Введение. Изучение молекулярно-генетических основ старения и долголетия необходимо для развития фундаментальных концепций о причинах и механизмах старения, для разработки эффективных мер профилактики старения и возрастзависимых заболеваний, подходов адекватной “антивозрастной” терапии, а также системы предикторов потенциального возраста дожития. Все это имеет значение для создания рекомендаций по продлению жизни и сохранению активного долголетия.

В реализации механизмов старения организма важную роль играют гены, белковые продукты которых занимают ключевые позиции в регуляции и осуществлении целого ряда внутриклеточных процессов, как физиологических, так и патологических. В частности, к таким генам-кандидатам, определяющим продолжительность жизни, относятся гены транскрипционных факторов, цитокинов, апоптоза, инсулинового сигналинга, оксидативного стресса, гемостаза [1, 2, 3]. Плейотропный характер эффектов данных групп генов, с одной стороны, создает сложность для изучения непосредственного влияния конкретного гена на разворачивание процесса старения, а с другой стороны, позволяет учитывать любые возможные пути реализации генетического кода.

Предполагается, что одними из главных молекулярных событий, модифицирующих скорость старения и определяющих долголетие, являются распространенные точковые мутации – полиморфизмы, или SNP (single nucleotide polymorphism) [4]. В частности, методом GWAS для нескольких десятков мультифакторных заболеваний (МФЗ), являющихся основными ограничителями продолжительности жизни, было обнаружено сцепление с более чем полутора тысячами SNP [5].

Цель исследования заключалась в изучении значимости полиморфных маркеров ряда генов для достижения возраста старости и долголетия у человека.

Материалы и методы. В работе были задействованы образцы ДНК, полученные от 1786 неродственных между собой лиц (мужчин и женщин) в возрасте от 20 до 109 лет, принадлежащих к этнически однородной группе (татары, Республика Башкортостан). Таким образом, вся выборка была представлена следующими возрастными группами: зрелой (22-60 лет для мужчин, 21-55 лет для женщин), пожилой (61-74 года для мужчин, 56-74 для женщин), старческой (75-89 лет для мужчин и женщин) и группой долгожителей (от 90 лет и старше) [6].

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рестрикционного анализа (ПЦР-ПДРФ) были изучены полиморфные локусы генов *IL6* (rs1800796), *IL10* (rs1800872), *IL12B* (rs3212227), *TNFA* (rs1800629), *MSRA* (rs10098474), *SOD2* (rs4880), *SIRT1* (rs3758391), *NFKB1* (rs4648110), *TP53* (rs1042522), *BAX* (rs1805419), *BCL2* (rs12454712), *CASP8* (rs3834129), *FOXO1A* (rs4943794), *FOXO3A* (rs3800231), *STAT5A* (rs9889323), *JAK1* (rs310216), *JAK3* (rs3212780), *FGB* (rs1800790) и *FV* (rs2269648). Последовательности олигонуклеотидных праймеров и эндонуклеазы подобраны при помощи пакета программ “dnastar” и электронной базы данных (www.ncbi.nlm.nih.gov). Анализ ассоциаций полиморфных локусов генов с возрастом выполняли с применением бинарной логистической регрессии (SPSS V. 18.0).

Результаты. Среди лиц пожилого возраста наблюдается увеличение частоты генотипа *IL6*G/*G* (OR=1.020, p=0.023) у женщин и генотипов *IL10*A/*C* (OR=1.034, p<0.001) и *NFKB1*T/*T* (OR=1.014, p=0.028) у мужчин; снижается частота носителей генотипа *IL10*C/*C* среди пожилых мужчин (OR=0.956, p<0.001) и частота носителей генотипа *FOXO1*G/*G* среди пожилых женщин (OR=0.976, p=0.039).

В старческом возрасте среди мужчин происходит нарастание частоты носителей генотипов *SOD2*V/*V* (OR=1.021, p<0.001), *TP53*P/*P* (OR=1.012, p=0.029) и *BCL2*C/*C* (OR=1.017, p=0.001) и убывание частоты носителей генотипов *CASP8*I/*I* (OR=0.991, p=0.045) и *BCL2*T/*T* (OR=0.989, p=0.002). У женщин с достижением старческого возраста положительно ассоциированы генотипы *SIRT1*C/*C* (OR=1.016, p=0.010), *STAT5A*C/*T* (OR=1.044, p<0.001), *JAK3*C/T* (OR=1.019, p=0.045) и *FV*C/*C* (OR=1.027, p=0.045), отрицательно – генотип *STAT5A*T/*T* (OR=0.978, p=0.008).

Среди женщин, достигших возраста долголетия, возрастает доля носительниц генотипов *SOD2*V/*V* (OR=1.021, p<0.001), *TNFA*G/*A* (OR=1.014, p=0.012), *BCL2*T/*T* (OR=1.023, p=0.002) и *BAX*A/*A* (OR=1.041, p=0.002) и снижается доля носительниц генотипов *SOD2*A/*V* (OR=0.970, p<0.001), *TNFA*G/*G* (OR=0.956, p=0.008), *BCL2*C/*C* (OR=0.971, p=0.009), *BAX*A/*G* (OR=0.968, p=0.013) и *BAX*G/*G* (OR=0.921, p=0.035). Шансы достижения возраста долголетия понижены у мужчин – носителей генотипов *MSRA*C/*C* (OR=0.986, p=0.014), *BAX*G/*G* (OR=0.908, p=0.008), *STAT5A*T/*T* (OR=0.957, p=0.037), *FOXO3A*A/*G* (OR=0.991, p=0.002) и *FGB*G/*G* (OR=0.990, p=0.009), повышены у мужчин –

носителей генотипов *FOXO3A**G/*G (OR=1.010, p=0.001) и *FGB**A/*G (OR=1.011, p=0.008).

Заключение. Таким образом, в этнически однородной группе татар выявлены ассоциации с возрастом полиморфных локусов ряда генов. Установлено, что такие ассоциации могут быть ограничены рамками возрастных диапазонов, неодинаковых для носителей разных генотипов, для мужчин и женщин. В целом полученные данные характеризуют полиморфизмы проанализированных генов, ответственных за реализацию свободнорадикальных, воспалительных, аутоиммунных и апоптических процессов, как ассоциированные с достижением возраста старости и долголетия.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №13-04-01561а) и РГНФ (грант №13-06-00633).

Список литературы:

1. *Анисимов В.Н.* Молекулярные и физиологические механизмы старения // СПб.: Наука, 2008, Т.1. 481 с.
2. *Батин М.* Научные тренды продления жизни. Обзор исследований в области биологии старения // М.: Группа Восток, 2010. 413 с.
3. *Feng Z., Lin M., Wu R.* The regulation of aging and longevity: a new and complex role of p53 // *Genes and cancer*. 2011. V. 2. №4. P. 443-452.
4. *Murabito J.M., Yuan R., Lunetta K.L.* The search for longevity and healthy aging genes: insights from epidemiological studies and samples of long-lived individuals // *Journal of gerontology*. 2012. V. 67A. № 5. P. 470-479
5. *Баранов В.С., Глотов О.С., Баранова Е.В.* Геномика старения и предиктивная медицина // *Успехи геронтологии*. 2010. Т. 23. № 3. С. 329-338.
6. *Хрисанфова Е.Н.* Основы геронтологии (Антропологические аспекты) // М.: ВЛАДОС, 1999. 160 с.

Инновационные технологии в диагностике геномных аномалий у детей с идиопатическими формами умственной отсталости

Юров И.Ю.^{1,2,3}, Ворсанова С.Г.^{1,2,4}, Куринная О.С.^{1,2,4}, Зеленова М.А.^{1,4}, Юров Ю.Б.^{1,2,4}*

¹ФГБУ "Научный центр психического здоровья РАМН" Российской академии медицинских наук

²ФГБУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава РФ»

³Кафедра Медицинской Генетики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России

⁴ГБОУ ВПО «Московский городской психолого-педагогический университет»

*Загородное шоссе 2, Москва 117152, Россия

Тел. +7 (495)9528990, e-mail: ivan.iourov@gmail.com

Ключевые слова: аутизм, умственная отсталость, геном, ДНК-микроматрица, молекулярное каротипирование, геномные и хромосомные нарушения

Innovative technologies in the diagnosis of genomic abnormalities in children with idiopathic mental retardation

Iourov I.Yu.^{1,2,3} Vorsanova S.G.^{1,2,4}, Kurinnaya O.S.^{1,2,4}, Zelenova M.A.^{1,4}, Yurov Yu.B.^{1,2,4}*

¹FGBU "Mental Health Research Center of Medical Sciences" of the Russian Academy of Medical Sciences, Zagorodnoe sh.2

²FGBU "Moscow Institute of Pediatrics and Pediatric Surgery, Ministry of Health of the Russian Federation"

³Department of Medical Genetics, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russian Federation

⁴Moscow City University of Psychology and Education

*Zagorodnoe sh 2, Moscow 117152, Russian Federation

Tel. +7 (495)9528990, e-mail: ivan.iourov@gmail.com

Keywords: autism, mental retardation, genome, DNA microarray, molecular karyotyping, genomic and chromosomal abnormalities

Развитие геномных технологий (молекулярных и цитогенетических методов), среди которых ведущее место занимают различные методы полногеномного сканирования

несбалансированных (делеций/дупликаций), созданных на платформе сравнительной геномной гибридизации (молекулярное карiotипирование), позволило определять молекулярные и клеточные (генетические и эпигенетические) механизмы нарушения психики у более чем у 50% пациентов [1]. В нашей работе, используя технологию молекулярного карiotипирования, мы исследовали 113 детей с идиопатической умственной отсталостью в сочетании с врожденными пороками развития, аутизмом или эпилептиформными проявлениями. Причинно-следственная связь между изменениями генома и клиническими проявлениями заболевания оценивалась с помощью оригинальных биоинформатических технологий [2-4]. Вариации генома, связанные с фенотипическими проявлениями (хромосомные аномалии и геномные микроперестройки), были выявлены в 93 случаях (82%). Среди них были перестройки, связанные с известными заболеваниями: формы умственной отсталости, сцепленной с хромосомой X, синдром ДиДжорджи. Тем не менее, значительно большее число случаев было ассоциировано с ранее не описанными геномными перестройками, позволяя сделать вывод о том, что в данных случаях обнаружены новые генетические дефекты, ассоциированные с умственной отсталостью и/или другими формами нарушения психики.

После проведения биоинформатического анализа было обнаружено, что гены, вовлеченные в геномные перестройки, являются компонентами геномных сетей (pathways, или цепочка межгеновых (межбелковых) взаимодействий (интерактомные цепочки), отвечающая за определенный молекулярный или клеточный процесс в организме), затрагивающие критические процессы развития и функционирования головного мозга, а также чувствительности к лекарственным препаратам и/или биологически активным веществам, вызывающим зависимость (алкоголь, морфин, каннабиноиды). Например, были обнаружены дупликация гена *GNG13*, расположенного в участке хромосомы 16p13.3 и участвующего в геномных сетях холинергических, дофаминергических и глутаматергических синапсов; дупликация гена *GAB1*, расположенного в 4q31.21 и участвующего в геномной сети сигнального пути нейротрофина; делеция генов *HTR3D*, *HTR3C*, *HTR3E* в участке 3q27.1, вовлеченных в геномные сети серотонинергических синапсов. Помимо этого, были также выявлены изменения последовательностей ДНК генов, экспрессирующихся в головном мозге и кодирующих

нейротрансмиттеры центральной нервной системы (*KIRREL3*, *GRM7*, *PER3*). У некоторых исследованных пациентов наблюдались нарушения геномных сетей, ответственных за активность вкусовых рецепторов, ГАМК-эргической системы (синапса), апоптоз клеток эмбрионального и постнатального мозга, регуляцию клеточного цикла и дифференциацию нейронов, а также метаболизм этилового спирта, морфина, каннабиноидов.

При диагностике пациентов с недифференцированными формами нарушений психики отсутствие выраженной клинической картины, характерной для определенного заболевания, значительно затрудняет постановку диагноза. Представленные нами данные свидетельствуют об эффективности применения метода молекулярного кариотипирования (полногеномного сканирования) при исследовании недифференцированных форм нарушения психики у детей. В подобных случаях цитогенетические, молекулярные и биоинформатические методы могут внести ясность в этиологию и патогенетические механизмы заболевания и способствовать научно обоснованному лечению. В данном контексте необходимо отметить, что наличие результатов полногеномного сканирования позволяет не только определить патогенетические процессы, но и оценить индивидуальную чувствительность пациента к лекарственным препаратам и биологически активным веществам, вызывающим зависимость.

Суммируя полученные данные, можно сделать обоснованный вывод о том, что использование принципов персонализированной (геномной) медицины в медицинской генетике дает возможности перейти на новый, более высокий уровень оказания помощи с целью улучшения качества жизни детям, страдающим недифференцированной умственной отсталостью.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для научных исследований молодых российских ученых-докторов наук (МД-4401.2013.7).

Список литературы

1. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Kurinnaia O.S., et al. 2012. Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalies. *Mol. Cytogenet.*, 5: 46.
2. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Куринная О.С. и соавт. 2012. Генетические аспекты психологических и поведенческих

нарушений у детей с аутистическими расстройствами и трудностями в обучении: диагностика геномных и хромосомных нарушений с использованием ДНК-микрочипов. *Современные проблемы науки и образования*. №3; (дата обращения: 27.06.2012). URL: www.science-education.ru/103-6449.

3. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Liehr T., et al. 2009. Increased chromosome instability dramatically disrupts neural genome integrity and mediates cerebellar degeneration in the ataxia-telangiectasia brain. *Hum. Mol. Genet.* V.18, P.2656-2669.
4. Iourov I.Yu., Vorsanova S.G., Solov'ev I.V., Yurov Yu.B. 2010. Methods of molecular cytogenetics for studying interphase chromosome in human brain cells. *Russ. J. Genet.*, V. 46. No. 9, P.1039-1041.

Молекулярная цитогенетика и геномика заболеваний аутистического спектра

*Юров Ю.Б.^{1,2,3}, * Ворсанова С.Г.^{1,2,3}, Юров И.Ю.^{1,2,4}*

¹ФГБУ "Научный центр психического здоровья РАМН" Российской академии медицинских наук

² ФГБУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава РФ»

³ГБОУ ВПО «Московский городской психолого-педагогический университет»

⁴ Кафедра Медицинской Генетики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России

*Zagorodnoe sh 2, Moscow 117152, Russia

Tel. +7 4959528990, svorsanova@mail.ru, ivan.iourov@gmail.com,
y_yurov@yahoo.com

Ключевые слова: аутизм, умственная отсталость, геном, ДНК-микроматрица, молекулярное кариотипирование, геномные и хромосомные нарушения.

Molecular cytogenetics and genomics of autistic spectrum disorders

*Yurov Yu.B.^{*1,2,3}, Vorsanova S.G.^{1,2,3}, Iourov I.Yu.^{1,2}*

¹FGBU "Mental Health Research Center of Medical Sciences" of the Russian Academy of Medical Sciences, Zagorodnoe sh.2

² FGBU "Moscow Institute of Pediatrics and Pediatric Surgery, Ministry of Health of the Russian Federation"

³ Moscow City University of Psychology and Education

*Zagorodnoe sh 2, Moscow 117152, Russia, Tel. +7 4959528990, svorsanova@mail.ru, ivan.iourov@gmail.com, y_yurov@yahoo.com

Keywords: autism, mental retardation, genome, DNA microarray, molecular karyotyping, genomic and chromosomal abnormalities

Аутистические расстройства представляют собой генетически гетерогенную группу болезней, демонстрирующую исключительное разнообразие с точки зрения клинических проявлений и молекулярных механизмов патогенеза. Расстройства аутистического спектра или аутизм часто ассоциированы с умственной отсталостью, эпилептиформными проявлениями, микроаномалиями и пороками развития. Например, около 70% детей с заболеваниями аутистического спектра имеют также нарушения психики в виде умственной отсталости, а 10% детей — эпилептиформные проявления. Главной спецификой медико-биологических исследований аутизма является применение комплекса молекулярно-генетических и биоинформатических методов, которые позволяют определить мутации, ассоциированные с аутизмом, а также выявить вариации генома, связанные не столько с патологическими процессами, сколько с индивидуальной толерантностью к лекарственным препаратам и дополнительным риском осложнений заболевания. В исследованиях последних лет по идентификации молекулярных и клеточных механизмов патогенеза аутизма все чаще используют молекулярно-генетические (молекулярно-цитогенетические) и биоинформатические технологии для определения процессом-мишеней или генные (геномные) сети, нарушения в которых вызывают предрасположенность к этому заболеванию. В дополнение к этому следует отметить, что постгеномные технологии с применением ДНК-микроматриц (array CGH) в несколько раз (с 4-5% до 40-50%) повышают эффективность молекулярной диагностики генетических аномалий в группах детей с аутизмом, а также позволяют определять индивидуальную чувствительность к лекарственным препаратам и различным отрицательным воздействиям окружающей среды. Анализ собственных данных и данных литературы по нейрогеномике аутизма позволяет сделать заключение о необходимости

дополнительных высокоразрешающих исследований геномных вариаций с учетом их функциональных последствий, определяемых с помощью новых биоинформатических технологий. Исследования геномных и хромосомных нарушений у детей с аутистическими расстройствами значимы для определения причин соответствующих нарушений психики. Помимо фундаментального значения, эти исследования значимы для лабораторной диагностики аутизма, выявления факторов риска возникновения заболевания, а также для медико-генетического консультирования семей, имеющих детей с аутизмом. Следовательно, постгеномные технологии значимы как для диагностики генетически обусловленных форм аутизма, так и для трансляционной психиатрии при разработке научно обоснованных методов ранней медицинской и психологической коррекции нарушений психики при аутизме.

Исследование частично поддержано грантом Президента Российской Федерации (МД-4401.2013.7).

Today's education for tomorrow's health. Integrative algorithms and etiopathogenetic clusters as study methods to bridge the chasm between the basic science and practical medicine

Kovač Z.

University of Zagreb Medical School, Department of Pathophysiology,
KBC Rebro, Kišpatičeva 12, Zagreb, Croatia
E-mail: zkovac@mef.hr

Key words: medical education, pathophysiology, molecular medicine, etiopathogenetic clusters, algorithms, teaching methods, problem based seminar

The present status of research and education in medicine and related fields. Biomedical sciences and medical practice started the 21st century with the exciting driving forces, which come both from basic discoveries and new clinical applied methods. This essay is a short overview of landmark discoveries, methodological breakthroughs, new medical paradigms and “cutting-edge” interest of medicine. The educational issues are shortly outlined through emerging methodologies and cognitive features of adult human brain physiology. Contemporary

understanding of general features of the scene can be summarized as follows.

Postgenomic era of medicine started with the completion of human genome sequencing in the year 2003. Along with the factual contents of chemical basis of genetic information, the new powerful methods have been developed. Those methods are often able to generate the throughput quantities of measurable and verifiable data [1]. The real macromolecular communications have become the major players in the interpretation of physiological phenomena. The horizons of molecular insight into the living processes are unprecedented in the history of science. Beyond DNA-codifying machinery, genetic and epigenetic regulation (transcriptomics) has become a challenging issue. Together with proteomics, reactomics (and other omics-scientific strategies) molecular orchestration of life processes has become a central theme [2, 3]. Bioinformatics helps in converting the raw molecular data extracted from patient samples into interpretable, accessible and statistically meaningful information. The power of quantitative molecular consideration of living phenomena has brought new insight and vision. The triumph of *molecular medicine* sets a stage for a reinterpretation of classical framework of knowledge. Biology as science (including science of human life processes) has gone through a *positivistic scientific revolution*.

In parallel with molecular medicine, a new prospective of medicine has been opened by discoveries of cellular unique ontogeny and tissue dynamics during the lifetime. *Stem cells biology, renewal and somatic cell reprogramming* shed new light on human body regeneration potential, life span concepts, and chronobiological alterations, etc [4]. The pluripotency of stem cells has become the second paradigm of medicine. Stem cells can transform into a dazzling array of specialized tissue cells. Disorders of their physiology and body trafficking may be responsible for various serious medical conditions (such as cancer and birth defects, etc). Presently, they are seen a sort of internal repair system, dividing essentially without limits [5, 6]. The concept of replenishment of cells in damaged or functionally failing tissues/organs comes as „materialized wishful thinking” of practicing physicians. Application of pluripotent stem cells have been approaching to the clinical arena. Methodology offers the possibility of a renewable source of replacement cells and tissues to treat a myriad of diseases (like, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, post ischemic conditions, spinal cord injury, burns, heart disease, diabetes, arthritis, etc). Along with upcoming strategies of *stem cells - based therapies* and

regenerative medicine, stem cell natural physiology itself represents the landmark advancement of knowledge in human biology.

The complexity and functionality in human health and disease states should be considered as physiological continuum. The same functional units of body reactivity are active in both groups of states, but with altered homeostatic regulatory features. Two fundamental characteristics of the complex systems are a system robustness and subsidiarity of elemental functional units. **Robustness** is defined as ‘a property that allows a system to maintain its functions against internal and external perturbations’ [7]. It is considered as the fundamental characteristics of biological systems in general. The organism’s phenotype remains constant within the broad limits of reactivity (i.e., a “reactive norm” of the system). It is so due to biological reserve, hormetic adaptive response, genomic adaptive response, mutual balancing of antagonistic responses, redundancy of pathways and units’ structure (i.e., multiple components performing similar functions), etc [8]. Robustness as the capacity of a system to function despite perturbations is fuelled by a functional **subsidiarity**. Namely, human physiology may be considered as a self-regulating system, with internal subsystems. Those subsystems contain a given level of autonomy of reactivity and they have bidirectional communication lines with the central regulatory unit. Such „distributed authority“ of subsystems (like organs, cells, genome regulation etc.) contributes to adaptive efficiency, a selection of recruitment of appropriate mechanisms, safe-guarding an alarming of the entire system, etc. A robust power grid of the body stems from safeguarding and synchronizing all subsystems.

Translational medicine policy shifts an academic strategy towards the defined ultimate goal of practical patient’s benefit [9, 10]. Pragmatic vision fosters both clinical and basic research towards the improvement in health of population. Policy makers have established a broad front that synchronizes regulatory forces (pertaining to scientific, healthcare, financial, ethical, legislative and broader social aspects), to bring about efficiency of complex undertaking. Academic centres, research programs, foundations, industry, disease-related organizations, and health-care systems are involved. The aim of optimizing patient care and preventive measures is considered as a natural progression from **evidence-based medicine strategy**. The strategy of „explicit, consciousness and judicious use of current best evidence” is now enriched and enforced towards the active generation of a new knowledge and procedures, to be usable directly at the health-care level.

Compartmentalization of practical medicine and dominant *reductionistic nature of scientific research* impose a limitation on cognitive processes and conceptualization of integral physiology and pathophysiology [11, 12, 13]. In simple terms, it may be stated that due to a narrowing down the scope of consideration, the ignorance of parallel processes (within the other parts of the same body) is increased. Professional compartmentalization into specialties and subspecialties contributes to the focusing and gaining greater expertise for given type of the disease. Structure of hospitals, education system and curricula are organized according to such conceptual scheme. However, natural development of disease processes often shows a tendency to spread away from the primary locus into surrounding and remote tissues and functional systems. Compartmentalized medicine faces the problem how to deal with complex states of diseases, whose patterns are not necessarily “compartmentalized”. Similar objections and weaknesses can be raised with respect of reductionistic nature of scientific research. Natural reactivity and disease development are thus sometimes described as „non-linear“, chaotic, „deterministic chaos – driven“, etc. Integrative understanding of physiology and pathophysiology should not ignore any side of the coin. In both holistic terms and in individual parts the integrative view should constitute the main pillar of medical intervention.

Societal demands of *personalized medicine* adds important stamp to the health-care system demands in 21st century. Instead of administration of a standard scheme of optimal therapy (validated for the group as a whole), individual variability of body reactivity should be taken into clinical consideration [14, 15]. The most efficient treatment and individual healing procedure is sought, and each person own reactivity should be diagnostically evaluated and taken into decision making process. Tailored therapy is to be designed according to the quality and quantity of individual patterns of reactivity. Since clinical evaluation is costly procedure, a degree of personalization of health-care system heavily is conditioned by the level financial availability.

In the best scenario *medical education strategy and methodology* would follow the most efficient approach. In optimal scheme appropriate time, quantity of theoretical and practical knowledge and competencies should be allocated to the newcomer to master the profession requirements [16, 17]. Presently European administrative directives set a lower limit of basic medical education to be >5500 hours, or six year curriculum. However, stake holders and academic policy-makers tend to impose contracted time limits on teaching contact

hours. It is a paradox of demanded reduction in spite of the knowledge expansion. Various recommendations and recommended procedures have been proposed [18, 19]. Heterogeneity of approaches and extensive variability of curricular schemata and methods are due to a lack of real progress in methodology of teaching/learning concepts. Example-based learning is traditionally considered as the most efficient method of learning. In medicine case-based learning enriches the clinical experience in diagnostics, therapy and abstract knowledge, as well. Theoretical considerations encompass taxonomic classifications, information technologies and referent knowledge (physics, chemistry, molecular biology, omics-sciences etc.) as useful supplementary ways. Quantity of potentially medically-relevant information and technical nature of information impose additional limitation on the progression of medical education.

Understanding of *nature of human brain cognitive functioning* may help in developing more efficient ways of studying. Cognitive powers of adults, including scientific reasoning, are tightly connected to a motivation, logical reasoning and previous experiences. Human intellect does not deal with plethora at the individual data points [20, 21]. It masters copious amounts of data through generalization, statistical averaging and extracting the common principles to be valid for majority, etc. Adult human brain grasps the plethora of perception and molds it into internal concepts, stratifications and visions. Gain and retain of declarative knowledge and practical subroutine competencies are repetition-based processes. The study procedure of adult human brain includes a construction of knowledge in self directed, autonomous and previous - experience – related manner. Adults try to apply a new comprehension and specific mechanisms directly to his/her problem solving tasks. Through evaluation and active re-synthesis of patient's data students of medicine and doctors facilitate a gain and retain of medical knowledge. It is a sort of intellectual reinforcement of knowledge construction. Reiterative inquiries into the same or like-problems enable the proper professional grasp, elaboration and solution of any practical problem.

Matrix driven active algorithmic elaboration of the problem – a powerful method. Medical information has been grown and it continues to grow, with a fast pace. How to reduce the information noise and dig out main etiopathogenetic pathways, contextual and parallel pathways, branching points and their mutual interaction has become the burning issue. Not all information is relevant (at least at the present time). The context of inquiry, experimental design, the levels of control

and appropriate conclusions are factors of relevance. Proper pathophysiological interpretation of natural history aims to integrate *vertical dimension* (from the molecule to symptom), *horizontal dimension* (simultaneous involvement of multiple systems), as well as *longitudinal dimension* (natural course) of the problem. Such framework of integration was used as a systemic approach in the concept and narrative of the textbooks of pathophysiology, which are in use in last three decades (Figure 1).



Figure 1. Seven editions of the textbook Pathophysiology (in Croatian) in which a synthesis of general etiopathogenesis is outlined in 35 chapters (22). The book has become the referal text and it is the best selling book of medicine in Croatia.

Although pathophysiology education has been following many pathways, including concepts of general principles, nosology, organ-related pathophysiology, etc., all teaching/learning configurations have a common idea – one should follow the nature of pathobiological development considered in three dimensions. Natural history of disease and disorder should be the principal foundation and the frame of reference. In the following two approaches those three dimensions of pathobiology have been systematically applied and enforced throughout individual tasks.

In order to make pathophysiology teaching/learning workable from teacher's point of view, as well as attractive and friendly to students, we established educational matrix-guided model of *problem based seminars (PBS)*, with four steps. The first step is *exposition of problem* that gives short presentation of “raw data” derived from patient records, selected publications with experimental data, etc. Narrative presentation uses natural language in medicine. Each case study is derived from published reports concerning a certain problem. Scientifically it is primarily qualitative type of information mixed with qualitative data whenever it was possible and appropriate. The

exposition part gives a study context for the upcoming elaborations within the 2 through 4 steps of the matrix. The second step is *the repetition of relevant knowledge*. It is a multiple choice test, that includes statements related to the exposition and referred teaching materials. Questions and the tasks are designed in a special way to be the most informative and instructive. Namely, the correct answers are the wrong statements, whereas all other statements are essentially truthful descriptions of pathophysiological pathways of the study case from exposition. Such matrix guides a reader towards new facets and through additional layers of considered etiopathogenesis. It is a tacit strategy to provide the solid foundation of declarative knowledge and deeper understanding. In the third step, *the algorithmic workout of the pathogenesis* student's task is to build-up the cause-consequence sequence of events out of given 25-30 units of etiopathogenesis. Student discovers a positive and negative feedback loops, and parallel and contextual events, as well. The active re-construction of etiopathogenesis out of fragmented elements may be considered as a formal integration of knowledge. Visual graphic re-design (Figure 2) helps developing habit of systemic elaboration through

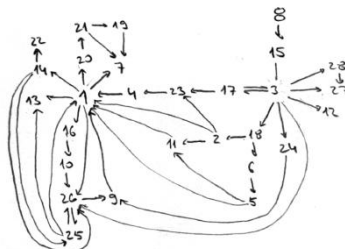


Figure 2. An example of students solution of etiopathogenetic algorithm. Each number is a code name for given etiopathogenetic element which are used as the unit blocks. The construction of algorithm is formal representation of synthetic interpretation of decribed etiopathogenesis.

a stepwise procedure, which are close to the practical every day activities of the physician. The fourth step, the *feedback integration of the problem* deals with additional relations, systematization and quantitative aspects of the same problem. All four levels of PBS are focused on the central theme given in the exposition and each new level adds up important facets and aspects. Thus, the integrated take-home message is generated. The method is 2.3 times more efficient in comparison to classical teaching. It nurtures vertical, horizontal and

longitudinal conceptualization of the problem. So far >9000 students of medicine at Croatian universities have been successfully educated via this methodology and appropriate textbooks were published (Figure 3). They often claim to have been practicing the same scheme of thinking, later on, in their daily elaboration of individual patient's health problems. They find 4-step matrix exercise of PBS as challenging frame of reference useful in many branches of medicine.



Figure 3. Three editions of Pathophysiology – Problem Based Seminars (in Croatian) introduced an algorithmic workout of the problem (23). It became the standard methodology in education of medicine. It has been described as a student friendly approach.

Etiopathogenetic clustering around the nodes of natural networking of reactivity. During disease development there is a natural tendency of individual etiopathogenetic pathways to join together and to form networks. The inter-connective elements serve as building blocks within the hierarchy of the system. We named those interconnecting nodes the *etiopathogenetic clusters (EPC)*. The EPCs may be considered as crossing points of the natural reactivity. They are formed at various levels (e.g. electrolyte concentration abnormalities, pH-alteration, energy disorders, cellular quantity-alteration, whole organ dysfunctions, etc.) (Figure 4). In terms of homeostatic

LEVELS OF FUNCTIONAL HIERARCHY:

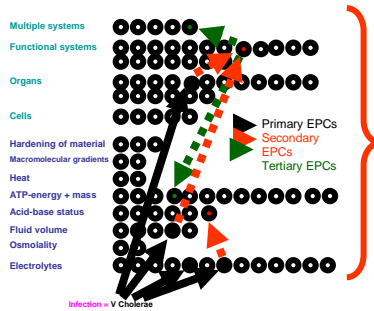


Figure 4. The 91 etiopathogenetic clusters (EPC) are formed at various levels of functional hierarchy of the body. Primary EPC induced by etiological factor often triggers secondary, tertiary (and n-th) EPCs and contributes to the networking of processes, regulatory relations, the EPCs have multiple entries and outputs. They are branching and integration point of reactivity. The EPCs are systematically elaborated and all tasks solutions in the published book are provided (Figure 5).

Even more, therapeutic corrections of such cluster values may lead to a clinical improvement. For example, correction of arrhythmia of ventricular fibrillation leads to a fast recovery from cardiogenic hemodynamic shock and saves the life. Therapeutic correction of hyperglycemia that causes the hyperosmolar syndrome leads to improvement of consciousness disorders and fluid derangement in the body. In addition to direct practical importance, teaching/studying of EPCs may become a reliable approach to master complexities in medicine. All tasks are designed in a way to bridge basic and clinical sciences and are always kept within the clinical reality of reported study cases. There are 91 principal clusters within the 30000 diseases. General assumption predicts that interconnection of those 91 EPCs creates the basic network of

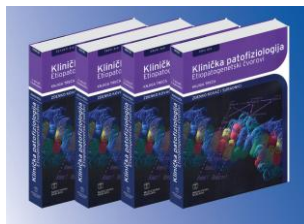


Figure 5. The book of Clinical Pathophysiology – Etiopathogenetic clusters (in Croatian) is four volume edition in which 91 etiopathogenetic clusters are elaborated in form of case studies (24). The clusters are considered as central integrative parts of natural networking of processes.

body’s “skeleton” of reactivity. Their interconnections would be the principal pathways according to which the system works. Variability of clinical symptoms and signs of the same disease in various individual patients would come from genomic, chronobiological and personal history variability (and others). However all conditions will have the basic EPC-interconnections behind the course of the disease. In other words, this concept and vision claim that the vast majority of human pathology may be reduced to a basic network of EPC-system.

We designed 1165 case studies (based on the published case reports) clustered within the 91 EPC. These case studies are directly usable as illustrative examples in daily clinical practice. In order to facilitate the usage of the book, the graphic introductory diagram in each chapter serves as schematic orientation within the multiple causes and consequences related to the given etiopathogenetic cluster (Figure 6). Such “mille-stoning” and visual networking helps in better conceptualization and comprehension of complex processes.

On the other hand, the concept of clusters helps to grasp a nonlinearity and complexity of pathobiology within the real study-time framework. The EPC-approach facilitates a rational usage of the information plethora and mastering professional demands. They provide a reliable frame of reference of pathobiological processes which underlay the clinical problem. It seems that EPC-approach facilitates medical reasoning towards integrative vision, and bridging the chasm of compartmentalized medicine education and research.

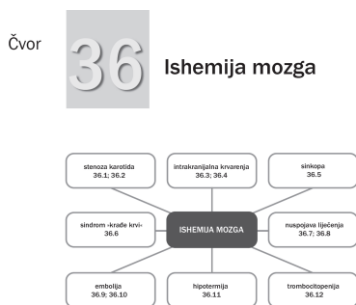


Figure 6. The EPC introductory page of each cluster is an orientation diagram that connects the central clustering event with the individual cases elaborated in that chapter. This is the 36th (out of 91 total) clusters' front pages within the book (24). Numbers 36.1 through 36.12 are individual case studies that belong to the chapter 36. The cluster 36 "BRAIN ISCHEMIA" is one out of 12 clusters described within the dysfunctions and disorders related to "ATP-energy and body mass level" of functional hierarchy (please compare Figure 4).

Concluding remarks. Both PBS and EPC together form a useful methodology for teaching/learning of pathophysiology and medicine in general. Both of approaches challenge student to take active role, facilitate a lot of student-teacher interactions, enforce a multiple repetitions and re-interpretations of etiopathogenesis, and always tend to integrate the basic sciences with clinical knowledge.

Conceptually, these two approaches represent a practice oriented pathophysiology that presents a contemporary state-of-the-art pathophysiology at individual patient cases. It seems that this approach brings about a better gain and retain of pathophysiological knowledge. Written materials are in form of problem solver (all solutions of the numerous tasks are given in the accompanying materials) which makes them suitable for a self education, as well.

The EPC-model offers etiopathogenetic network of crossing points. Elaboration of those clusters through multiple study cases keeps the learning process close to the practical every day activities of physician. Since it is following natural etiopathogenesis, it is not limited to the specific branch of medicine. Thus, the EPC-approach crosses the boundaries of professional compartments in medicine.

Both PBS and EPC approaches are open systems into which the new upcoming discoveries could be easily built in as contributing units. The authors of the book and methodology consider this as important feature. Since present knowledge naturally is partial one, the new relevant discoveries and insights will deepen our understanding of EPC-networking.

Both PBS and EPC may be useful for researchers and other professionals with non-medical background. With usage of this scheme they may find a reliable way to deal with the complexity of human clinical pathophysiology.

Both PBS and EPC are bringing together clinical and basic science knowledge (molecular, cellular, etc). Both methods tend to fuse reductionistic knowledge and holistic view into the clinically workable

scenario. One may say the two methods have made a solid bridge between the basic and clinical sciences and practice.

References

1. Shinya R., Morisaka H., Takeuchi Y., et al. 2013. Making headway in understanding pine wilt disease: What do we perceive in the postgenomic era? *J. Biosci. Bioeng.*, V. 116, P.1-8.
2. Weckwerth W. 2010. Metabolomics: an integral technique in systems biology. *Bioanalysis*, V. 2, P. 829-836.
3. Tochitani S., Hayashizaki Y. 2007. Functional screening revisited in the postgenomic era. *Mol Biosyst.*, V. 3, P. 195-207.
4. *Stem cells information:* <http://www.isscr.org> ; <http://www.explorestemcells.co.uk>
5. Fortino V.R., Pelaez D., Cheung H.S. 2013. Concise review: stem cell therapies for neuropathic pain. *Stem Cells Transl. Med.* V. 2, P. 394-399
6. Rector K, Liu Y., Van Zant G. 2013. Comprehensive hematopoietic stem cell isolation methods.. *Methods Mol. Biol.*, V. 976, P. 1-15.
7. Kitano H. 2007. Towards a theory of biological robustness. *Mol. Syst. Biol.* V. 3, P. 137-144.
8. Larhlimi A., Blachon S., Selbig J., Nikoloski Z. 2011. Robustness of metabolic networks: a review of existing definitions. *Biosystems*, V. 106, P. 1-8.
9. Haghikia A., Hohlfeld R., Gold R., Fugger L. 2013. Therapies for multiple sclerosis: translational achievements and outstanding needs. *Trends Mol. Med.* V. 19, P. 309-319.
10. Chen F.M., Zhao Y.M., Jin Y, Shi S. 2012. Prospects for translational regenerative medicine. *Biotechnol Adv.* V. 30, P. 658-672.
11. Groot M.M., Vernooij-Dassen M.J., Crul B.J., Grol R.P. 2005. General practitioners (GPs) and palliative care: perceived tasks and barriers in daily practice. *Palliat Med.* V. 19, P.111-118.
12. Schafer A.I. 1995. Deployment of academic subspecialists in the emerging era of primary care. *Am. J. Med.* V. 99, P. 69-73.
13. Greenblatt S.H. 1997. Harvey Cushing and the issue of surgical subspecialization: an historical perspective. *Surg. Neurol.* V. 47, P. 412-413.

14. Kovač Z. 2012. Pathophysiological foundations of personalized medicine. Etiopathogenetic clusters as integrating units of clinical pathophysiological pathways and networks. In: *Person in Medicine and Healthcare*. Đorđević V., Braš M., Miličić D, eds. Medicinska Naklada, Zagreb, P. 57-64.
15. Johnson J.A., Cavallari L.H. 2013. Pharmacogenetics and cardiovascular disease--implications for personalized medicine. *Pharmacol. Rev.*, V. 65, P. 987-1009.
16. Schuwirth L.W., van der Vleuten C.P. 2003. ABC of learning and teaching in medicine: Written assessment. *BMJ*, V. 326 N 7390, P. 643-645.
17. Haddad H., Baldo M.V. 2010. Teaching diffusion with a coin. *Adv. Physiol. Educ.* V. 34, P.156-157.
18. *ISP Beijing Declaration and ISP Shanghai Resolution on site*: <http://www.ISP.org>
19. Kovač Z. 2007. Beijing declaration on medical pathophysiology education. *Adv. Physiol. Educ.* V. 31, P. 387-388.
20. Thomas C, Baker CI. 2013. Teaching an adult brain new tricks: a critical review of evidence for training-dependent structural plasticity in humans. *Neuroimage*, V. 73, P. 225-236.
21. Takeuchi H., Kawashima R. 2012. Effects of processing speed training on cognitive functions and neural systems. *Rev Neurosci.*, V. 23, P. 289-301.
22. Gamulin S., Marušić M., Kovač Z., eds. 2011. *Pathophysiology, Book One*, Seventh Edition (in Croatian). Medicinska Naklada, Zagreb (The first through sixth editions were published in interval between the years 1988-2006).
23. Kovač Z. Gamulin S., eds. 2011. *Pathophysiology – Algorhythmic Problem Seminars Solver, Book Two*, Third Edition (in Croatian). Medicinska Naklada, Zagreb. (The first edition was published in 2003, whereas the second edition in year 2006).
24. Kovač Z., ed. 2013. *Clinical Pathophysiology – Etiopathogenetic Clusters, Book Three*, (in Croatian). (Four volumes). Medicinska Naklada, Zagreb.

О преподавании курса «Общая генетика» на медицинском факультете Санкт-Петербургского государственного университета

*Барabanова Л.В., Баженова О.В., Дукельская А.В., Москаленко С.Е., Рогоза Т.М., Мамон Л.А.**

Санкт-Петербургский государственный университет
Университетская наб., д.7/9, Санкт-Петербург, Россия, 199034
Тел./факс: +7 812 3281590, *e-mail: mamon@LM2010.spb.

Резюме. Статья посвящена проблемам преподавания генетики на Медицинском факультете Санкт-Петербургского государственного университета. Обращается внимание на необходимость демонстрации междисциплинарных связей генетики с современными разделами медицины, формированием у студентов-медиков генетического мышления, умения использовать молекулярно-генетические методы в профессиональной деятельности.

Ключевые слова: вузовская профессиональная подготовка медиков, преподавание генетики, компетенции, молекулярно-генетические методы, наследственные заболевания

On teaching the course "General Genetics" at the Medical Faculty of the St. Petersburg State University

*Barabanova L.V., Bazhenova O.V., Dukelskaya A.V., Moskalenko S.E., Rogoza T.M., Mamon L.A.**

St. Petersburg State University,
Universitetskaya nab., 7/9, St.-Petersburg, Russia, 199034
Tel./fax: +7 812 3281590, * e-mail: mamon@LM2010.spb.edu

Summary. The article deals with the problems of teaching undergraduate students in genetics at the Medical Faculty of the St. Petersburg State University. Attention is paid to the need to demonstrate the interdisciplinary links of genetics with fields of modern medicine, to the formation a genetic thinking in medical students, and their ability to use molecular genetic techniques in their professional activities.

Key words: higher school professional medical training, teaching of genetics, competences, molecular-genetic methods, hereditary diseases

С начала 20-го столетия генетика заняла определяющее место в современной медицине и биологии, превратив биологию в точную науку. Будучи фундаментальной наукой, которая изучает закономерности наследственности и изменчивости всего живого, включая человека, генетика служит базовой дисциплиной не только в биологическом, но и медицинском образовании. Это определяется, в первую очередь, тем, что разнообразные изменения генетического материала являются причиной тяжелых наследственных патологий, определяют предрасположенность к мультифакторным заболеваниям, чувствительность к лекарственным препаратам и неблагоприятным факторам окружающей среды. На современном этапе развития медицины молекулярно-генетические методы нашли широкое применение в диагностике как наследственных патологий, так и целого ряда ненаследственных заболеваний. Это во многом определяет дальнейшую стратегию их предупреждения, диагностики и лечения.

В связи с этим, современный врач любой специальности должен в своей работе опираться на достижения современной генетики, грамотно использовать разработанные генетические методы диагностики и лечения наследственных заболеваний, учитывать генетическую гетерогенность пациентов по их реакциям на действие физических и химических факторов, уметь адекватно трактовать полученные результаты генетических обследований. Основы такого рода знаний будущим врачам обязан заложить курс «Общая генетика», который неразрывно связан со специальным курсом «Медицинская генетика». При этом специальный курс «Медицинская генетика» представлен в учебном плане отдельной строкой, а базисный курс «Общая генетика» является одним из разделов общего курса «Биология».

При создании Медицинского факультета в Санкт-Петербургском государственном университете в 1995 году учебный план включал курс «Общая генетика» на 2-м курсе (4-й семестр), который состоял из 72 аудиторных часов. Выделенный объем учебной нагрузки предполагал чтение лекций в количестве 36 часов, и такое же количество (36 часов) - на проведение практических и семинарских занятий. Учитывая высокую ответственность задачи, которая была поставлена перед кафедрой генетики и селекции СПбГУ в подготовке высококвалифицированных медицинских кадров, заведующим кафедрой, профессором, академиком РАН С.Г. Инге-Вечтомовым

был разработан курс «Общая генетика» для студентов медицинского факультета. Одновременно с началом чтения лекций была подготовлена программа практических и семинарских занятий, которая предполагала наличие тесной связи лекционного материала с последующей более глубокой проработкой теоретического материала на семинарских занятиях в рамках отдельных студенческих групп. Имеющееся на первом этапе количество часов для проведения практических и семинарских занятий позволяло осуществлять регулярную проверку усвоения материала в виде самостоятельных и контрольных работ, что одновременно служило одной из форм подготовки студентов к их завершающей аттестации в виде экзамена. Данная форма преподавания генетики представляется необходимой в силу специфики предлагаемого материала, который требует от преподавателей создания основы для формирования у студентов-медиков генетической логики и, в целом, генетического мировоззрения, а также навыков в интерпретации результатов генетического анализа.

Перечень тем лекций, а также практических и семинарских занятий, которые были предложены студентам 2-го курса (4-й семестр) медицинского факультета, приводятся ниже. Лекции: Предмет и методы генетики. Краткая история генетики. Законы Менделя. Взаимодействие аллелей. Материальные основы менделевских закономерностей. Доказательства генетической роли ДНК. Репликация. Хромосомная теория наследственности. Генетические, цитологические и физические карты человека. Рекомбинация. Процессы, ведущие к рекомбинации у эукариот. Молекулярные механизмы кроссинговера. Процессы, ведущие к рекомбинации у прокариот и вирусов. Универсальные свойства генетического материала. Генная и клеточная инженерия. Типы изменчивости. Мутационный процесс. Экологическая генетика. Основы генетической токсикологии. Что такое ген? Действие гена: транскрипция и трансляция. Генетический материал в онтогенезе. Регуляция действия гена. Генетические основы эволюции. Основы генетики человека. Генетика количественных признаков. Генетические основы селекции. Модификации.

Практические и семинарские занятия: Наследование при моногибридном и дигибридном скрещиваниях. Полигибридное скрещивание. Взаимодействие генов. Цитологические основы наследственности. Митоз, мейоз. Хромосомы человека. Клеточный цикл. Гаметогенез. Сцепленное с полом наследование (на примере

дрозофилы). Кроссинговер. Методы генетического картирования. Методы цитологического картирования. Парасексуальный процесс. Контрольная работа 1. Митоз и мейоз - фильм. Семинар. Хромосомные перестройки. Полиплоидия. Структура и функция гена. Генетический код. Генная инженерия 1: рестрикционный анализ, физические карты. Клонирование генов. Библиотеки генов. Генная инженерия 2: методы работы с ДНК и РНК, секвенирование. Генетика популяций. Метод родословных. Контрольная работа 2.

Как видно из представленного перечня тем, курс «Общей генетики», предлагаемый студентам медицинского факультета, охватывал все важнейшие разделы современной генетики и позволял обсудить со студентами вопросы, непосредственно относящиеся к их дальнейшей специализации.

В последующем, начиная с 1999/2000 учебного года, объем часов, отводимых на практические занятия, был сокращен вдвое, что привело к серьезным проблемам в освоении данного курса, в особенности для студентов с низким уровнем базовой подготовки. Изменение «расчасовки» вынудило ограничиться перечнем тем, во многом повторяющих школьную программу вступительных экзаменов по биологии, а также полностью ликвидировать этапы промежуточной аттестации. Также был понижен и статус курса «Общая генетика» у студентов-медиков за счет изменения заключительной аттестации в виде экзамена в сессию на аттестацию в виде зачета до начала сессии. Сокращение объема курса «Общая генетика» должно было неизбежно отразиться на уровне подготовки специалистов, в особенности, учитывая специфику образовательных программ на медицинском факультете Санкт-Петербургского государственного университета, позволяющего готовить не только лечащих врачей, но и врачей-исследователей.

Начиная с 1997 года, чтение курса «Общая генетика» переносилось со второго курса на первый и обратно. В последние два года серьезной проблемой в преподавании генетики стал перенос курса «Общая генетика» с 4-го семестра 2-го курса на первый курс. С одной стороны, студенты-медики первого курса еще не успели растерять знания по генетике, полученные в школе. С другой, у них отсутствуют необходимые для понимания генетики сведения, которые должны им дать такие курсы, как общая и органическая химия, биохимия, цитология и др. Следует также с сожалением отметить, что в настоящий момент

существенно возросла дифференциация студентов по уровню базовой школьной подготовке по общей генетике, и это, вероятно, связано с деструктивными процессами, происходящими в настоящее время в сфере школьного образования.

Для повышения качества подготовки современных медицинских работников необходимо, чтобы объем лекций и практических и семинарских занятий составлял не менее 68 часов (34 ч. - лекции и 34 ч. – практические и семинарские занятия). В этом случае студенты имеют возможность не только освоить необходимый объем знаний, но и научиться пользоваться полученными знаниями на практике. Кроме того, требуется усилить мотивацию в изучении предмета путем демонстрации междисциплинарных связей, подчеркивая важность и необходимость генетических знаний в самых разных областях медицины (акушерстве и гинекологии, хирургии, кардиологии, психиатрии и т.д.).

В медицинских ВУЗах России и, в частности, Санкт-Петербурга, студенты-медики получают знания по генетике из других курсов лекций, например, из того же общего курса «Биология». Серьезной проблемой нашего города является отсутствие межвузовского взаимодействия по унификации знаний, которые получают студенты по обсуждаемому предмету. Таким образом, каждый год отечественная медицина пополняется молодыми специалистами с разным уровнем знаний по генетике, что не может не отражаться на качестве медицинского обслуживания населения. На наш взгляд, было бы целесообразным создание постоянно действующих семинаров или конференций на базе кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ, направленных на координацию совместных программ подготовки студентов медицинских специальностей по генетике. В том числе, требует особого внимания рассмотрение вопроса о подготовке единых учебников и учебных пособий по образцу учебника под редакцией академика В.И.Иванова «Генетика», М.: Академкнига, 2006. - 638 с., выпущенного коллективом преподавателей Московской Медицинской Академии имени И.М.Сеченова.

**Варианты и частота генетических полиморфизмов ферментов
детоксикации ксенобиотиков у детей с врожденным
изолированным дефектом межжелудочковой и предсердной
перегородок в Краснодарском крае**

Брайко О.П., Лазарев К.Ю., Голубцов В.И.

Кубанский государственный медицинский университет

Седина ул., 4, Краснодар, Россия, 350063

Тел.: +7 9615274547, e-mail:brayko_op@mail.ru

Резюме. Проведено изучение роли генетических полиморфизмов *Val432Leu* гена *CYP1B1* и *G590A* гена *NAT2* ферментов детоксикации ксенобиотиков в предрасположенности к формированию врожденных изолированных дефекта межжелудочковой перегородки у 100 пациентов и дефекта предсердной перегородки - у 45 пациентов. Выявлено статистически значимое различие в частоте аллелей полиморфизма *Val432Leu* гена *CYP1B1* и в частоте генотипа *432 GG* между больными с дефектом предсердной перегородки и популяционным контролем ($\chi^2=3,77$; $p=0,05$; OR=1,56, 95% CI=0,99-2,46 и $\chi^2=5,42$; $p=0,02$; OR=2,37, 95% CI=1,13-4,96, соответственно).

Ключевые слова: врожденный дефект межжелудочковой перегородки (ДМЖП), врожденный дефект предсердной перегородки (ДПП), полиморфизм, маркер предрасположенности, Краснодарский край

**Variation and frequency of genetic polymorphisms of
xenobiotic detoxication enzymes in children with congenital
isolated defect of atrioventricular and interventricular
partitions, in Krasnodar Region**

Brayko O.P., Lazarev K.U., Golubcov V.I.

Kuban States Medical University

Sedin St. 4, Krasnodar, Russia, 350063,

Тел.: +7 961527454, e-mail:brayko_op@mail.ru

Key words: congenital defect of atrioventricular partition (AVP), congenital defect of interventricular partition (IVP), polymorphism, associated marker, Krasnodar region.

Введение. Дефекты межжелудочковой (ДМЖП) и предсердной (ДПП) перегородок занимают лидирующее место в

структуре врожденных пороков развития системы кровообращения (ВПР СК) в Краснодарском крае (51,8% и 16,7%, соответственно), с частотой 7,96‰ среди новорожденных [1]. Изолированные случаи этих пороков сердца имеют мультифакторную природу. На сегодняшний день накоплено значительное число данных о вовлеченности различных полиморфных генов в формирование предрасположенности к патологии мультифакторного генеза [2, 3].

Исследованы полиморфные варианты генов ферментов детоксикации ксенобиотиков *Val432Leu* гена *CYP1B1* и *G590A* гена *NAT2* с целью выявления их частоты у больных с врожденными изолированными ДМЖП и ДПП и в группе популяционного контроля в Краснодарском крае.

Материалы и методы. Обследованы дети с ДМЖП (n=100) и ДПП (n=45), родившиеся в 1998-2012 гг., а также группа популяционного контроля (n=232 человека) из 44 административных образований Краснодарского края. Средний возраст детей с ДМЖП составил $3,11 \pm 0,81$ лет, с ДПП - $3,10 \pm 0,14$ лет. Соотношение полов среди детей с ДМЖП составляло 46% и 64% (46 мальчиков и 64 девочки), среди детей с ДПП - 27% и 73% (13 мальчиков и 32 девочки). Группой популяционного контроля явились родители детей с ДМЖП и ДПП, не имеющие врожденных пороков развития. Все обследованные имели славянскую национальность и являются коренными жителями Краснодарского края.

Выделение ДНК осуществлялось из замороженной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [4]. Анализ полиморфизмов проводили методом полимеразной цепной реакции с соответствующим анализом данных в амплификаторе CFX96 Bio-rad, в режиме Real time.

Результаты. Анализ распределения генотипов изучаемых полиморфных маркеров генов показал, что для полиморфизма *Val432Leu* гена *CYP1B1* в группе индивидуумов с ДМЖП, ДПП и в популяционной выборке эмпирическое распределение генотипов соответствует теоретически ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга ($>0,05$). По локусу *G590A NAT2* у детей с ДМЖП выявлено отклонение от равновесия Харди-Вайнберга за счет низкой фактической гетерозиготности по сравнению с теоретической ($\chi^2=5,09$; $p<0,05$). Уровень аллельного разнообразия по данным локусам для индивидуумов с ДМЖП составил $H_0=0,49$ (для локуса *Val432Leu CYP1B1*), $H_0=0,35$ (для локуса *G590A NAT2*), а для индивидуумов с ДПП $H_0=0,42$; $H_0=0,42$ соответственно и H_0

=0,49 (для локуса *Val432Leu CYP1B1*), $H_0=0,43$ (для локуса *G590A NAT2*) в популяционной выборке. Распределение генотипов *Val432Leu CYP1B1* ($\chi^2=0,33$; d.f.=1; $p>0,05$) как у индивидов с ДМЖП и генотипов *Val432Leu CYP1B1* ($\chi^2=1,09$; d.f.=1; $p>0,05$), *G590A NAT2* ($\chi^2=0,13$; d.f.=1; $p>0,05$) у индивидов с ДПП, так и в контрольной группе для локуса *Val432Leu CYP1B1* ($\chi^2=0,13$; d.f.=1; $p>0,05$) соответствовало ожидаемым частотам при равновесии Харди-Вайнберга, а распределение генотипов *G590A NAT2* у детей с ДМЖП ($\chi^2=5,09$; d.f.=1; $p<0,05$) не соответствовало ожидаемым частотам, по сравнению с контрольной группой ($\chi^2=0,18$; d.f.=1; $p>0,05$).

При изучении полиморфизмов *Val432Leu* гена *CYP1B1*, *G590A* гена *NAT2* в группах больных ДМЖП, ДПП и в контроле статистически значимые различия в частотах их аллелей между группами больных ДМЖП, ДПП и здоровых не установлены ($p>0,05$), но выявлено статистически значимое различие в частотах аллелей полиморфизма *Val432Leu* гена *CYP1B1* между группой больных ДПП и здоровых ($\chi^2=3,77$; $p=0,05$; OR=1,56, 95% CI=0,99-2,46) (табл.1).

Полиморфизм	Аллели	Частоты аллелей, %			χ^2 (p) ДМЖП	χ^2 (p) ДПП
		Больные ДМЖП (n=100)	Больные ДПП (n=45)	Здоровые (n=232)		
<i>Val432Leu CYP1B1</i>	<i>432A</i>	63,5	50,0	61,0	0,37 (0,54)	3,77 (0,05)
	<i>432G</i>	36,5	50,0	39,0		
<i>G590A NAT2</i>	<i>590I</i>	65,5	63,3	66,8	0,11 (0,74)	0,41 (0,52)
	<i>590G</i>	34,5	36,7	33,2		

Таблица 1. Распределение частот аллелей полиморфизмов *Val432Leu* гена *CYP1B1*, *G590A* гена *NAT2* в группах больных ДМЖП, ДПП и здоровых индивидов

При сравнительном анализе частот генотипов исследуемых полиморфизмов генов системы детоксикации ксенобиотиков в группах больных ДМЖП, ДПП и у здоровых индивидов определена высокая частота генотипа *432 GG* полиморфизма *Val432Leu* гена *CYP1B1* у больных ДПП (28,9%) в сравнении с популяционной выборкой (14,7%). Об этом свидетельствует статистически значимое различие между группами по данному генотипу *432GG* ($\chi^2=5,42$; $p=0,02$; OR=2,37, 95% CI=1,13-4,96) (табл.2).

Выводы. В результате проведенного исследования выявлено статистически значимое различие в частоте аллелей полиморфизма

Val432Leu гена *CYP1B1* и в частоте генотипа *432 GG* между больными ДПП и популяционным контролем ($\chi^2=3,77$; $p=0,05$; OR=1,56, 95%CI=0,99-2,46) и ($\chi^2 =5,42$; $p=0,02$; OR=2,37, 95%CI=1,13-4,96) соответственно. Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфизма *G590A* гена *NAT2* в группах больных ДМЖП, ДПП и здоровых не обнаружил статистически значимых различий.

Полиморфизм	Генотипы	Частоты генотипов			χ^2 (p) ДМЖП	χ^2 (p) ДПП
		Больные ДМЖП, n=100	Больные ДПП, n=45	Здоровые, n=232		
<i>Val432Leu</i> и <i>CYP1B1</i>	<i>432AA</i>	39 (39,0)	13 (28,9)	85 (36,6)	0,17 (0,68)	0,99 (0,32)
	<i>432AG</i>	49 (49,0)	19 (42,2)	113 (48,7)	0,00 (0,96)	0,64 (0,43)
	<i>432GG</i>	12 (12,0)	13 (28,9)	34 (14,7)	0,41 (0,52)	5,42 (0,02)
<i>G590A</i> <i>NAT2</i>	<i>590II</i>	48 (48,0)	19 (42,2)	105 (45,3)	0,13 (0,72)	0,14 (0,71)
	<i>590IG</i>	35 (35,0)	19 (42,2)	100 (43,1)	0,82 (0,37)	0,01 (0,91)
	<i>590GG</i>	17 (17,0)	7 (15,6)	27 (11,6)	0,56 (0,46)	0,54 (0,46)

Таблица 2. Распределение частот генотипов полиморфизмов *Val432Leu* гена *CYP1B1* и *G590A* гена *NAT2* между группами больных ДМЖП, ДПП и здоровых индивидов абс., %.

Список литературы

1. Лазарев К.Ю., Голубцов В.И., Полоников А.В. и соавт. 2010. Анализ структуры и распространенности изолированных врожденных пороков развития системы кровообращения среди новорожденных Краснодарского края (по результатам мониторинга 1998-2009 гг). *Кубанский научный медицинский вестник*, №2 (125), С. 95-100.
2. Полоников А.В., Иванов В.П., Солодилова М.А. 2008. Эколого-токсикогенетическая концепция мультифакторных заболеваний: от понимания этиологии до клинического применения. *Медицинская генетика* №11, С.3-19.

3. Баранов В.С., Асеев М.В., Баранова Е.В. 1999. Гены предрасположенности» и генетический паспорт. *Природа*, №3, С. 17-37.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование*. М. Мир, 480с.

Предварительные результаты клинико-генетических исследований врожденных пороков развития радужки в Российской Федерации

Васильева Т.А., Хлебникова О.В., Тимковская Е.Е., Зинченко Р.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук.

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

Тел.: +7 499 3206090, e-mail: ol3g4u1ha@rambler.ru

Ключевые слова: врожденные пороки развития, ДНК-диагностика, аниридия, колобома.

Pilot Results of Clinical & Genetics Investigation of Iris Congenital Anomalies in Russian Federation

Vasilyeva T.A., Khlebnikova O.V., Zinchenko R.A.

Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences

Moskvorechie str. 1, Moscow 115478, Russian Federation

Phone.: +7 499 320-6090, e-mail: ol3g4u1ha@rambler.ru

Введение. Большинство врожденных пороков развития (ВПР) органа зрения приводят к значительному снижению остроты зрения, а их наличие является одной из основных причин инвалидности в детском возрасте. В результате проведения комплексных клинико-генетических исследований в популяциях Российской Федерации, проводимых Медико-генетическим научным центром, установлено, что отягощенность менделирующими формами этой патологии составляет не менее 2,7 человек на 10 000 населения [1]. Доля моногенных врожденных пороков развития (ВПР) органа зрения в изолированной наследственной патологии глаз в различных популяциях Российской

Федерации составляет от 14 до 55% случаев (Рис. 1). В настоящее время известны 39 нозологических форм и 69 генетических вариантов моногенных ВПР органа зрения [2].

В связи с отсутствием эффективной хирургической и терапевтической коррекции этой патологии возрастает роль профилактических мероприятий, направленных на предотвращение появления повторных случаев заболевания в отягощенных семьях, основой которых является медико-генетическое консультирование. Однако, несмотря на современные достижения в области молекулярной генетики, позволившие уточнить этиологию большого числа изолированных моногенных вариантов ВПР органа зрения, врачи-офтальмологи и педиатры недостаточно осведомлены о доле моногенных ВПР в структуре врожденных аномалий глаза.

Существует ошибочное мнение о том, что большинство форм изолированных ВПР глаза обусловлены внутриутробным инфицированием плода или воздействием на эмбрион тератогенных факторов. Между тем известно, что не менее 25% всех изолированных ВПР органа зрения имеют моногенную этиологию (Рис.1). Следует отметить, что почти все клинико-генетические формы ВПР радужки имеют аутосомно-доминантный тип наследования и 50% риск повторения патологии в отягощенных семьях.

Значительная распространенность наследственных заболеваний органа зрения и их тяжелое течение, приводящее к ранней инвалидности, обуславливает высокую социальную значимость проведения этиологической ДНК-диагностики. Клинически к изолированным моногенным ВПР радужки относят аниридию, колобому, гетерохромию радужки и эктопию зрачка, составляющие этио-патогенетически разнородную группу [3]. Изолированная колобома радужки представляет собой полный или частичный дефект радужки в области дилатора и/или сфинктера, чаще всего на 6 часах. Клиническая диагностика аниридии возможна уже в роддоме педиатрами или акушерами-гинекологами, так как представляет собой полное отсутствие радужки, характеризуется светобоязнью, нистагмом и низкой остротой зрения. Появление аниридии более чем в 90% случаев определяют мутации гена PAX6.

При колобомах радужки отмечается значительная сложность выбора гена-кандидата. Возникновение колобомы радужки является результатом неполного закрытия зародышевой

щели глазного яблока, которое регулируется множеством генов, сложно взаимодействующих между собой. И мутации в каждом из них могли бы приводить возникновению колобомы. К настоящему времени активно изучаются несколько десятков генов, играющих ключевую роль в эмбриогенезе глаза, среди них *PAX6*, *MAF1*, *CHX10*, *GDF6*, *MAF1*, *SHH*, продукты этих генов являются регуляторными молекулами, контролирующими рост и дифференцировку структур глазного яблока. Предполагается, что мутации в данных генах приводят к фенотипу колобомы радужки. Так, в США и Великобритании, при семейном анализе сцепления при колобомах выявлены мутации в генах *MAF1*, *SHH* [4, 5]. Ген ростового фактора *GDF6* участвует в процессах дифференцировки тканей нервной системы, глаза, костей. В Мексике при обследовании 50 пациентов с колобомой радужки у четверых из них (8 %) выявлены мутации гена *GDF6* [6]. Мутации в гене *PAX6* при колобомах радужки были обнаружены в ряде исследований, предпринятых в США, Японии и Шотландии [7, 8].

Цель исследования. Изучить спектр мутаций генов-кандидатов в популяции РФ у пациентов с моногенными ВПР радужки для дальнейшей разработки протокола молекулярно-диагностических исследований.

Материалы и методы. Нами проведены комплексные клинические и молекулярно-генетические исследования 19 пациентов с типичной клинической картиной изолированной аниридии и колобомы радужки. ДНК-диагностика ВПР радужки проведена в РФ впервые.

Пациентам с аниридией (4 человека) и колобомой (15 человек), проживающим в России, выполнено полное стандартное офтальмологическое обследование. Пациентам с колобомой радужки проведено ДНК-исследование методом секвенирования последовательности кодирующих экзонов и фланкирующих частей интронных областей генов *PAX6*, *SHH*, *GDF6* и *MAF1*. Четырем пациентам с аниридией проведена ДНК-диагностика методом прямого секвенирования последовательности кодирующих экзонов гена *PAX6*.

Результаты. В результате проведенных исследований у пациентов с изолированными колобомами радужки не обнаружены точечные мутации или небольшие делеции и инсерции в кодирующих областях генов *PAX6*, *SHH*, *GDF6* и *MAF1*, однако скрининг на мутации не охватывал регуляторных областей, исследование не включало анализ количества копий гена. Кроме

того, в ряде работ были получены сходные результаты. Так в Корее среди обследованных 23 больных с колобомами радужки при анализе генов *GDF6*, *PAX6* *SHH* мутации не были выявлены [9]. Поиску мутаций при колобомах радужки в гене *PAX6* было посвящено множество исследований, однако в большинстве случаев мутаций не были выявлены [10-13].

У двоих пациентов со спорадическими изолированными аниридиями найдены мутации в гене *PAX6*. В первом случае найденное изменение – нонсенс мутация R103X (p.Arg103Ter), упоминается в базе данных мутаций человека HGMD, впервые была описана в 1994 году. [14] Во втором - обнаружена миссенс мутация Q47R (p.Gln47Arg), приводящая к замене аминокислоты. Мутация Q47R в гене *PAX6* тоже была описана ранее [15].

Pax6 играет критическую роль в эмбриональном развитии органов зрения обоняния, поджелудочной железы и центральной нервной системы, является ключевым регулятором развития данных структур. Данный транскрипционный фактор осуществляет свою регуляторную функцию посредством узнавания ДНК генов-мишеней и связывания специфических сайтов своего парного домена с промоторными областями регулируемых генов. Позиции R103 и Q47 высоко консервативны в белках *PAX6* у всех известных видов, они приходятся на домен парного бокса, обеспечивающего связывание с консенсусными последовательностями регулируемых генов. Мутация R103X (.0005 ANIRIDIA dbSNP:rs121907914) приводит к образованию в пределах домена парного бокса преждевременного стоп кодона, синтезу короткого нефункционального белка *PAX6*, гапло-недостаточности *PAX6* и, как следствие, фенотипу аниридии.

Другая - Q47R, миссенс мутация, в результате которой происходит замена глутамина на аргинин в положении 47 приводит, по крайней мере, к изменению связывания данного высококонсервативного транскрипционного фактора с промоторными последовательностями регулируемых генов и снижению функции белка. По-видимому, гипоморфный аллель с. 140A>G (p. Q 47>R) значительно уменьшает количество нормально функционирующего транскрипционного фактора *PAX6*, что и является причиной аниридии у данного пациента.

Заключение. Таким образом, при изолированной аниридии нами определены мутации, ранее обнаруженные у пациентов в Шотландии и США [14, 15]. При изолированных колобомах не обнаружены мутации в генах *PAX6*, *SHH*, *GDF6* и

MAFI, ранее описанные у пациентов из Японии, Мексики, США, Канады [4-8]. В связи с известной частотой крупных хромосомных перестроек, захватывающих *PAX6*, и диагностируемых, в основном, при аниридии, планируется дополнить скрининг кодирующей последовательности на небольшие изменения в гене *PAX6* анализом MLPA на крупные делеции [16].

Для изолированных колобом радужки необходимо продолжение исследования с целью поиска локусов, изменения в которых приводят к данной патологии. Планируется провести анализ сцепления в имеющихся семейных случаях.

Следует еще раз отметить, что отсутствие современного дифференцированного этиопатогенетического подхода к ранней диагностике, профилактике, диспансеризации и определению тактики лечения патологии органа зрения приводит к увеличению количества инвалидов в популяции Российской Федерации.

Всем пациентам с выявленными мутациями предложена пренатальная диагностика плода. Такой подход должен привести к значительному снижению отягощенности популяции Российской Федерации ВПР радужки.

Работа выполнена при частичном финансировании РФФИ (11-04-00012, 12-04-00122, 13-04-10033к) и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 - 2013 годы, соглашение 8065.

Список литературы

1. Кадышев В.В., Зинченко Р.А., Хлебникова О.В. и соавт. 2011. Генетико-эпидемиологические особенности распространения изолированной наследственной патологии органа зрения среди населения Кировской области. *Медицинская генетика*, Т. 10, № 3 (105), С.23-33.
2. Хлебникова О.В., Бессонова Л.А., Кадышев В.В. и соавт. 2011. Медико-генетическое изучение населения Республики Башкортостан. Сообщение IX. Разнообразие спектра и отягощенность наследственной патологией органа зрения в 8 районах. *Медицинская генетика*, Том 10, №3 (105), С.43-48.
3. McKusick V.A. Online Mendelian inheritance in man. 2010. *Catalogs of Human Genes and Genetic Disorders*. Baltimore, London, John Hopkins, Univ. press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>

4. Schimmenti L. A., de la Cruz J., Lewis R.A, et al. 2003. Novel mutation in Sonic hedgehog in non-syndromic colobomatous microphthalmia. *Amer. J. Med. Genet.*, V. 116A, P. 215-221.
5. Jamieson R.V., Perveen R., Kerr B., et al. 2002. Domain disruption and mutation of the bZIP transcription factor, MAF, associated with cataract, ocular anterior segment dysgenesis and coloboma. *Hum. Mol. Genet.*, V. 11(1), P. 33-42.
6. Gonzalez-Rodriguez J., Pelcastre E.L., Tovilla-Canales J.L., et al. 2010. Mutational screening of CHX10, GDF6, OTX2, RAX and SOX2 genes in 50 unrelated microphthalmia-anophthalmia-coloboma (MAC) spectrum cases. *Br. J. Ophthalmol.* V. 94, P. 1100-1104.
7. Asai-Coakwell M., French C.R., Berry K.M., et al. 2007. GDF6, a novel locus for a spectrum of ocular developmental anomalies. *Amer. J. Hum. Genet.* V. 80, P. 306-315.
8. Azuma N., Yamaguchi Y., Handa H., et al. 2003. Mutations of the PAX6 gene detected in patients with a variety of optic-nerve malformations. *Amer. J. Hum. Genet.* V. 72, P. 1565-1570.
9. Zhang X., Li S., Xiao X., et al. 2009. [Mutational screening of 10 genes in Chinese patients with microphthalmia and/or coloboma.](#) *Mol. Vis.*, V.15, P. 2911-2918.
10. Morrison D., FitzPatrick D., Hanson I., et al. 2002. National study of microphthalmia, anophthalmia, and coloboma (MAC) in Scotland: investigation of genetic aetiology. *J. Med. Genet.* V. 39, 16-22.
11. Kumar K., Tanwar M., Naithani P., et al. 2011. PAX6 gene analysis in irido-fundal coloboma. *Mol. Vis.* V. 17, P. 1414-1419.
12. Zhang X., Tong Y., Xu W., et al. 2011. Two novel mutations of the PAX6 gene causing different phenotype in a cohort of Chinese patients. *Eye (Lond)*, V. 25, P. 1581-1589.
13. Gregory-Evans C.Y., Williams M.J., Halford S., Gregory-Evans K. 2004. Ocular coloboma: a reassessment in the age of molecular neuroscience. *J. Med. Genet.* V. 41, P. 881-891.
14. Glaser T., Jeepe L., Edwards J.S., et al. 1994. PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nature Genet.* V. 7, P. 463 – 471.
15. Prosser J., van Heyningen V. 1998. PAX6 mutations reviewed. *Hum. Mutat.*, V. 11, P. 93-108.
16. Bayrakli F., Guney I., Bayri Y., et al. 2009. A novel heterozygous deletion within the 3' region of the PAX6 gene

causing isolated aniridia in a large family group. *J. Clin. Neurosci.* V. 16, P. 1610-1614.

Анализ генетического полиморфизма в прогнозировании потребности в реанимационной помощи у новорожденных

Горовенко Н.Г.¹, Кирьяченко С.П.², Россоха З.И.²,

¹ *Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика МЗ Украины, Украина*

² *ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН», Украина*

04114, г. Киев, ул. Вышгородская 68, Украина

Тел.: (044)2054813, e-mail: medgen2006@mail.ru

Ключевые слова: генетический полиморфизм, новорожденные, реанимационная помощь

Analysis of genetic polymorphism in prediction of need in intensive care for newborns

Gorovenko N.G.¹, Kiryachenko S.P.^{2*}, Rossokha Z.I.²

¹ *P.L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education named after P.L. Shupyk of Public Health Ministry of Ukraine, Ukraine*

² *State Institution of Genetic and Regenerative Medicine National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Ukraine*

68, Vyshgorods'ka str. Kyiv, Ukraine, 04114

Tel: +380442054813, e-mail: medgen2006@mail.ru

Keywords: genetic polymorphism, newborns, intensive care

Введение. Последнее десятилетие характеризовалось бурным развитием молекулярной медицины, основные векторы которой были направлены на поиск генетической компоненты, в том числе и в развитии критических состояний у новорожденных [1-3]. Недостаточное внимание было уделено исследованию роли генетического полиморфизма в течении критических состояний и определении потребности в реанимационной поддержке [4]. Изучение влияния генетической детерминанты на потребность в медицинских вмешательствах у новорожденных может служить

основой для разработки индивидуализированного подхода к выбору стратегии лечения, способствовать снижению частоты развития осложнений за счет их своевременной профилактики. Цель исследования - проанализировать влияние генетического полиморфизма на потребность в реанимационной помощи у новорожденных с критическими состояниями.

Материал и методы. Обследованы 235 новорожденных с клиническими проявлениями перинатальной асфиксии с различной неврологической симптоматикой, респираторным дистресс синдромом (РДС), воспалительными заболеваниями легочной ткани, неонатальной желтухой и органной недостаточностью различной степени выраженности (основная группа) и 110 новорожденных не имевших клинических симптомов неонатальных заболеваний (контроль). Молекулярно-генетические исследования проводились стандартными методами. Для определения полиморфизма I/D гена ACE применялась альбуминспецифичная полимеразная цепная реакция (ПЦР). При исследовании полиморфных вариантов A1166C, C677T, G308A генов AT2R1, MTHFR, TNF- α проводили, после ПЦР, анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Продукты амплификации фрагментов ДНК генов AT2R1, MTHFR, TNF- α подлежали гидролитическому расщеплению с помощью эндонуклеаз рестрикции BstDeI, HinfI и NcoI, соответственно. Продукты ПДРФ анализа учитывали, проводя электрофорез полученных фрагментов в 2% агарозном геле. Результаты молекулярно-генетических исследований подлежали статистической обработке с использованием программ SPSS 17.0. и мультифакторной пространственной редукции (Multifactorial Dimensionality Reduction) [5].

Результаты. Индивидуальный анализ клинической картины обследованных новорожденных показал, что носители генотипов DD (30,40 \pm 2,88) и ID (30,62 \pm 3,76) достоверно чаще нуждались в длительной госпитализации в отличие от носителей генотипа II (19,06 \pm 3,23). При проведении исследования влияния полиморфизма I/D гена ACE на потребность в реанимационной помощи наблюдалось достоверная более высокая частота носителей генотипа DD (33,33%) и достоверно более низкая частота носителей генотипа II (13,73%) среди больных новорожденных, которые нуждались в реанимационной поддержке, в отличие от частоты носителей этих генотипов среди больных новорожденных, которые лечились в специализированных

неонатальных отделениях ($\chi^2=7,47$, $p<0,05$, $OR=3,56$ 95% $CI:1,39-9,13$ и $\chi^2=5,39$, $p<0,05$, $OR=0,13$ 95% $CI:0,13-0,86$ соответственно). Частота носителей генотипа *DD* была достоверно повышена среди новорожденных, которые нуждались в искусственной вентиляции легких (ИВЛ), в отличие от больных новорожденных с этим генотипом, у которых не применялась ИВЛ (35,48% против 8,14%; $\chi^2=13,09$, $p<0,05$, $OR=6,21$, 95% $CI: 2,14-18,04$). Частоты генотипов *ID* и *II* статистически достоверно не различались в зависимости от потребности в ИВЛ.

В связи с достоверной ассоциацией генотипа *DD* с потребностью в ИВЛ у больных новорожденных, был проведен анализ влияния полиморфных вариантов гена *ACE* на длительность ИВЛ. У больных детей с генотипом *DD* применение ИВЛ было в два раза более длительным ($16,63\pm 2,87$) в сравнении с больными с генотипом *II* ($9,50\pm 2,23$, $p<0,05$). Итак, как видно из полученных нами результатов, полиморфизм *ID* гена *ACE* определяет продолжительность госпитализации, необходимость применения реанимационной, дыхательной поддержки и ее продолжительность у больных новорожденных.

Мы проанализировали влияние полиморфизма *A1166C* гена *AT2R1* на продолжительность госпитализации, необходимость реанимационной и респираторной поддержки. Достоверных различий в распространении исследуемых нами полиморфных вариантов гена *AT2R1* обнаружено не было.

Носители генотипа *308AA* по гену *TNF- α* достоверно чаще нуждались в длительной госпитализации ($43,60\pm 8,96$), в отличие от носителей генотипа *308GG* ($25,51\pm 2,20$). Среди тех, кто нуждался в ИВЛ, была достоверно повышена частота генотипа *308AA* по сравнению с частотой этого генотипа у больных новорожденных, которым не применяли ИВЛ (12,90% и 2,33%, соответственно, $\chi^2=5,24$, $p<0,05$, $OR=6,22$, 95% $CI:1,08-35,87$).

Обратив внимание на ассоциацию генотипа *308AA* гена *TNF- α* с потребностью в ИВЛ у больных новорожденных, мы провели анализ влияния полиморфных вариантов гена *TNF- α* на продолжительность ИВЛ. У носителей генотипа *308AA* продолжительность ИВЛ была почти вдвое больше ($19,5\pm 3,93$) по сравнению с носителями генотипа *308GG* ($8,25\pm 1,72$), эти показатели достоверно различались между собой ($p<0,05$). У носителей генотипа *308AG* продолжительность ИВЛ была меньше по сравнению с носителями генотипа *308AA*, но эти показатели достоверно не различались. Носители генотипов *677TT* и

677CT по гену *MTHFR* чаще нуждались в длительной госпитализации (31,24±4,29 и 30,91±3,46, соответственно), в отличие от носителей генотипа *CC* (20,74±2,84). Больные новорожденные с генотипом *677CT* и генотипом *677TT* достоверно чаще нуждались в реанимационных мероприятиях в отличие от больных детей), лечившихся только в специализированных неонатальных отделениях ($\chi^2=6,19$ OR=2,80 95%CI:1,23-6,39 и $\chi^2=8,15$ OR=4,54 95%CI:1,51-13,64). Частота носителей генотипа *677CC* была достоверно повышенной среди больных новорожденных, лечившихся в специализированных неонатальных отделениях, по сравнению с частотой носителей этого генотипа среди больных, лечившихся в реанимационном отделении ($\chi^2=19,30$ OR=0,18 95%CI: 0,08-0,39). Новорожденные, которым была оказана специализированная реанимационная помощь, требовали применения ИВЛ.

Среди тех, кто нуждался в ИВЛ, была достоверно повышена частота носителей генотипа *677TT*, по сравнению с частотой носителей этого генотипа среди больных новорожденных, которым не применялась ИВЛ (29,03% против 5,81%, соответственно; $\chi^2=10,66$, $p<0,05$, OR=6,63, 95%CI:2,02-21,79). Частота генотипа *677CC* была достоверно повышенной у детей реанимационного отделения, которым не требовалось применение ИВЛ ($\chi^2=12,29$, $p<0,05$, OR=0,20 95%CI:0,08-0,52). В связи с вероятностью ассоциации генотипа *677TT* с потребностью в ИВЛ, у больных новорожденных проведен анализ влияния полиморфных вариантов гена *MTHFR* на продолжительность ИВЛ. У больных новорожденных с генотипом *677TT* респираторная поддержка была достоверно продолжительнее (16,58±1,02) по сравнению с больными с генотипом *677CC* (11,00±1,01). Полученные результаты показывают, что полиморфизм *C677T* гена *MTHFR* влияет на потребность в реанимационной помощи, определяет необходимость применения респираторной поддержки и позволяет оценить ее вероятную продолжительность у новорожденных.

На следующем этапе был использован метод мультифакторной пространственной редукции (MDR) для построения модели межгенных взаимодействия. Наиболее значимой была модель, которая включала четыре гена - *ACE*, *TNF- α* , *AT2R1*, *MTHFR*, ее прогностическая ценность составила 69,96 ($p<0,05$). Построенная нами модель позволила оценить влияние межгенных взаимодействия на потребность в респираторной поддержке. Синергичное взаимодействие было выявлено для генов

MTHFR и *ACE*, энтропия которых составляла 10,32% и 8,72% и возрастала при их совокупном действии на 1,78%. Необходимость реанимационной помощи высоко достоверно зависела от генов *ACE* и *MTHFR*, а построенная с их учетом двухкомпонентную модель потребности в реанимационной поддержке имела прогностическую ценность 60,95%.

Заключение: Анализ полиморфных вариантов генов *ACE*, *AT2R1*, *TNF- α* , *MTHFR* является важным для обоснования риска развития критических состояний и оценки потребности новорожденных в медицинских вмешательствах.

Список литературы

1. Collins F.S., McKusick V.A. 2001. Implication of Human Genome Project for Medical Science. *JAMA.*, V. 285, № 5, P. 540-544.
2. Peltonen L.A., McKusick V.A. 2002. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Genomics and Medicine*, V.2, P. 3-12.
3. Баранов В.С. 2009. *Генетический паспорт – основа индивидуальной и превентивной медицины*. СПб.: Изд-во Н-Л, 528с.
4. Harding D. 2007. Impact of common genetic variation on neonatal disease and outcome. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, . 92, P. 408-413.
5. Hua He., William S.O., Brott M.J. 2009. Power of multifactor dimensionality reduction and penalized logistic regression for detecting gene-gene interaction in a case-control study. *BMC Medical Genetics*, V.10, P. 127-136.

Сочетание хромосомного и генного полиморфизма с дефицитом трансаминазы гаммааминомасляной кислоты как эпигенетическая болезнь

Гречанина Е.Я.* , Гречанина Ю.Б. , Здыбская Е.П. , Молодан Л.В.

Украинский институт клинической генетики ХНМУ

*пр. Правды, 13, Харьков, Украина, 61022

Тел.: 057-700-32-47, e-mail: mgc@ukr.net

Резюме. В работе представлены наблюдения сочетанного клинически значимого фенотипического проявления хромосомного и генного полиморфизма, ассоциированного с дефицитом

трансаминазы гаммааминомасляной кислоты, которые оценены с позиций нарушенного эпигенетического статуса и основного модификатора генома – метилирования.

Ключевые слова: хромосомный полиморфизм, генный полиморфизм, дефицит трансаминазы гаммааминомасляной кислоты, эпигенетическая болезнь.

A combination of chromosomal and gene polymorphism with a deficiency of transaminase γ -aminobutyric acid as an epigenetic disease

Grechanina E.Y. *, *Grechanina U.B.*¹, *Zdubskaya E.P.* , *Molodan L.V.*
Ukrainian Institute of Clinical Genetics KhNMU,

*Pravdu av., 13, Kharkov, Ukraine, 61022

Tel.: 057-700-32-47, e-mail: mgc@ukr.net

Summary. We present observations of combined clinically relevant phenotypic expression of chromosomal and gene polymorphism associated with a deficiency of transaminase γ -aminobutyric acid, which are rated in terms of impaired epigenetic status and the main modifier of the genome - methylation.

Key words: chromosomal polymorphism, gene polymorphism, deficiency of transaminase γ -aminobutyric acid, epigenetic disease.

Введение. Последние два десятилетия характеризуются, по мнению Huda Y. Zoghbi and Arthur Beaudet, беспрецедентным успехом в идентификации генетических основ многих болезней человека [1, 2, 3, 4, 5]. Изучение взаимоотношений генотипа и фенотипа, по мнению авторов, бросает вызов клиницистам и исследователям, поскольку некоторые наблюдения не так просто поддаются объяснению. Мы разделяем эту точку зрения уважаемых коллег, поскольку каждый день решаем сложнейшие диагностические задачи, консультируя более 9000 впервые обратившихся больных ежегодно. Накопленный опыт позволяет высказать предположение, что в ближайшее время мутации, которые изменяют эпигенотип, все больше и больше будут признаваться мутационными механизмами, этиологически связанными с различной патологией. Важность изучения эпигеномов особенно возрастает при обнаружении своеобразного дуализма: известно, что такие заболевания как синдром Ангельмана, Беквита-Видеманна, Прадера-Вилли, Сильвера-

Рассела могут быть вызваны и геномными мутациями и мутациями, которые влияют на эпигенотип, а значит, являются унаследованными или возникшими de novo [6, 7, 8]. Все больше увеличивается число «синдромов – перебежчиков», которые мы обнаруживаем то в одной, то в другой классификации, что отражает поиск исследователями этиологии. Заболевания, ассоциированные с нарушением эпигенетического статуса, классифицированы в отдельную группу болезней. Появившаяся возможность молекулярно-генетических исследований в сочетании с глубоким анализом фенотипических данных больных позволяет приближаться, с одной стороны, к персонализированной диагностике, а с другой – выдвигает новые проблемы уточняющей диагностики. Среди них - оценка клинической значимости полученных результатов исследований.

Цель исследования. Изучить особенности фенотипов больных, у которых в процессе уточняющей диагностики выявлены сочетания хромосомного и генного полиморфизма и определенной формы наследственной болезни обмена.

Материалы и методы. Среди обследованных 443 пациентов с редкими наследственными заболеваниями обнаружены двое с нарушением ГАВА метаболизма, ассоциированного с хромосомным и генным полиморфизмом. Используются современные методы: соматогенетическое исследование с синдромологическим анализом, цитогенетические и молекулярно-генетические методы.

Результаты исследования. Анализ истории жизни, развития заболевания и фенотипическая оценка двух больных иллюстрирует сложности уточняющей диагностики такой патологии. Пациент Г., 2-х лет, поступил с жалобами на приступы отключения сознания полиморфного характера в виде замираний, судорожных приступов клонического и тонического характера. Приступы сопровождаются отведением глаз вправо и вверх, поворотом головы вправо. У ребенка отмечен регресс приобретенных навыков, на момент обращения не сидит, голову не держит.

Анамнез заболевания: В 3-х недельном возрасте впервые отмечено повышение температуры до 37,0-37,3, заподозрена кишечная инфекция, выявлена *E. coli* непатогенная, *st. aureus*. Проведен курс антибиотикотерапии. В 3,5 месяца впервые появились судорожные эквиваленты. При нейросонографии –

эхоструктуры без изменений. При пальпации большого родничка отмечалась повышенная пульсация.

При ЭЭГ – патологии не выявлено. Проведена ЯМРТ головного мозга: признаки незавершенной миелинизации перивентрикулярной зоны белого вещества, характерные для данной возрастной группы. Назначены: сомазина, мексидол, глюферал, затем глюферал был заменен на конвулекс. Через 2 недели состояние стало ухудшаться, приступы участились, стали появляться каждые 3 дня. В 7 месяцев невропатолог диагностировал перинатальную энцефалопатию, задержку психомоторного развития, дистонический тип приступов, который диагностировал атрофию лобно-височнотеменной зоны коры головного мозга, перивентрикулярную лейкоэнцефалопатию (по данным ЯМРТ) и предположил наследственную сцепленную с полом рецессивную прогрессирующую дегенерацию головного мозга с корково-экстрапирамидными нарушениями, серийными абсансами. Были назначены: бетропил, сермион, депакин, однако ребенок эти препараты не получал, оставался на прежней терапии. Состояние ребенка постоянно ухудшалось, эффекта от проводимой терапии не отмечалось. Мать отметила регресс приобретенных навыков. Ребенок перестал сидеть, опираться на ножки, держать голову, увеличилась гипотония и частота эпилептических приступов, они стали носить полиморфный характер. С младенческого возраста отмечена патологическая прибавка веса и макросомия. Также при обследовании было выявлено увеличение тимуса I степени. Мать отмечает повышенную потливость ребенка, запоры.

Анамнез жизни: ребенок родился от 6 беременности, от 3 преждевременных родов. Беременность протекала на фоне легкого токсикоза в первые 3 месяца. В 3-4 месяца мать перенесла грипп, в 6 месяцев - отит, принимала антибиотики. С 4-го до 6-го месяцев беременности отмечено снижение артериального давления до 90/50 мм рт ст, с 6-и до 8-и месяца беременности отмечено повышение артериального давления до 130/80-90 мм рт ст. и снижение уровня гемоглобина до 102 г/л. С раннего возраста отмечена избыточная прибавка веса и роста. Из перенесенных заболеваний: в 6 месяцев - воспаление легких, грипп, ОРЗ. На грудном вскармливании до 2-х месяцев («слабо сосал»), потом на искусственном вскармливании получал «Хуману».

В фенотипе: макросомия, широкое лицо, голубые склеры, гипертелоризм сосков, короткая шея, избыточная масса тела, избыточные кожные складки на конечностях, мраморность кожи,

выраженная мышечная гипотония, которая сменяется гипертонусом на фоне судорог.

Родословная: отягощена сердечно-сосудистой, мультифакторной патологией, патологией желудочно-кишечного тракта, репродуктивными потерями. Брак кровнородственный.

Сибс пробанда родился от 4-ой беременности, которая протекала на фоне варикозного расширения вен таза, легкого раннего токсикоза. На сроке 32 недели мать перенесла грипп. Роды физиологические на сроке 39 недель. Тугое обвитие пуповины вокруг шеи. Родился в гипоксии. Вскармливался через зонд 3 дня, на грудном вскармливании до 2-х месяцев, потом - на искусственном (Хумана). В 2,5 месяца проведены прививки против полиомиелита, гепатита В. После прививки заболел гриппом, получал антибиотикотерапию, состояние ухудшалось, при рентгенографии диагностировано двухстороннее воспаление легких. В этот период появились эпилептические приступы. Со слов мамы, был отмечен регресс приобретенных навыков. Эпилептические приступы - аналогичные приступам у пробанда. У сибса пробанда отмечались рецидивирующие бронхолегочные и кишечные инфекции. С 4,5 месяцев до 6-и месяцев находился в реанимации с диагнозом сепсис. Кроме того, у ребенка был увеличен тимус III степени. Также отмечалось повышенное потоотделение, запоры, избыточная прибавка массы тела и роста (макросомия). На КТ головного мозга выявлена атрофия лобно-височных долей коры головного мозга, умеренная гидроцефалия. В 1 год 1 месяц установлен диагноз: окулогирные кризы в результате дистонических атак, высокое поражение ствола мозга, симптом децеребрационной ригидности (декортикация). Клинические проявления прогрессировали, и в 3 года ребенок умер.

Биохимический анализ крови – триглицериды- 1,18 ммоль/л (при норме 0,34-1,13), общий белок – 75,13 г/л (при норме 46-70), остальные показатели в пределах референтных значений. Исследованы полиморфизмы в генах системы фолатного цикла: в генах MTHFR C677T и MTRR A66G обнаружены полиморфизмы в гетерозиготном состоянии. Анализ суточной мочи - объем мочи- 0.200 л (при норме 0,6-0,9л), креатинин – 0,17 г/сут (при норме 0,27-0,415), оксипролин- 16,0 мг/сут (при норме 21,1-51,3). Кариологическое исследование: кариотип- 46, XY, 14 ps+ (G-, C-окр.), 1% хромосомной нестабильности. Газовая хроматография масс-спектрометрия мочи: 2-hydroxybutyric 0.35↑ mmol/mol crea(при норме n.d.), 5-oxoproline 50.54 mmol/mol crea ↑(при норме

0-37.05), Azelaic 7.33 mmol/mol crea ↑(при норме 0-4), 3-hydroxyisovaleric acid 21.6 U/mol crea↑ (при норме 0-13.11), 2-ethylhydracrylic acid ↑ 1.8 U/mol crea (при норме 0-1.2), ethylmalonic acid 19.2 U/mol crea ↑(при норме 0-18.49), 5-hydroxy-n-valeric acid ↑4.8 U/mol crea (при норме n.d.), 4-hydroxycyclohexylcarboxyli 5.6 U/mol crea ↑ (при норме n.d.), 4-hydroxybenzoic acid 666.6 U/mol crea ↑↑ (при норме 0-68.44), vanillic acid 79.4 U/mol crea ↑(при норме n.d.) gentisic acid 296 U/mol crea ↑↑ (при норме 0-199.1), 3-methoxy-4-hydroxyphenil-3-hydroxypropionic acid 91.6 U/mol crea ↑ (при норме 0-37.37), salicuric acid 304.8 U/mol crea ↑↑ (при норме n.d.), p-hydroxyhippuric acid 853.2 U/mol crea ↑ (при норме 0-405.21). Выявленные нарушения свидетельствовали о нарушении обмена глицина, бензойной кислоты и ацилглицинов. Предполагается, что нарушены те этапы обмена этих веществ, которые протекают в матриксе митохондрий. Также выявлены вещества экзогенной природы. Витамин В12 крови – 887,8 пг/мл (при норме 191-663), фолиевая кислота крови >20 нг/мл (при норме 4,6-18,7), гомоцистеин крови – 4,7 мкмоль/л (при норме до 3,5). Комплексный анализ аминокислот и ацилкарнитинов в крови: С0 (свободный карнитин) – 53,669 мкмоль/л (при норме 15,0-50), остальные показатели в пределах референтных значений. МРТ головного и спинного мозга: МР-признаки расширения наружных ликворных пространств. УЗИ внутренних органов: нерезкое повышение эхоплотности печени, периваскулярная инфильтрация. Неоднородная структура поджелудочной железы, признаки ДЖВП. УЗИ почек: деформация почечных синусов. Умеренный уростаз. Метаболические изменения.

В статусе на момент осмотра имеет место регресс приобретенных навыков, грубая задержка психомоторного развития, частые полиморфные эпилептические приступы (абсансы, моторные джексоновские и тонические приступы с акцентом в правых конечностях), мышечная дистония с преобладанием гипотонии, двусторонняя пирамидная симптоматика.

Учитывая наличие у обоих sibсов частых полиморфных эпилептических приступов, грубую задержку психомоторного развития, опережение роста-весовых показателей; анамнез, динамику развития заболевания (регресс приобретенных навыков, нарастание частоты эпилептических приступов), данные клинико-генеалогического анализа (кровнородственный брак), особенности фенотипа (макросомию, мраморность кожи, гипотонию, черепно-лицевые дизморфии), соматического и неврологического статусов (регресс

приобретенных навыков, грубую задержку психомоторного развития, частые полиморфные эпилептические приступы - абсансы, моторные джексоновские и тонические приступы с акцентом в правых конечностях - мышечную дистонию с преобладанием гипотонии, двустороннюю пирамидную симптоматику), дополнительных методов исследования (кариотип - 46,XY, 14ps+, 1% хромосомной нестабильности; полиморфные варианты в генах системы фолатного цикла - в генах MTHFR C677T и MTRR A66G – в гетерозиготном состоянии; повышение уровней ваниловой, гомованиловой кислот, метаболитов глицина, можно говорить, что в патогенез заболевания детей вовлечены три звена. У детей выявлены особенности генетической конституции (генный и хромосомный полиморфизм), сочетание которых свидетельствует о нарушении метилирования как патогенетической основы развившегося метаболического нарушения – обмена нейротрансмиттеров (GABA метаболизма). В пользу нарушения GABA метаболизма свидетельствуют эпилептическая энцефалопатия, регресс приобретенных навыков, макросомия и характер выявленных метаболических нарушений. Триединство указанных звеньев сформировало клиническую картину заболевания, которое можно классифицировать, как эпигенетическое. Коррекция проводится в соответствии с тремя вовлеченными звеньями патогенеза: лечение фолатного дефицита, симптоматическое лечение изменений, вызванных хромосомным полиморфизмом и патогенетическая коррекция GABA метаболизма, реабилитационные мероприятия. Состояние ребенка удалось стабилизировать, он находится под диспансерным наблюдением.

Закключение. Полученные данные позволяют считать, что сочетание различных факторов – внешнесредовых, генетических, эпигенетических в настоящее время определяют фенотипические проявления болезней, которые характеризуются выраженным клиническим полиморфизмом, характерным для феномена синтропии с сохранением индивидуальности всех участников «конгломератов болезней». Многофакторность этиологии современных заболеваний требует в равной степени глубокого клинического изучения и использования, современных молекулярно-генетических и биохимических методов в процессе уточняющей диагностики и последующей многопараметрической коррекции. Такое направление представляется нам единственным путем к персонализированной медицине.

Список литературы

1. Alarcon J.M., Malleret G., Touzani K., et al. 2004. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP +/ ~ mice: A model for the cognitive deficit in Rubinstein – Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron*, Vol. 42, P. 947-959.
2. Boerkoel C.E., Takashina H., John J., et al. 2002. Mutant chromatin remodeling protein SMAR-CAL1 causes Schimke immuno-osseous dysplasia. *Nat. Genet.*, Vol. 30, P. 215-220.
3. Brattstrom L., Wilcken D.E., Ohrvik J., Brudin L. 1998. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not vascular disease: The results of a meta-analysis // *Circulation*. 98: 2520-25226.
4. Pericak-Vance M.A. 2003. Identification of MeCP2 mutations in a series of females with autistic disorder. *Pediatr. Neurol.*, Vol. 28, P. 205-211.
5. Chen Z., Karaplis A.C., Ackerman S.L., et.al. 2001. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum. Mol.*, Vol. 10, P. 433-443.
6. Eggermann T., Wollmann H.A., Kuner R., et al. 1997. Molecular studies in 37 Silver – Russell syndrome patients: Frequency and etiology of uniparental disomy. *Hum.Genet.*, Vol. 100, P. 415-419.
7. Ehrlich M., Buchanan K.L., Tsein E., et.al. 2001. DNA methyltransferase 3B mutations linked to the ICF syndrome cause dysregulation of lymphogenesis genes. *Hum. Mol. Genet.* Vol. 10, P. 2917-2931.
8. Jiang Y.H., Armstrong D., Albrecht U., et al. 1998. Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long – term potentiation. *Neuron*, Vol. 21, P. 799-811.

Окислительный стресс в патогенезе психоневрологических расстройств

Дубинина Е.Е., Щедрина Л.В., Ковругина С.В.

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт им. В.М. Бехтерева

192019 Россия, Санкт-Петербург, ул Бехтерева, д.3

Тел.: +7 911 706-2286, e-mail: eedubinina@rambler.ru

Oxidative stress in the pathogenesis of psychoneurological disorders

Dubinina E.E., Schedrina L.V., Kovrugina S.V.

The St. Petersburg Psychoneurological Research Institute named after V.M.Bekhterev

3 Bekhterev str., St. Petersburg, Russian Federation 192019

Tel. +7 911 706-2286, e-mail: eedubinina@rambler.ru

Резюме. В работе представлены обобщенные данные о значимости свободно-радикальных процессов в регуляции функциональной активности клеток в норме и при патологии. Особое внимание уделяется высокой чувствительности нервной ткани к окислительному стрессу. Представлены литературные и собственные данные о роли окислительного стресса в развитии патологических состояний нервной ткани. Окислительный стресс рассматривается в качестве одного из патогенетических звеньев нейро-психических нарушений, таких как деменция Альцгеймера типа, сосудистая деменция, депрессия.

Метаболические процессы в тканях сопровождаются образованием целого ряда активных форм кислорода (АФК), которые обладают высокой реакционной способностью. Действие АФК на функциональную активность клеток в организме многогранно. Оно проявляется в регуляции процессов апоптоза, пролиферации и дифференцировки клеток, клеточной адгезии, способности индуцировать и подавлять экспрессию ряда генов и т.д. [1, 2]. При патологических состояниях интенсивная генерация АФК вызывает окислительную деструкцию белков, липидов, нуклеиновых кислот, углеводов. Системы, участвующие в образовании АФК, и процессы, связанные с окислительной деструкцией биомолекул, можно условно объединить в понятие «прооксидантная система». В организме токсическое действие АФК предотвращается за счет функционирования антиоксидантной защиты (АОЗ), которая

представлена ферментативными и неферментативными компонентами. Действия ферментов-антиоксидантов тесно связаны друг с другом и четко сбалансированы между собой. Состояние окислительного стресса (ОС) сопряжено с усилением процессов свободно-радикального окисления, снижением АОЗ и соответственно интенсивной генерацией АФК, что приводит к окислительной деструкции белков, липидов, нуклеиновых кислот, углеводов [3]. Процессы свободно-радикального окисления, их интенсификация рассматриваются как универсальные и общебиологические механизмы при любом виде патологии. Усиление свободно-радикальных процессов и развитие состояния ОС являются одним из патогенетических звеньев нейропсихических расстройств, воспалительных процессов любого генеза, радиационных поражений, онкозаболеваний, сердечно-сосудистой и бронхолегочной патологии, химических интоксикаций и т. д. Старение организма также протекает на фоне ОС и, соответственно, свободно-радикальные процессы вовлекаются в патофизиологию всех сопутствующих заболеваний, в том числе, нейродегенеративных поражений. Состояние ОС фактически охватывает весь организм, но интенсивность его проявления, определенная специфика изменения отдельных компонентов антиоксидантной (АОС) и прооксидантных систем (ПОС) может быть разной в разных тканях, что обусловлено их структурной организацией, особенностями биохимических процессов и функциональной активностью.

Каждая ткань обладает определенной буферной емкостью АОЗ. Она зависит от состояния АОЗ межклеточной жидкости и самой клетки, ее отдельных компартментов. Некоторые ткани в силу особенностей своей функциональной и метаболической активности обладают повышенной чувствительностью к состоянию ОС, что связано с высокой потенциальной мощностью ПОС и низкой буферной емкостью АОЗ. К таким тканям относятся мозг, сетчатка и легкие. Это обусловлено, как нам представляется, той важной регуляторной функцией, которую выполняют генерируемые АФК и радикальные метаболиты в этих тканях. В мозговой ткани это может быть связано с передачей сигналов возбуждения, возникновения потенциала действия и включения в работу синапсов [2, 4].

Метаболические процессы в мозговой ткани отличаются высокой степенью зависимости от насыщения кислородом. Мозг использует для своих целей 1/5 часть поступающего в организм кислорода и обладает интенсивной скоростью процессов аэробного окисления. Мембраны нервных тканей головного мозга содержат

высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот. В мозговой ткани присутствуют ионы металлов переменной валентности, в частности железа, которые связаны с низкомолекулярными соединениями. В такой «активной форме» они могут включаться в процессы образования АФК. В условиях ОС это может являться дополнительным источником генерации реакционно-способных радикальных продуктов, которые в присутствии металлов переменной валентности могут инициировать перекисное окисление липидов (ПОЛ). В норме ионы железа в своей «активной форме» необходимы для взаимодействия определенных нейротрансмиттеров (серотонин, дофамин) со своими рецепторами, что играет важную роль в процессах обучения, памяти, поведенческих реакциях. Для мозговой ткани характерна высокая скорость метаболизма биогенных аминов, что сопряжено с генерацией АФК. В частности, с активностью моноаминоксидазы, которая катализирует окислительное дезаминирование дофамина, связано образование H_2O_2 . В генерации АФК может активно участвовать микроглия, функционируя подобно макрофагам, что имеет большое функциональное значение для центральной нервной системы (ЦНС), особенно в условиях инфекционного поражения мозговой ткани [4].

Таким образом, клетки нервной ткани обладают потенциально высокой способностью к генерации АФК, что обуславливает высокую чувствительность ЦНС к ОС. Степень выраженности этих изменений зависит от сбалансированности АОЗ и ПОС, от буферной емкости АОЗ нервной ткани. Для мозговой ткани характерна низкая активность отдельных компонентов ферментативной АОЗ, в частности каталазы, которая локализована в микропероксиосомах нейронов. Содержание СОД и глутатионпероксидазы умеренное, но распределение их неравномерное в разных отделах мозга. Гиппокамп и средний мозг считаются наиболее уязвимыми при различных патологических состояниях, включая заболевания, связанные со старением организма, что приводит к нарушению познавательной способности, памяти, моторной функции [5].

Свободно-радикальные процессы, степень их интенсификации являются одним из ведущих патогенетических факторов в развитии многих болезней в старческом возрасте. В литературе активно обсуждается роль ОС в развитии различных нейродегенеративных расстройств, таких как амиотрофический латеральный склероз, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, сосудистая деменция и др. [2, 5, 6]. Особое место в генерации АФК в нервной ткани при ОС занимают нарушения функции системы тканевого дыхания

митохондрий, метаболизм арахидоновой кислоты, катехоламинов и проявление активности ксантиноксидазы.

При состояниях ОС наблюдаются глубокие изменения в метаболизме белков, жиров, нуклеиновых кислот, углеводов, водно-электролитном обмене, которые могут являться причиной тяжелых поражений тканей при ряде патологических состояний. Так, при старении организма, нейропсихических расстройствах, протекающих на фоне ОС, наблюдается нарушение функции глутаматных рецепторов и интенсивное высвобождение глутамата, что приводит к быстрому увеличению цитозольного Ca^{++} и генерации OH^{\cdot} . Фактически, АФК и экзайтотоксические аминокислоты кооперируются в осуществлении нейротоксических повреждений мозга, и белки в этом случае являются особенно чувствительными к окислительной деструкции за счет окисления SH-группировок. Изменения в метаболизме митохондрий и экзайтотоксичность, провоцируемая глутаматом и его аналогами, являются одной из причин гибели нейронов и их некроза [7].

Нарушение сбалансированности действия ферментов-антиоксидантов приводит к снижению буферной емкости ферментативной АОЗ и дополнительному повышению уровня АФК. Параллельно наблюдается истощение неферментативных компонентов АОЗ, которые при нейтрализации радикальных продуктов переходят в неактивное состояние или образуют радикальные продукты разной степени токсичности. Процессы восстановления антирадикальной способности этих соединений снижены.

Нейродегенеративный процесс, одним из патологических звеньев которого является ОС, характеризуется постепенно развивающейся неослабевающей гибелью нейронов без интенсивной тканевой реакции или воспаления. Состояние ОС при деменции по Альцгеймеру типу и сосудистой деменции сопровождается интенсификацией процесса апоптоза нейронов [8].

Результаты наших исследований показали, что при развитии сосудистой деменции и деменции Альцгеймера типа у пожилых людей наблюдаются глубокие структурные изменения со стороны белков и липидов плазмы. Чем более выражена степень деменции, тем ниже уровень Fe^{++} -катализируемой окислительной модификации белков и Fe^{++} -стимулируемого ПОЛ, что может быть сопряжено с нарушением функциональной активности мозговой ткани, в частности, ферментативной и рецепторной. Установлена четкая корреляционная зависимость между степенью выраженности психических расстройств и снижением показателей окислительной деструкции липидов

и белков. Они могут быть использованы в качестве специфических маркеров в клинической практике с целью прогнозирования тяжести течения заболевания [9].

Степень выраженности патологических процессов при старении организма зависит от способности организма поддерживать сбалансированное соотношение между АОС и ПОС, своевременной мобилизации АОЗ и сохранения оптимального соотношения между ферментативными и неферментативными компонентами АОС. Снижение активности ферментов-антиоксидантов приводит к возрастанию роли неферментативных компонентов, что может сопровождаться дополнительным образованием радикальных продуктов.

Нами у больных с деменцией по Альцгеймеру типу и сосудистой деменцией был обнаружен дисбаланс ферментативных и неферментативных компонентов антиоксидантной системы крови. В эритроцитах крови больных людей отмечалось более выраженное снижение активности каталазы по сравнению с пожилыми людьми без психических нарушений, что сопровождается нарушением соотношения между основными ферментами-антиоксидантами — СОД и каталазой и накоплением H_2O_2 в тканях. Параллельно в плазме крови возрастает активность неферментативных компонентов, способных расщеплять перекись водорода, что сопряжено с дополнительной генерацией АФК, особенно в присутствии «активных форм» металлов переменной валентности, концентрация которых может возрастать в условиях гипоксии тканей. У больных с болезнью Альцгеймера зарегистрированы высокие величины активности супероксиддисмутазы.

Большое значение при развитии нейродегенеративных изменений мозга имеет нарушение глутатионового цикла [4]. Мы обнаружили повышение активности глутатионредуктазы в эритроцитах и плазме крови больных с сосудистой деменцией. Установлена корреляционная зависимость между активностью глутатионредуктазы и степенью выраженности сосудистой деменции. Низкий уровень восстановленного глутатиона на фоне высокой активности глутатионредуктазы, особенно у больных в состоянии тяжелой стадии деменции, свидетельствует об активном его использовании в качестве «ловушки» АФК с образованием токсических тиоловых радикалов, либо об интенсивном выходе его в плазму за счет повышения проницаемости эритроцитов.

Полученные результаты свидетельствуют об отягощении состояния ОС у больных, страдающих деменцией разного генеза.

Показана связь изменения отдельных показателей ОС в крови исследуемых больных в зависимости от степени тяжести психических нарушений. Обнаруженный нами дисбаланс в самой ферментативной системе на фоне истощения субстратов окисления у пожилых людей с сосудистой деменцией свидетельствует о глубокой степени ОС, следствием которого являются структурные нарушения мозговой ткани и переход всего организма на другой метаболический уровень существования [9].

Депрессивные состояния также развиваются на фоне окислительного стресса, что сопряжено с интенсивной генерацией АФК и снижением активности отдельных ферментативных и неферментативных компонентов АОС. В крови больных депрессией выявлен низкий уровень цинка, кофермента Q10, глутатиона, аскорбиновой кислоты, витамина Е, альбумина, триптофана, тирозина, омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ω 3-ПНЖК). Все эти показатели вносят свой вклад в снижение общей антиоксидантной активности и коррелируют с тяжестью симптомов депрессии [10].

Выявленное нами повышение интенсивности окислительной модификации белков плазмы крови больных в депрессивном состоянии фактически отражает общую направленность состояния свободно-радикальных процессов в тканях всего организма, в том числе в мозговой. Учитывая большую и очень разнообразную функциональную нагрузку белков в тканях, их окислительная модификация может носить в отличие от ПОЛ более избирательный и специфический характер при различных патологических состояниях [11].

Таким образом, усиление свободно-радикальных процессов и развитие ОС являются одним из патогенетических звеньев неврологических и психических поражений ЦНС, проявляющихся в нарушении структуры и функции биомембран нейронов, мембранносвязанных белков, таких, как рецепторы, ферменты, ионофоры, метаболизме медиаторов, истощении энергетических ресурсов. В клинической практике следует учитывать состояние АОЗ и ПОС с целью своевременного назначения антиоксидантной терапии особенно при психических расстройствах, так как длительное назначение ряда специфических лекарственных форм сопряжено с дополнительной генерацией АФК.

Список литературы

1. Suzuki Y.J., Forman H.J., Sevanian A. 1997. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.*, V.22, № 1-2, P. 269-285.

2. Дубинина Е.Е. 2006. *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение)*. СПб.: Медицинская пресса, 400 с.
3. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. 2001. *Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты*. М.: МАИК. Наука/Интерпериодика, 343 с.
4. Halliwell В. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. In: Packer L., Philipko L., Christen Y., eds. *Free radical in the brain. Aging, neurological and mental disorders*. Springer-Verlag, Berlin, N.Y., London, P. 21-40.
5. Beal M.F. 1997. Oxidative damage in neurodegenerative diseases. *Neuroscientist*, V.3, № 1, P. 21-27.
6. Barone E., Di Domenico F, Sultana R., et al. 2012. Heme oxygenase-1 posttranslational modifications in the brain of subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Free Radic.Biol.Med.*, V.52, № 11-12, P. 2292-2301.
7. Бокша И.С. 2004. Взаимосвязь нейронов и глиальных клеток через метаболизм глутамата в мозге здоровых людей и больных психическими заболеваниями. *Биохимия*, Т. 69, № 7, С.869-885.
8. Cenini G., SultanaR., Memo M., Butterfield D. A. 2008. Effects of oxidative and nitrosative stress in brain on p53 proapoptotic protein in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Free Radic.Biol.Med.*, V. 45, № 1, P. 81-85.
9. Дубинина Е.Е., Ковругина С.В., Коновалов П.В. . 2007. Показатели окислительного стресса при нейродегенеративных заболеваниях (сосудистая деменция и болезнь Альгеймера). *Успехи геронтологии*, Т. 20, С. 109-113.
10. Leonard В., Maes М. 2012. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitans play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, V. 36, P. 764-785.
11. Дубинина Е.Е., Морозова М.Г. и соавт. 2000. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация). *Вопросы мед. химии*, Т. 46, № 4, С. 398-409.

Кисспептины – новые потенциальные маркеры различных опухолей яичников

Дурнова А.О.^{1}, Судалина М.Н.¹, Лищук С.В.², Бондарев Н.Э.³*

¹ ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта» СЗО РАМН.

Менделеевская линия, д.3, Санкт-Петербург, РФ, 199034

Тел.:+79811853607, e-mail: anna.durnova@gmail.com

² ЗАО «Юропиан Медикал Сентер» (Европейский медицинский центр), Москва

³ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)»

Резюме. Кисспептин-10 (КР-10), декапептид, получаемый из продукта первичной трансляции гена Kiss-1, является важнейшим гормоном, регулирующим половое созревание, а также подавляет метастазирование опухолей через активацию GPR54 (рецептора из семейства G-белков). Изучено распределение кисспептинов в ткани нормального яичника, эндометриоидных кист и первичных злокачественных опухолях яичника. Показана различная экспрессия кисспептинов и их рецепторов в тканях яичников, установлена связь экспрессии кисспептинов с возрастом женщин.

Ключевые слова: кисспептины, GPR54, опухоли яичников, тканевые матрицы.

Kisspeptins – new potential markers of different ovarian cysts

Durnova A.O.¹, Sudalina M.N.¹, Lischyk S.V.², Bondarev N.E.³

¹ D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, St.Petersburg, Russian Federation

Тел.:+79811853607, e-mail: anna.durnova@gmail.com

²JSC European Medical Center, Moscow, Russian Federation

³ St.Petersburg Clinical Research Center of the specialized types of health care (oncological)

Summary. Kisspeptin-10 (КР-1), a decapeptide derived from the primary translation product of the gene Kiss-1 is an important hormone, which is major regulator of puberty, as well as inhibitor of

tumor metastasis through activation of GPR54 (receptor family of G-proteins). The study examined the distribution of kisspeptins in normal ovarian tissue, endometrial cysts and primary malignant tumors of the ovary. A different expression of kisspeptins and their receptors in ovarian tissues establishes a connection of kisspeptins expression with age of women.

Keywords: kisspeptins, GPR54, ovarian tumors, tissue microassay.

Введение. Различные кистозные образования яичников выявляются у 7,8% пациенток репродуктивного возраста и у 2,5–18% больных в постменопаузе. Высокая частота нарушений репродуктивной функции объясняется особой уязвимостью гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы вследствие ее сложной регуляции и повышенной чувствительности к различным неблагоприятным воздействиям. Кисспептины (КР) являются нейромонами, вырабатываемыми гипоталамусом, запускающими функционирование гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы.

Также было установлено, что КР синтезируются локально в самом яичнике, поскольку показано, что высокая экспрессия KISS1 наблюдалась в растущих фолликулах и желтом теле яичников, на поверхности самих яичников, как в виде мРНК, так и в виде пептида [1]. Интересным является факт, что уровень кисспептинов меняется в течение менструального цикла: установлено, что уровень мРНК рецептора к кисспептинам (GPR54) остается стабильно на низком уровне в течение всего менструального цикла, уровень экспрессии KISS1 яичниками возрастает перед овуляцией [2]. Также кисспептины влияют на овуляцию, они могут вызывать предовуляторный выброс гонадотропинов - либеринов и статинов, оказывающих воздействие на гонадотропные клетки гипофиза.

КР образуются протеолитическим расщеплением предшественника из 145 аминокислот, что приводит к образованию 54-аминокислотного пептида (КР-54), изначально названного метастинном из-за способности супрессировать метастазирование опухолей. Из предшественника также могут получаться КР-14, КР - 13 и КР-10, имеющие одинаковый с КР-54 С-конец, где они содержат участок Arg-Phe, характерный для RF-амидопептидов.

Позже было показано, что кисспептины эффективно взаимодействуют с рецептором GPR54 даже короткой молекулой (КР-10), имеющей аминокислотную последовательность

YNWNSFGLRF [3], причем биологическая активность связана именно с десятью последними остатками аминокислот с С-конца (45-54). Показано, что мутации, вызывающие отключение гена GPR54, вызывают гипогонадотропный гипогонадизм, нарушение полового созревания, секреции гонадотропинов и, наконец, бесплодие [4].

При связывании лиганда с G-белком происходит опосредованное выделение ионов $[Ca^{++}]$ в цитоплазму. Повышение уровня внутриклеточного кальция вызывает не только стимуляцию секреции гормонов в репродуктивной системе, но и ингибирует пролиферацию; сходный эффект предположительно дает и активированная протеинкиназа С, активированная ДАГ [5].

Установлена связь киспептинов с процессами канцерогенеза, при исследовании проникающей и миграционной способности клеток в случае рака груди Sung-Gook Cho и коллегами, показано, что продукт гена *KiSS1* подавляет ее. Из более ранних исследований известно, что в злокачественных образованиях ген *KISS1* экспрессируется гораздо больше, чем в норме; а в случае высокоинвазивной формы экспрессия КР практически отсутствует [6].

Кроме того, Кастеллано и колл. подтвердили, что действие киспептинов влияет не только на пролиферативную и миграционную способность клеток, но и на секрецию гонадотропинов [7]

Как было сказано ранее, КР обнаружен в клетках эндотелия сосудов, их способность подавлять ангиогенез может быть направлена на замедление и даже остановку роста злокачественных образований [8]. Отмечаются также эффекты КР в раковых клетках, поскольку воздействие КР-10 на клетки аденомы гипофиза вызывает апоптозы [9]. Некоторые исследователи наоборот, утверждают, что киспептины не оказывают действия на пролиферацию и апоптоз, зато существенно влияют на миграционную и проникающую способность клеток [10]. Таким образом, вопрос о действии КР на различные типы клеток по-прежнему остается открытым. Целью исследования являлось определение связи экспрессии киспептинов с различными формами доброкачественных и злокачественных образований яичников.

Материалы и методы. Экспрессия киспептинов и рецепторов GPR54 изучалась в эндометриодных кистах яичника (n=17). Материал, полученный у женщин в возрасте от 18 до 35 лет

включительно, отобран из архива отдела патоморфологии ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта» СЗО РАМН. В качестве группы сравнения использована ткань нормального яичника (n=8), полученная при вскрытии в СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Также проведено исследование тканевых матриц злокачественных новообразований яичников (n=29).

Исследование фрагментов эндометриоидных кист, первичных опухолей яичника в норме проводилось методом иммуногистохимии по стандартной методике с применением первичных моноклональных антител к Kiss1 (1:150, Abcam) в и поликлональных антител к GRP54 (1:350, Abcam). Оценивалась площадь и оптическая плотность экспрессии КР и его рецептора.

Результаты. При анализе экспрессии КР и GPR54 в эндометриоидных кистах установлено присутствие данных белков во всех образцах. При верификации тканевых структур, экспрессирующих КР и GPR54, положительная реакция к антителам выявлена в белковой оболочке яичника (рис 1. А), латеральном слое коры (рис 1. Б), в значительно меньшей степени – в строме (рис 1. В) (медиальной части коры яичника). В эндометриальных структурах положительная реакции не выявлена ни в строме, ни в железистых структурах (рис 1. Г).

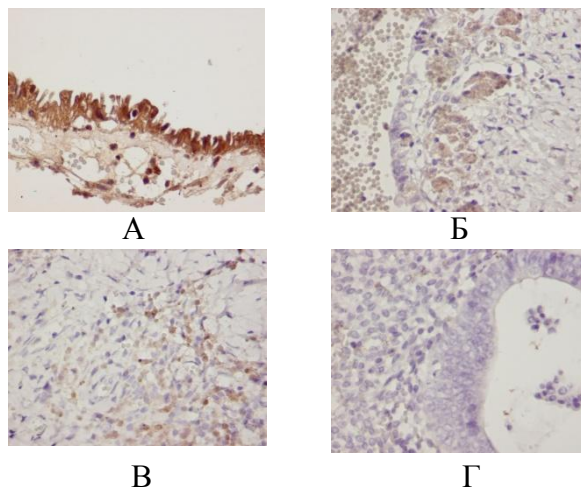
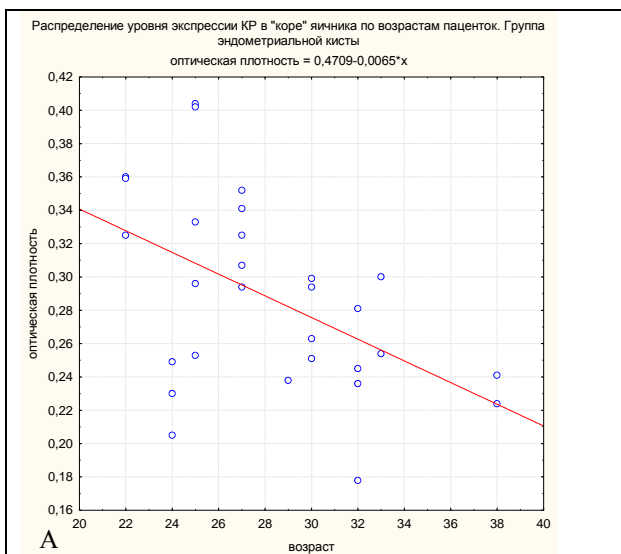


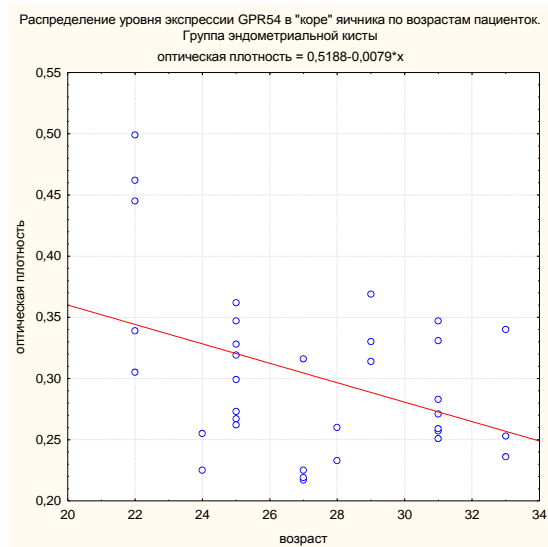
Рис.1. Экспрессия КР в ткани эндометриоидной кисты яичника, x400; А - в белковой оболочке яичника, Б - в латеральном

слое коры, В - в медиальной части коры, Г- в эндометриальных структурах.

При морфометрическом анализе не были выявлены различия по относительной экспрессии КР в различных зонах яичника. Тогда как оптическая плотность экспрессии КР была выше в латеральном слое коры по сравнению с медиальной частью и составляла $0,287 \pm 0,06$ и $0,261 \pm 0,09$ у.е., соответственно.

При сравнении оптической плотности экспрессии кисспептинов и рецепторов к ним в группе с эндометриальной кистой яичника отмечено значительное уменьшение интенсивности экспрессии КР и GPR54 в коре яичников по показателю оптической плотности с возрастом пациентки (рис.2). При сравнении значений оптической плотности в медиальной части подобная связь установлена не была.





В

Рис.2. График зависимости оптической плотности экспрессии Kiss1 (А) и GPR54 (Б) в ткани эндометриоидной кисты от возраста пациентки

При оценке экспрессии кисспептинов в первичных опухолях яичников было выявлено как полное отсутствие, так и наличие иммуноокрашивания в различных тканевых структурах (рис.3).

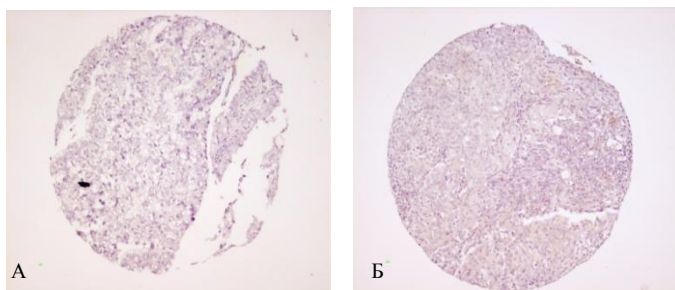


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция к Kiss1 в опухолевой ткани яичника, отрицательная (А) и положительная (Б) реакция, х200.

При сравнении экспрессии кисспептинов в метастазах при раке яичника, установлено, что слабоположительная реакция выявлена только в 2-х образцах из 8-ми, тогда как при раке влагалища ни в одном из случаев (n=14) положительная реакция не выявлена.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что экспрессия кисспептинов верифицируется в различных зонах яичника. Различие степени экспрессии в основном узле опухоли и метастазах может явиться информативным признаком для персонифицированного прогноза метастазирования и прогрессии опухолей. Представляется перспективным в дальнейшем изучение экспрессии кисспептинов в отдельных субтипах аденокарцином яичников и определение клеточных и тканевых структур, экспрессирующих кисспептины в нормальном яичнике и опухолевой ткани.

Список литературы

1. Cejudo Roman A., Pinto F.M., Dorta I., et al. 2012. Analysis of the expression of neurokinin B, kisspeptin, and their cognate receptors NK3R and KISS1R in the human female genital tract. *Fertil Steril.*, Vol. 97, P.1213-1219.
2. Castellano J.M., Gaytan M., Roa J., et al. 2006. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology*, Vol.147, P. 4852-4862.
3. Kotani M., Detheux M., Vandenbogaerde A., et al. 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol.*, Vol. 276, P. 34631-34636.
4. de Roux N., Genin E., Carel J-C., et al. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol.100, P.10972–10976.
5. Stafford L.J., Xia C., Ma W., et al. 2002. Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor. *Cancer Res.*, Vol. 62, P. 5399-5404.
6. Martin T.A., Watkins G., Jiang WG.. 2005. KiSS-1 expression in human breast cancer. *Clin. Exp. Metastasis.*, Vol. 22, P.503-511.

7. Castellano J.M., Navarro V.M., Fernández-Fernández R., et al. 2006. Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol. Cell. Endocrinol.*, Vol. 257-258, P.75-83.
8. Cho S.G., Yi Z., Pang X., et al. 2009. Kisspeptin-10, a KISS1-derived decapeptide, inhibits tumor angiogenesis by suppressing Sp1-mediated VEGF expression and FAK/Rho GTPase activation. *Cancer Res.*, Vol. 69, P.7062-7070.
9. Martínez-Fuentes A.J., Molina M., Vázquez-Martínez R., et al. 2011. Expression of functional KISS1 and KISS1R system is altered in human pituitary adenomas: evidence for apoptotic action of kisspeptin-10. *Eur J Endocrinol.*, Vol.164, P.355-362.
10. Zajac M., Law J., et al. 2011. GPR54 (KISS1R) transactivates EGFR to promote breast cancer cell invasiveness. *PLoS ONE*, Vol.6 (6): e21599.

Мелатонин как биомаркер старения и возрастной патологии

Кветной И.М.³, Процаев К.И.^{1}, Кветная Т.В.², Ильницкий А.Н.¹*

¹ АНО «НИМЦ «Геронтология», г. Москва, Россия

² Институт биорегуляции и геронтологии, г. Санкт-Петербург, Россия

³ Институт акушерства и гинекологии им. Отта, г. Санкт-Петербург, Россия

* 10342, Москва, ул. Б.Дмитровка, д.6, стр. 9, МЦ «Ваша клиника» (для АНО НИМЦ «Геронтология»)

Тел. + 79606338984, e-mail: prashchayeu@mail.ru

Ключевые слова: мелатонин, старение, возраст-ассоциированная патология.

Melatonin as biomarker of ageing and age-associated pathology

Kvetnoi I.M.³, Prashchayeu K.I.^{1}, Kvetnaia T.V.², Ilnitski A.N.¹*

¹ Researching Medical Centre “Gerontology”, Moscow, Russia

² Institute of Bioregulation and Gerontology, S.-Petersburg, Russia

³ Institute of Obstetrics and Gynecology, S.-Petersburg, Russia

* 10342, Russia, Moscow, 6-9, B.Dmitrowka Str., Medical Centre “Vasha Klinika” (for Researching Medical Centre “Gerontology”),

Tel.: + 79606338984, e-mail: prashchayeu@mail.ru

Keywords: melatonin, ageing, age-associated pathology.

Мелатонин (МТ) является важнейшим гормоном диффузной нейроиммуноэндокринной системы, играющим огромную роль в регуляции гомеостаза организма. МТ впервые был обнаружен в 1958 году в эпифизе. Основным метаболитом МТ является 6-сульфатоксимелатонин (6-СОМТ), по концентрации которого в моче можно косвенно судить о продукции МТ эпифизом [1, 2].

В течение многих лет МТ рассматривался только как гормон пинеальной железы (эпифиза). При появлении высокочувствительных антител к индолилалкиламинам оказалось возможным идентифицировать МТ не только в пинеальной железе, но также и в экстрапинеальных тканях. В настоящее время твердо установлено, что пинеальная железа не является исключительным органом, способным синтезировать МТ. Клетки, продуцирующие МТ, обнаружены в желудочно-кишечном тракте, дыхательных путях, поджелудочной железе, надпочечниках, щитовидной железе, тимусе, мозжечке, мочеполовой системе, плаценте и других органах [3, 4]. Более того, выявлен активный синтез МТ в неэндокринных клетках - тучных клетках, естественных киллерах, эозинофильных лейкоцитах, тромбоцитах, эндотелиоцитах [5]. В связи с этим, целью настоящей работы был анализ результатов собственных исследований и данных литературы за период 1990-2013 гг. в отношении трех значимых групп нозологических форм, актуальных для гериатрической практики: нейродегенеративных, опухолевых заболеваний и климакса.

МТ и опухолевый рост. При старении происходит инволюция пинеальной железы и, как следствие этого, снижается концентрация МТ в организме [6, 7, 8]. Это, в свою очередь, приводит к возрастным изменениям ряда метаболических процессов и негативно отражается на функции многих органов и систем. Однако сведения об изменении уровней секреции экстрапинеального МТ при старении отсутствуют, что ограничивает понимание роли и значения экстрапинеальных источников синтеза этого гормона и свидетельствует о необходимости исследований в этом направлении.

Одним из наиболее важных биологических свойств МТ является его способность контролировать клеточное деление. МТ способен ингибировать митоз клеток, вызывая задержку на стадии метафазы [9]. Опубликованы сообщения, касающиеся

ингибирующего действия МТ на рост клеток, зависимых от половых стероидных гормонов [10, 11, 12], а также на развитие злокачественных опухолей в условиях *in vivo* и *in vitro* [13, 14]. На этом основании было выдвинуто предположение о том, что МТ является природным онкостатическим гормоном, способным предотвращать неопластический рост [14].

Подобное обстоятельство определяет актуальность проведения исследований по определению секреции МТ у онкологических больных. Это может иметь не только фундаментальное теоретическое значение для более глубокого понимания эндогенных механизмов неопластической трансформации, но и явиться основой для разработки новых диагностических и прогностических маркеров при опухолевых заболеваниях.

Опухолевый рост и онкологические заболевания являются значимыми патологическими процессами, ассоциированными с возрастом [15]. В связи с вышеизложенным, актуальной и необходимой научно-практической задачей является проведение специальных исследований по изучению МТ как возможного биологического маркера этих патологических процессов, с целью оптимизации диагностики, оценки прогноза и лечения заболеваний.

На основании многолетних исследований секреции МТ у людей разных возрастных групп нами разработан и оптимизирован унифицированный протокол клинических данных, позволяющий объективизировать интерпретацию полученных результатов при определении экскреции 6-СОМТ у человека. Доказано, что динамика секреции пинеального МТ в процессе старения организма человека достоверно изменяется. Показатели экскреции 6-СОМТ снижаются к 60 годам в два раза, а после 80 лет значения экскреции 6-СОМТ ниже показателей 20-30 лет более чем в 5 раз.

Количество экстрапинеальных МТ-иммунопозитивных ЕС-клеток в слизистой оболочке желудка сохраняется практически стабильным до 60 лет, в более старом возрасте их количество достоверно снижается. Оптическая плотность МТ-иммунопозитивных ЕС-клеток не меняется с возрастом, оставаясь стабильным показателем. Это свидетельствует о снижении выработки МТ в слизистой оболочке желудка у старых людей за счет численного уменьшения популяции ЕС-клеток, а не за счет ослабления его синтеза в самих ЕС-клетках.

При опухолевых процессах секреция МТ достоверно меняется. Изменения носят разноплановый характер и зависят как от органной локализации опухоли, так и от степени ее дифференцировки и прогрессии. Уровень экскреции 6-COMT прогрессивно снижается при увеличении размеров опухоли и метастазировании. При раке молочной железы операция приводит к восстановлению нормального уровня экскреции 6-COMT.

Обнаружена строгая положительная корреляция между уровнем экскреции 6-COMT и индексом PCNA в опухолевой ткани. Отчетливая отрицательная корреляция зарегистрирована между показателями экскреции 6-COMT и внутриопухолевым содержанием МТ. Строгая отрицательная корреляция выявлена также между индивидуальными значениями PCNA и экспрессией МТ в опухолевой ткани.

Наличие строгих корреляций между экскрецией 6-COMT и показателями опухолевого гомеостаза позволяют оценить 6-COMT как новый перспективный неинвазивный маркер для его применения в онкологической практике в целях оптимизации диагностики и оценки прогноза развития опухоли в каждом конкретном случае на любом этапе лечения пожилого больного.

МТ и нейродегенеративные процессы.

Нейродегенеративные заболевания, в частности болезнь Альцгеймера, являются патологическими процессами, ассоциированными с возрастом [16]. Их прижизненная диагностика чрезвычайно трудна, но крайне необходима для выбора оптимального патогенетически обусловленного варианта лечения. Болезнь Альцгеймера – наиболее распространенная форма первичных деменций позднего возраста, характеризующаяся постепенным малозаметным началом в пресенильном или сенильном возрасте, неуклонным прогрессированием расстройств памяти и высших корковых функций вплоть до тотального распада интеллекта и психической деятельности в целом. Согласно эпидемиологическим данным, в целом в населении 5% лиц старше 65 лет страдают проявлениями деменции. В большинстве случаев (85%) БА начинается в возрасте 45 – 65 лет, однако возможно более раннее (около 40 лет) и более позднее (старше 65 лет) начало заболевания. Средняя продолжительность жизни 8 – 10 лет, но возможно как затяжное, так и катастрофическое течение болезни – от 2 до 4 лет [15].

В механизме развития болезни Альцгеймера важное место занимает нейротоксическое действие свободных радикалов [17].

МТ является мощным эндогенным антиоксидантом и играет важную роль в защите нейронов от окислительного стресса [18, 19]. В связи с этим, проведение исследований по изучению взаимоотношений экстрапинеального МТ с ключевыми молекулами, вовлеченными в патогенез болезни Альцгеймера – β -амилоидом и тау-протеином, может быть важным для разработки прижизненных маркеров нейродегенеративных заболеваний. Это, несомненно, является актуальной проблемой геронтологии и общей патологии.

У пациентов с болезнью Альцгеймера обнаружено достоверное снижение экскреции 6-COMT. Усиление снижения уровней экскреции 6-COMT зависит от степени клинической выраженности деменции - чем сильнее выражена деменция, тем ниже уровни экскреции 6-COMT.

Впервые обнаружена экспрессия тау-протеина в лимфоцитах крови пациентов с болезнью Альцгеймера, тогда как в контроле лимфоциты крови не проявляют иммунореактивности к тау-протеину. Таким образом, тау-протеин может рассматриваться как перспективный маркер, а лимфоциты крови как удобный объект для прижизненной диагностики болезни Альцгеймера.

Показано, что при болезни Альцгеймера в лимфоцитах крови человека происходит резкое снижение синтеза протеина bcl-x и МТ, причем как за счет уменьшения количества лимфоцитов, продуцирующих эти факторы, так и за счет снижения уровня секреции веществ даже в тех клетках, которые сохранили способность продуцировать bcl-x и МТ. Резкое снижение выработки антиапоптозного фактора bcl-x и МТ в лимфоцитах крови у пациентов с болезнью Альцгеймера может свидетельствовать как об усилении гибели нейронов путем апоптоза, так и об участии продуктов окислительного стресса в патогенезе болезни Альцгеймера. Впервые обнаруженная экспрессия β -амилоида и тау-протеина в цитоплазме тучных клеток слизистой оболочки желудка и кожи у пациентов с болезнью Альцгеймера подтверждает правомочность взглядов на болезнь Альцгеймера как на системное заболевание. Экстрапинеальный МТ может рассматриваться как эндогенный фактор противодействия развитию нейродегенеративных процессов, что подтверждается выраженной отрицательной связью между его продукцией и экспрессией β -амилоида и тау-протеина в слизистой оболочке желудка.

Результаты наших исследований свидетельствуют о необходимости использования мелатонина как биологического маркера, позволяющего оптимизировать диагностику и прогноз при патологических процессах, ассоциированных с возрастом, – нейродегенеративных заболеваниях.

МТ и климакс. Известно, что с возрастом при нормальном процессе старения экскреция 6-сульфатоксимелатонина (6-COMT) с мочой закономерно снижается. Однако у женщин с патологическим климаксом снижение экскреции 6-COMT происходит медленнее, чем у женщин с нормальным климаксом. При наличии же сопутствующей сердечно-сосудистой патологии наблюдается нарушение экскреции 6-COMT. Причем такие состояния как артериальная гипертензия и ИБС влияют примерно в одинаковой степени на эти процессы. А их сочетание ведет к достоверно еще большей степени нарушений.

Если же развитие артериальной гипертензии и ИБС происходит на фоне патологического климакса, то нарушения экскреции 6-COMT выражены в еще большей степени. Нами установлено, что имеются достоверные корреляционные связи между нарушениями экскреции 6-COMT и такими факторами как патологический климакса, наличие артериальной гипертензии, ИБС, сочетание артериальной гипертензии и ИБС [20, 21, 22, 23]. Наиболее неблагоприятным сочетанием является одновременное развитие артериальной гипертензии и ИБС на фоне патологического климакса. Это достоверно коррелирует с нарушениями сигнального молекулярного взаимодействия на уровне цитокинового и оксидативного статуса [24].

Заключение. Установлено, что функционально МТ-продуцирующие клетки являются неотъемлемой частью диффузной нейроэндокринной системы как универсальной системы адаптации, контроля и защиты организма. Принимая во внимание большое количество МТ-продуцирующих клеток во многих органах, широкий спектр биологической активности МТ (особенно его главное свойство - универсального регулятора биологических ритмов), представляется возможным рассматривать МТ в качестве ключевой сигнальной молекулы для локальной координации клеточных функций. Очевидно, что более глубокий анализ участия МТ в процессах старения будет способствовать лучшему пониманию сложных молекулярно-клеточных взаимосвязей, складывающихся в организме при заболеваниях, ассоциированных с возрастом, что открывает новые подходы в разработке

перспективных диагностических и прогностических маркеров, значительно улучшающих прижизненную своевременную диагностику патологических процессов, ассоциированных с возрастом.

Список литературы

1. Arendt J., Aldhous M., Marks V. 1986. Alleviation of jet lag by melatonin: preliminary results of controlled double blind trial. *Br. Med. J.*, V. 292, P.1170.
2. Arendt J., Bhanji S., Franey C., Mattingly D. 1992. Plasma melatonin levels in anorexia nervosa. *Br. J. Psychiatry*, V. 161, P.361-364.
3. Пальцев М.А., Кветной И.М. 2006. *Руководство по нейроиммуноэндокринологии*, М.: Медицина, 384 с.
4. Райхлин Н.Т., Кветной И.М., Осадчук М.А. 1993. *APUD-система (общепатологические и онкологические аспекты)*. Обнинск, С. 225.
5. Кветной И.М., Южаков В.В. 1996. Окрашивание ткани эндокринных желез и элементов АПУД-системы В: *Микроскопическая техника: Руководство / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов. М.: Медицина, С. 375-418.*
6. Анисимов В.Н., Арутюнян А.В., Хавинсон В.Х. Антиоксидантная роль эпиталамина и мелатонина. *Геронтологические аспекты пептидной регуляции функций организма*. СПб: Наука, 1996. С. 15.
7. Анисимов В.А., Арутюнян А.В., Хавинсон В.Х. 1996. Мелатонин и эпиталамин угнетают процесс окисления липидов у крыс. *Доклады Академии наук*, Т. 348, С. 265-267.
8. Анисимов В.А., Арутюнян А.В., Хавинсон В.Х. 1997. Влияние мелатонина и эпиталамина на активность антиокислительной системы у крыс. *Доклады Академии наук*, Т. 352, С. 831-833.
9. Banerjee S., Margulis L. 1973. Mitotic arrest by melatonin. *Exp. Cell Res.*, V. 78, P. 314-318.
10. Bartsch C., Bartsch H. 1994. Melatonin secretion in oncological patients: current results and methodological considerations. *In: Adv. Pineal Res. Vol. 7.* Maestroni G.J.M., Conti A., Reiter RJ, eds. London: John Libbey and Comp., P. 283-301.

11. Bartsch C., Bartsch H. 1997. Significance of melatonin in malignant diseases. *Wien Klin. Wochenschr*, V. 109, P. 722-729.
12. Bartsch C., Bartsch H. 1988. Unidentified pineal substances with anti-tumor activity. In: *The Pineal Gland and Cancer*. Gupta D., Attanasio A., Reiter R.J., eds. London, Tubingen: Brain Res. Promotion, P. 369-376.
13. Blask D.E., Hill S.M. 1988. Melatonin and cancer: basis and clinical aspects. In: *Melatonin. Clinical Perspectives*. Miles A., Philbrick D.R.S., eds. Oxford: Oxford Univ. Press, P.128-173.
14. Blask D.E., Wilson S.T., Lemus-Wilson A.M. 1994. *The oncostatic and oncomodulatory role of the pineal gland and melatonin. Advances in pineal research: Vol. 7*. Maestroni G.J.M., Conti A., Reiter R.J. eds. London: John Libbey and Comp., P. 235-241.
15. Li Q.X., Fuller S.J., Beyreuther K., Masters C.L. 1999. The amyloid precursor protein of Alzheimer disease in human brain and blood. *J. Leukoc. Biol.*, V. 66, P. 567-574.
16. Schneck M.K., Reisberg B., Ferris S.H. 1982. An overview of current concepts of Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry*, V. 139, P. 165-173.
17. Price D.L. 1999. New order from neurological disorders. *Nature*, V. 399, Suppl. A3-A5.
18. Reiter R.J. 2003. Melatonin: clinical relevance. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, V. 17, N 2, P. 273-285.
19. Reiter R.J. 1994. Pineal function during aging: Attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol.*, V. 54, P. 31-39.
20. Гилева В.В., Науменко К.Ю. 2008. Климактерический синдром и мелатонин. В: *Взаимодействие медицинской науки и практики: Материалы очно-заочной конференции*. Новополец- Смоленск- Белгород, С. 31.
21. Ильницкий А.Н., Процаев К.И., Люцко В.В., Гилева В.В. 2008. Перспективы использования мелатонина в лечении и реабилитации пациентов с патологией внутренних органов. В: *Всероссийская научно-*

- практическая конференция «50 лет мелатонину: итоги исследований»*, Санкт-Петербург, С. 18.
22. Кветная Т.В., Прощаев К.И., Гриненко Т.Н., Антропова О.Е., Гилева В.В., Антропов А.В., Голубицкая Е.С. 2008. Мелатонин – биологический маркер соматической полиморбидной патологии и эффективности ее терапии. В: *Всероссийская научно-практическая конференция «50 лет мелатонину: итоги исследований»*. Санкт-Петербург, С. 21.
23. Кветная Т.В., Прощаев К.И., Гриненко Т.Н., Гилева В.В., Антропова О.Е., Антропов А.В., Голубицкая Е.С. 2008. В: *Мелатонин и полиморбидная патология. XV Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»*. Сборник материалов конгресса. Тезисы докладов, Москва, С. 153.
24. Гилева В.В. 2008. Фактор некроза опухолей альфа как маркер тяжести полиморбидной патологии у пожилых людей. В: *Геронтологические чтения: Сборник материалов конференции*, Белгород, С. 5.

Прогнозирование исхода ЭКО: значение экспрессии рецепторов эстрогена, прогестерона, лейкемию ингибирующего фактора и анамнестических особенностей пациенток

Крылова Ю.С.¹, Шарфи Ю.Н.²

¹ ФГБУ «НИИАГ им. Д.О. Отта» СЗО РАМН, Россия

* 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3

Телефон +7 921-302-95-70, e-mail: emerald2008@mail.ru

² Санкт-Петербургский государственный университет. Россия

Резюме. В статье приведены результаты исследования экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона, а также лейкемию ингибирующего фактора у пациенток вступающих в цикл ЭКО. В результате проведенного исследования установлено, что экспрессия рецепторов ER, PR и LIF являются диагностически ценными для прогнозирования исходов лечения методами ЭКО. На основании данных об экспрессии ER, PR, LIF, а также анамнестических особенностей пациенток был разработан «суммарный прогностический коэффициент».

Ключевые слова: (эндометрий, экстракорпоральное оплодотворение, лейкомию ингибирующего фактора (LIF), рецепторы эстрогена (R-ER), и рецепторы прогестерона (R-PR)

Predicting the outcome of IVF, the value of the expression of estrogen and progesterone receptors, leukemia inhibitory factor and anamnestic characteristics of patients

Krylova J. S.¹, Sharfi Y.N.²

¹D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS, Russian Federation

* 199034, St. Petersburg, Mendeleyevckaya Line, 3

Tel. +7 921-302-95-70, e-mail: emerald2008@mail.ru

²St. Petersburg State University. Russia

Summary. A study on the expression of estrogen and progesterone receptors as well as leukemia inhibitory factor in patients entering into a cycle of IVF revealed that the expression of receptors ER, PR and LIF are of diagnostic value for predicting the outcome of IVF treatment. On the basis of data on expression of ER, PR, LIF as well as the characteristics of the patients, medical history a "total prognostic factor" has been designed.

Keywords: endometrium, in vitro fertilization, leukemia inhibitory factor (LIF), estrogen receptor (R-ER), progesterone receptor, and (R-PR)

Введение. Бесплодие остается одной из важнейших медицинских, социальных, экономических и общегосударственных проблем. По данным ВОЗ, его частота составляет 10–15 % и не имеет тенденции к снижению. Недостаточная эффективность методов восстановления естественной фертильности человека стимулировала развитие новых технологий, таких как экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), перенос эмбрионов (ПЭ) и интраплазматическое введение сперматозоидов (ИКСИ).

Широкое их применение привело к накоплению врачебного опыта как об успехах, так и о проблемах методов ВРТ. Несмотря на активные исследовательские работы в области вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), эффективность одной попытки ЭКО остается на уровне 30–40%. Поэтому в последние годы большое внимание уделяется разработкам методических подходов, направленных на повышение результативности циклов ЭКО [1]. Известно, что наступление беременности зависит от многих

составляющих: качества эмбриона, функциональной зрелости (рецептивности) эндометрия и состояния репродуктивной функции женского организма в целом. Однако на сегодняшний день продолжают дискуссии о ведущих факторах, определяющих эффективность ЭКО. В литературе описываются противоречивые данные, что связано с небольшими выборками и нестандартностью условий проведения исследований. Одной из значимых составляющих успеха ЭКО является состояние эндометрия при переносе в полость матки эмбрионов хорошего качества и исключения всех явных причин, препятствующих благополучному завершению программы. Неудачу ЭКО расценивают как нарушение на этапе имплантации эмбриона [2]. Поэтому в настоящее время особое внимание ученых сконцентрировано на исследовании эндометрия в период «имплантационного окна» (implantation window), изучении сигнальных молекул специфически ответственных за имплантацию бластоцисты и возможности использования их в качестве маркеров прогнозирования результативности применения ЭКО.

«Имплантационное окно» представляет собой период времени, когда эндометрий максимально восприимчив к имплантации бластоцисты. В этот период времени в эндометрии экспрессируется большое количество сигнальных молекул, осуществляющих паракринную, аутокринную, интракринную и юстакринную регуляцию внутри- и межклеточных взаимодействий [3].

Одним из механизмов формирования «имплантационного окна» является подготовка эндометрия стероидными гормонами яичников. Решающая роль в воздействии на эндометрий отводится не собственно стероидным гормонам, циркулирующим в периферическом кровотоке, а определяется их взаимодействием с функционально полноценными рецепторами ткани эндометрия к соответствующим гормонам [4]. В настоящее время в клинической практике для оценки рецепторного аппарата широко применяется определение рецепторов эстрагена (ER) и прогестерона (PR) в ткани эндометрия. Под воздействием стероидных гормонов происходит созревание эндометрия и изменение ультраструктуры его поверхностного эпителия. На поверхности эпителиальных клеток образуются выпячивания - пиноподии [5]. Одновременно с формированием и созреванием пиноподий на их поверхности появляется секреторный гликопротеид — лейкемию

ингибирующий фактор (LIF), максимальная экспрессия которого совпадает с стадией расцвета пиноподий. LIF занимает одно из ведущих мест в эндометриальной восприимчивости и имплантации [6].

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) являются высокотехнологичными и дорогостоящими мероприятиями, сопряженными с выраженной психоэмоциональной нагрузкой на пациентку. Прогнозирование исхода с использованием рецепторов ER, PR и LIF позволит специалистам научно обоснованно планировать тактику лечения, тем самым повышая эффективность метода.

Цель исследования – разработка способа прогнозирования исхода ЭКО в зависимости от экспрессии рецепторов ER, PR и LIF, а также анamnестических особенностей пациенток.

Материал и методы. Материал исследования составили 50 биопсий эндометрия женщин с различными факторами бесплодия в возрасте до 37 лет, планирующих лечение методами ВРТ. Биопсийный материал был получен на 22-й день (при 28 дневном менструальном цикле) за цикл до планируемого ЭКО. В цикле для поддержки лютеиновой фазы применялся микронизированный прогестерон. Перенос эмбрионов проводился на четвертые сутки культивирования (морулы 3-го и/или 4-го класса). Диагностика беременности проводилась биохимическим методом на 14 день после переноса эмбрионов в полость матки и ультразвуковым методом на 21 день.

Полученные образцы эндометрия обрабатывали по стандартной методике с получением парафиновых блоков. С использованием ротационного микротомы были выполнены серийные гистологические срезы толщиной 5 мкм, окрашены гематоксилином и эозином по стандартной методике. После изучения препаратов были отобраны 40 образцов, содержащие эндометрий ранней и средней секреторной фазы, с которых были выполнены срезы 4 мкм и нанесены для дальнейшего иммуногистохимического исследования на стекла, покрытые полилизиним. Для определения стероидных рецепторов использовались: «DACO», Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor α (Clone 1D5) в разведении 1: 35; «DACO», Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor (Clone PgR 636) в разведении 1:50. Для определения LIF использовались Abcam», Rabbit polyclonal Anti-LIF antibody (ab135629) разведение 1:100. В качестве вторичных антител использовали универсальный набор,

содержащий биотинилированные антимышьиные и антикроличьи иммуноглобулины («DACO»). Визуализацию проводили с применением комплекса авидина с биотинилированной пероксидазой с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином («DACO»).

Изучение препаратов проводилось на исследовательском микроскопе Nikon 400 с использованием камеры Nikon DXM 1200. Морфометрическое изучение препаратов выполнялось с использованием программы Морфология 5.2

Учет результатов проводили методом гистологического счета HISTO Score по формуле: $HS = 1a + 2b + 3c$, где а - % слабо окрашенных клеток, b - % умеренно окрашенных клеток, с - % интенсивно окрашенных клеток. 1, 2, 3 – интенсивность окрашивания в баллах. Степень экспрессии расценивали следующим образом: 0-10% - отсутствие экспрессии, 11-100% - слабая экспрессия, 101-200% - умеренная экспрессия, 201-300% - выраженная экспрессия. Для оценки реакции LIF использовали полуколичественный метод: отсутствие окрашивания — 0 баллов; менее 5% - 0,5 балла; менее 20% - 2 балла; 20-40% - 4 балла; более 40% - 6 баллов. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0.

Результаты. При гистологическом исследовании образцов эндометрия от 50 женщин с различными факторами бесплодия 10 образцов были исключены из исследования, так как эндометрий не соответствовал фазе и дню менструального цикла по критериям R.W. Noyes, и при иммуногистохимическом исследовании был выявлен хронический эндометрит по наличию экспрессии синдекана (CD 138) плазмочитами. В результате чего в исследование вошли 40 образцов, которые были разделены на две групп по исходу программы ЭКО. Первую группу составили 25 (62,5%) женщин с эхографически подтвержденной беременностью. Вторую группу составили 15 (37,5%) женщин, у которых беременность не наступила.

Возраст обследованных колебался от 22 до 37 лет, в среднем составив 32 ± 3 года. Различия в возрасте между группами находились в рамках статистической погрешности ($\chi^2=3,2$, $p>0,05$). Длительность бесплодия женщин, участвовавших в исследовании, варьировала от 1,5 до 10 лет, в среднем составляя $6,2 \pm 0,5$ года. Статистически значимые различия также не были обнаружены ($\chi^2=2,8$, $p>0,05$).

Анализ анамнестических данных не выявил достоверных различий в распределении пациенток по типу бесплодия ($\chi^2=2,9$, $p>0,05$). Так, в первой группе первично бесплодных было 15 чел. (60%), вторично – 10 чел. (40%), а во второй - 8 (53%) и 7 (47%) соответственно. Распределение факторов, обуславливающих бесплодие, представлено в таблице 1.

Факторы бесплодия	Группа I, %	Группа II, %
Мужской	20	33,3
Наружный генитальный эндометриоз (НГЭ)	40	46,7
Трубно-перитониальный	40	40,0
Эндокринный	28	33,3

Таблица 1. Факторы, обусловившие бесплодие в исследованных группах

Как видно из таблицы 1, ведущими факторами, вызывающими бесплодие, были наружный генитальный эндометриоз – 40% в группе I и 46,7% в группе II. Второй по частоте - трубно-перитониальный фактор: по 40% в обеих группах. Хотя и не было выявлено статически значимых отличий в частоте указанных факторов в обеих группах, однако сочетание факторов достоверно чаще ($\varphi^*=21,3$ $p<0,05$) было выявлено во второй группе (53% против 28% в первой группе).

Кроме того, анализ данных анамнеза о перенесенных гинекологических заболеваниях показал преобладание удельного веса женщин с хроническим сальпингоофаритом, хроническим эндометритом и инфекций, передающихся половым путем (ИППП) во второй группе, однако выявленные различия укладывались в рамки статистической погрешности ($\chi^2=1,9$, $p>0,05$).

Гинекологическая патология	Группа I, число, %	Группа II, число, %
Сальпингоофарит	3 (12%)	2 (13%)
ИППП	2 (8%)	2 (13%)
Хронический эндометрит (ХЭ)	3 (12%)	2 (13%)

Таблица 2. Частота перенесенных гинекологических заболеваний

Частота выполненных внутриматочных и лапароскопических вмешательств во второй группе была достоверно выше ($\phi^*=19,1$, $p<0,05$), чем в первой (29% против 7%, соответственно).

При морфологическом исследовании в 1-й и 2-й группах эндометрий соответствовал ранней и средней фазе секреции. При оценке поверхностного эпителия было обнаружено, что на апикальной поверхности имелись выпячивания (пиноподии) в среднем 60% в первой группе и 40% - во второй.

При оценке экспрессии рецепторов ER и PR в железах и строме были выявлены: в 1-й группе ER в строме $50 \pm 7\%$ и $100 \pm 12\%$ в железах; PR в строме $200 \pm 20\%$, $50 \pm 5\%$ - в железах. В 2-й группе ER в строме $50 \pm 5\%$ и в железах $90 \pm 9\%$; PR в строме $100 \pm 15\%$ и в железах - $50 \pm 4\%$.

При оценке экспрессии LIF в 1-й группе отмечалась высокая степень экспрессии (5-6 баллов) преимущественно в железах и люминальном эпителии. Тогда как в 2-й группе экспрессия локализовалась в железах и варьировала от полного отсутствия до высокой, при этом обращала на себя внимание локализация преимущественно в базальных отделах и отсутствие - в апикальном.

Для прогнозирования исхода ВРТ был использован последовательный анализ по методу А. Вальда (A. Wald) в модификации Е.В. Гублера (1990). В результате было получено решающее правило, позволяющее корректно соотнести каждую обследованную в одну из групп: «положительный исход», «негативный исход» с возможной ошибкой гиподиагностики $< 5\%$ и гипердиагностики $< 10\%$.

Прогностические факторы	Варианты ответов	
	1	2
Наличие более одного фактора бесплодия: 1) Да 2) Нет	-0,5	1,2
Внутриматочные вмешательства: 1) Да 2) Нет	-0,3	0,6
ER: 1) Вне нормы 2) Норма	-2,5	2
PR: 1) Вне нормы 2) Норма	- 1,2	0,3
LIF: 1) Вне нормы 2) Норма	-1	0,7
Пиноподии 1) До 20% поверхности 2) Более 20% поверхности	-0,2	0,4

Таблица 3. Прогностические коэффициенты

Принятие решения производилось следующим образом: заполняя опросный лист на каждую обследованную, врач суммирует прогностические коэффициенты по каждому вопросу листа (таблица 3), получая «суммарный прогностический коэффициент» (СПК). Если СПК положительный – прогноз благоприятный, если отрицательный – неблагоприятный.

Заключение. Имплантационные свойства эндометрия и его прегравидарная подготовка являются важными составляющими для наступления беременности и во многом определяют успех ЭКО. Поиск маркеров, позволяющих оценить имплантационные свойства эндометрия, является актуальным и представляет интерес для клиницистов.

В ходе исследования были оценены наиболее диагностически значимые иммуногистохимические маркеры, вовлеченные в процесс имплантации. Установлено что экспрессия рецепторов ER, PR и LIF являются диагностически ценными, с учетом анамнестических особенностей.

Список литературы

1. *Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению. Под ред. В.И. Кулакова.* 2005. М., ГЭОТАР, Медиа, 616 с.
2. Fiedler K, Wurfel W. 2004. Effectivity of heparin in assisted reproduction. *Eur. J. Med. Res.*, Vol. 9, P. 207-214.
3. *The Endometrium.* 2002. Glasser S.R., ed. London: Taylor&Francis, 675 p.
4. Schüring A.N., Braun J., Wüllner S. 2011. mRNA-expression of ER α , ER β , and PR in clonal stem cell cultures obtained from human endometrial biopsies. *The Scientific World Journal*, Vol. 11, P. 8-16.
5. Nikas G., Aghalanova L. 2002. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation. *Reprod. Biomed. Online*, Vol. 4, N3, P. 18—23.
6. Cheng J.G., Chen J.R., Hernandez L. 2001. Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation. *PNAS*, Vol. 98, P. 8680-8685.

Протеинкиназа АТМ и длина теломер при атаксии-телеангиэктазии

Куранова М.Л.^{1,4*}, Ледащева Т.А.², Тулуш Е.К.², Рунов А.Л.¹, Молодан Л.А.³, Гречанина Е.Я.³, Плескач Н.М.¹, Спивак И.М.¹, Михельсон В.М.¹

¹ Институт цитологии РАН, Российская Федерация

*Тихорецкий пр.4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064

Тел.:+79215509985, e-mail:miryakuranova@gmail.com

²СПб ГКУЗ Диагностический центр (медико-генетический), Российская Федерация

³Харьковский специализированный медико-генетический центр, Украина

⁴Санкт-Петербургский Государственный Политехнический Университет, Российская Федерация

Резюме. Атаксия-телеангиэктазия (АТ) является тяжелым наследственным

нейродегенеративным заболеванием, развивающимся при наличии мутаций в обоих аллелях гена *atm*. Ген *atm* кодирует ключевой белок клеточного ответа на повреждение ДНК - протеинкиназу АТМ. При возникновении двунитевых разрывов ДНК протеинкиназа АТМ автофосфорилируется, и в клетке появляется ее активная форма – фосфо-АТМ (Р-АТМ), обнаруживаемая модифицированным методом непрямой иммунофлуоресценции. В работе описаны некоторые особенности протеинкиназы АТМ и длины теломер при АТ.

Ключевые слова: атаксия-телеангиэктазия, ген *atm*, иммунофлуоресценция, протеинкиназа АТМ, теломеры

The protein kinase ATM and telomere length at ataxia-telangiectasia

¹ Institute of Cytology RAS, Russian Federation

* Tickorezky ave. 4, St. Petersburg, Russian Federation, 194064

Tel.:+79215509985, e-mail.: miryakuranova@gmail.com

² St.Petersburg Center for Medical Genetics, Russian Federation

³ Kharkov Specialized Medical Genetic Center, Ukraine

⁴ St. Petersburg Polytechnic University, Russian Federation

Summary. Ataxia-telangiectasia (AT) is a severe hereditary neurodegenerative disease developing when mutation occurs in both alleles of the *atm* gene which encodes the key protein of the cellular response to DNA damage (DDR), ATM protein kinase. In response to the occurrence of double-strand DNA breaks, the ATM protein kinase passes the autophosphorylation, and its active form, the phospho-ATM (P-ATM), appears in cells. This active form can be detected by indirect immunofluorescence method. Some of the features of the protein kinase ATM and telomere length at AT has been described.

Key words: ataxia-telangiectasia, atm gene, immunofluorescence, protein kinase ATM, telomere.

Введение. Синдром АТ характеризуется мозжечковой атаксией и кожно-конъюнктивальной телеангиэктазией. На сегодняшний день известно, что данный синдром (имеющий также названия синдром Луи-Бар, синдром Бодер-Седжвика, ранняя прогрессирующая мозжечковая атаксия и цефало-окуло-кутанная телеангиэктазия) является тяжёлым прогрессирующим мультисистемным нейродегенеративным заболеванием из группы факоматозов, наследуемым по аутосомно-рецессивному типу (ОМММ заболевания: 208900, ОМММ гена *atm*: 607585). Для больных характерны патология центральной нервной системы (ЦНС), кожи, глаз, иммунологические нарушения, высокая предрасположенность к неоплазиям, прогероидные черты, резко повышенная чувствительность к ионизирующему излучению, ограниченная пролиферативная способность клеток и значительное укорочение теломер уже при рождении ребёнка. Частота заболевания варьирует в различных популяциях от 1:40000 до 1: 100000-300000 населения, но доля гетерозиготных носителей гена *atm* в популяции значительно выше, чем можно ожидать по распространенности самого заболевания, и составляет от 1 до 7%, видимо, из-за пренатальной гибели части носителей гомозигот. Причиной данного заболевания является мутация в гене *atm*. Ген локализован в 11 хромосоме (11q23), имеет размер 150 т.п.н. и содержит 66 экзонов [1-3].

Белок АТМ (*ataxia-telangiectasia mutated*), неактивный или отсутствующий в клетках больных АТ, - протеинкиназа, являющаяся ключевым регулятором механизма клеточного ответа на повреждение ДНК и возникновения конформационных изменений хроматина [4, 5]. При этом протеинкиназа АТМ, обычно находящаяся в неактивной димерной форме, автофосфорилируется по серину в 1981 положении и диссоциирует на две активные

протеинкиназы – фосфо-АТМ (Р-АТМ), моментально начинающих фосфорилирование более чем 600 белков-мишеней (как активируя, так и ингибируя их активность) [6, 5]. Кроме того, такие мишени АТМ как Nbs1, BRCA1, FANCD2, SMC1 принимают участие в процессах репарации ДНК и аресте S-фазы клеточного цикла [12-16]. При АТ функционирование белка АТМ нарушено и, как следствие, становится невозможным адекватный ответ клетки на повреждение ДНК, что приводит к накоплению в ней нерепарируемых повреждений. В этих условиях резко повышается риск клеточной трансформации или вероятность быстрого перехода к состоянию необратимого прекращения пролиферации, т.е. к преждевременному клеточному старению [5]. Симптомы преждевременного старения и повышенный риск развития злокачественных опухолей обнаруживаются и у родителей больных – гетерозиготных носителей мутантного гена *atm* [17, 18].

Ранее в нашей лаборатории было экспериментально подтверждено, что в клетках больных АТ одновременно реализуются две противоположно направленные программы развития: ускоренного старения – повышение количества классических маркеров старения, таких как SA- β -gal, SAHF, HP1- γ , γ -H2AX, 53BP1; и трансформации – резкое снижение эффективности процессов репарации ДНК и высокий уровень хромосомных перестроек [19-21]. Опираясь на динамику процессов репарации ДНК после гамма-облучения, можно выявить не только наличие самого синдрома АТ, но и его гетерозиготное носительство [22, 23]. Например, время, на которое достоверно различается появление детектируемых количеств белка Р53 после гамма-облучения в клетках здорового человека и больных АТ, равно 1 часу. Эта разница объясняется тем, что функцию АТМ по фосфорилированию Р53 через какое-то время способна взять на себя родственная протеинкиназа АТР, дефект которой приводит к развитию другого наследственного заболевания – синдрома Секеля [24]. В клетках таких пациентов в ответ на повреждение ДНК появление *p21Waf1/Cip1* – ингибитора циклинзависимых киназ – происходит со значительной задержкой [20]. Также АТ сопровождается эпигенетическими изменениями, в первую очередь – нарушением фосфорилирования лизина в 9-м положении гистона H3 (H3-K9). Количество его триметилированной формы (Me3-H3-K9) в клетках больных существенно различается и может служить прогностическим маркером течения заболевания: при его снижении в клинической картине преобладают черты ускоренного старения,

при повышении – сниженного иммунитета и опухолеобразования [25]. На данный момент описаны более 100 мутаций в гене *atm*, приводящих к АТ [26, 27]. Развитие болезни начинается примерно с двух лет и, в зависимости от мутации, прогрессирует к 10 – 20 годам. Клиническая картина при разных формах АТ схожа, но в то же время характеризуется определенным клиническим полиморфизмом [17, 4, 28].

Важным, и в то же самое время индивидуальным, параметром, характеризующим процесс старения, является укорочение длины теломер - концевых участков эукариотических хромосом [29, 30], в то же время некоторые авторы не обнаруживают прямой связи возраста обследованных с длинами теломер [31].

Изучение длины теломер в ДНК различных тканей у людей в возрасте от новорожденных до столетних показало, что она уменьшается на 29-60 пар оснований (п. о.) в год в печени, в коре почек и в селезенке, но не в коре мозжечка или в миокарде [32]. На момент рождения величина длины теломер в лимфоцитах пуповинной крови варьирует от 6 до 15 т.н. Показана роль генов *ATM* и *WRN* в поддержании длины теломер [33, 34] и ассоциация их укорочения с клеточным старением [29] и старением организма [35].

Цель работы: исследовать *in vitro* на фибробластах больных АТ, больных атаксией другой этиологии, больных с другими синдромами нарушения репарации ДНК и здоровых доноров особенность протеинкиназы фосфо-АТМ методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием антител к фосфорилированной форме АТМ (Р-АТМ). Измерить во всех исследуемых линиях длины теломер.

Материалы и методы. В работе были использованы следующие клеточные линии дермальных фибробластов кожи, полученные в лаборатории радиационной цитологии:

1SP - донора 30 лет, имеющего инвалидность 2-й группы, не страдающего АТ; АТ6SP - больной 26 лет атаксией-телеангиэктазией с лёгкой формой заболевания; АТ8SP -- больного 11 лет с тяжелой формой заболевания; Ss1SP-больной 1 года с синдромом Секкеля; АТ7SP-больной 4 лет с атаксией, вызванной опухолью мозжечка; XP2SP- больной 16 лет с пигментной ксеродермой; P1SP-пациента 4 лет с симптомами, клинически сходными с АТ; P2SP- пациента 13 лет с симптомами, клинически сходными с АТ; P3SP- пациента 20 лет с симптомами, клинически

сходными с АТ; 2SP- донор 56 лет с гипертанией, нарушением работы печени, почек.

Клетки выращивались в пластиковых флаконах, на чашках Петри в специальных условиях при 37°C в атмосфере с содержанием 5% CO₂. Получение первичной культуры фибробластов кожи проводилось при помощи стандартной методики из предплечья донора со строгим соблюдением всех правил стерильности. Полученные фрагменты кожи помещали в чашку Петри в питательную среду и инкубировали, меняя питательную среду 1 раз в 4-7 сут. до появления достаточной конfluenceции фибробластов. При достижении необходимого монослоя клетки снимали с подложки с помощью раствора трипсин-ЭДТА и культивировали в чашках Петри в стандартных условиях. Индукция повреждений ядерной ДНК исследуемых клеток проводили при помощи рентгеновского облучения на установке РУМ-17 в дозе 2 Гр или радиомиметиком (блеомицином в концентрации 50-100 мкг/мл). Визуализация в клетках фосфорилированной формы белка АТМ проводилась через 30 мин после облучения или через 1 ч от начала экспозиции с блеомицином. В качестве контроля использовали интактные клетки, отмытые от культуральной среды раствором PBS, первичные антитела – IgG мыши против белка АТМ, фосфорилированного по серину в 1981 положении (Cell Signaling, США) в разведении 1:100, вторые антитела – козы антимышинные IgG, конъюгированные с ФИТЦ, в разведении 1:500 (Sigma-Aldrich Co., США). Для анализа воспроизводимости все тесты проводили по 3 и более раз. Микроскопию и анализ изображений проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 5 PASCAL. Выделение ДНК из клеточных линий проводилось согласно инструкции специального набора «Сорбент-К» для выделения ДНК из биологических материалов. Анализ длины теломер фибробластах кожи проводился методом количественной ПЦР (Real-time PCR) по взятому из литературы оригинальному протоколу [36].

Результаты. При окрашивании полученных препаратов антителами к протеинкиназе АТМ, фосфорилированной по серину в 1981 положении наблюдались закономерные различия между клетками больных АТ и лиц, не страдающих этим заболеванием. Как видно на рисунке, фокусы не образуются в ядрах клеток больных АТ (Рис. д, е) после повреждения ионизирующей радиацией в дозе 2 Гр, то есть данная протеинкиназа не активна, в

отличие от клеток донора, не страдающего АТ (Рис. ж, з). Также фокусы образовывались в клетках больной пигментной ксеродермой (Рис. л), больной синдромом Секеля (Ss1SP) (Рис. м) и больной атаксией, вызванной опухолью мозжечка АТ7SP (Рис. и).

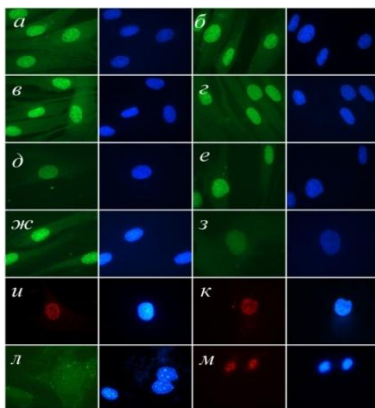


Рисунок. Фосфорилированная форма белка АТМ в исследуемых линиях: Клетки пациента 4 лет с симптомами, клинически сходными с АТ (P1SP) после облучения в дозе 2 Гр (а) и интактные (б); пациента 13 лет с симптомами, клинически сходными с АТ (P2SP) после облучения в дозе 2 Гр (в) и интактные (г); больного 11 лет с тяжелой формой заболевания АТ (АТ8SP) после облучения в дозе 2 Гр (д) и интактные (е); донора 30 лет, имеющего инвалидность 2 группы, не страдающего АТ (1SP) после облучения в дозе 2 Гр (ж) и интактные (з); больной 4 лет с атаксией, вызванной опухолью мозжечка (АТ7SP) после воздействия 50 мкгр/мл блеомицина (и); пациента 13 лет с симптомами, клинически сходными с АТ (P2SP) после воздействия 50 мкгр/мл блеомицина (к); больной 16 лет с пигментной ксеродермой (XP2SP) после воздействия 50 мкгр/мл блеомицина; больной 1 года с синдромом Секеля (Ss1SP) после воздействия 50 мкгр/мл блеомицина.

Результаты измерений длин теломер представлены в таблице.

Клеточная линия	Пассаж	Возраст	Длина теломер (т.н)
АТ9SP	4	1,5	3.2
1SP	5	30	3.3

AT8SP	11	12	4.3
AT6SP	12	26	3.3
P1SP	4	4	3.6
P2SP	4	13	3.5
XP2SP	7	16	2.9
2SP	3	56	3.1
P3SP	0	20	2.6

Таблица 1. Длина теломер дермальных фибробластов исследуемых линий

Закключение. На клеточном уровне повышенная радиочувствительность описана не только при АТ, а также у пациентов с Нийменгенским синдромом ломкости хромосом (мутация в гене NBS1), RS-SCID (ген специфической расщепляющей ДНК-шпильки нуклеазы Artemis), синдромом LIGIV (ген лигазы IV, lig IV), ATLD (AT-like disease, ген RAD50), синдромом Вернера (ген нуклеазы-геликазы WRN), синдромом Ли-Фромени (гетерозиготное носительство мутаций в гене P53). Некоторые из этих генов, как P53 и NBS1, являются прямыми мишенями протеинкиназы АТМ, другие же принимают участие в процессе репарации двуниевых разрывов и зависят от активности АТМ опосредованно. Есть данные о случаях повышенной радиочувствительности клеток больных с синдромами, возникающими при мутациях в генах эксцизионной репарации нуклеотидов, таких как синдром Коккейна и пигментная ксеродерма. Причина повышенной клеточной радиочувствительности в этих случаях менее очевидна. Для выяснения этой причины крайне интересными представляются полученные нами различия в клеточных паттернах фосфорилирования белка АТМ: у здоровых доноров фосфорилированная форма АТМ после повреждения ДНК выявляется в ядрах клеток, а у больной пигментной ксеродермой (XP2SP) - преимущественно в цитоплазме, как это видно на рисунке (Рис. л). Эти различия в локализации фосфорилированной формы АТМ свидетельствуют о замедлении или нарушении переноса активной молекулы из цитоплазмы в ядро клетки (если автофосфорилирование происходит в цитоплазме) или изменении самого компартмента автофосфорилирования (если в норме оно происходит в ядре, непосредственно рядом с участком поврежденной ДНК) [37]. В случае атаксии неясной этиологии

(AT7SP) процесс автофосфорилирования ATM идет так же, как у здорового донора, и фосфо-ATM локализуется в ядре, хотя процесс репарации ДНК после действия ионизирующей радиации у этого больного замедлен, а количество маркеров старения в клетках повышено [20, 21]. То есть в обоих этих случаях, несмотря на повышенную клеточную радиочувствительность и даже сопутствующую ей (в случае AT7SP) атаксию, ген ATM остается функционально активным, тогда как в случае AT8SP неактивен и фосфо-ATM после действия повреждающих агентов ни в ядре, ни в цитоплазме не выявляется.

Также можно сделать вывод, что пациенты P1SP и P2SP с симптомами, клинически сходными с AT, не страдают этим заболеванием (Рис. а, б, в, г), т.к. картина их клеточной реакции в ответ на повреждение схожа с таковой для здоровых лиц или лиц, страдающих другими тяжёлыми заболеваниями. Можно также заключить, что для данного теста в качестве повреждающего агента можно использовать как ионизирующее излучение, так и радиомиметик (блеомицин): фокусы образуются и достаточно отчётливо визуализируются при использовании обоих способов. Способность протеинкиназы фосфо-ATM возникать в ответ на повреждения можно использовать при необходимости уточнения диагноза AT в неясных случаях, а также для разработки диагностики заболевания на доклинической стадии, в том числе при проведении инвазивной пренатальной диагностики в семьях больных AT.

При анализе длин теломер дермальных фибробластов кожи исследуемых линий, несмотря на результаты других работ [33, 34], можно сделать вывод, что длина теломер больных AT не ниже, чем у пациентов, не страдающих AT, с другими тяжёлыми заболеваниями и болезнями преждевременного старения.

Работа выполнена в рамках договора о научном сотрудничестве с Украинским институтом клинической генетики Харьковского национального медицинского университета, кафедрой медицинской генетики (ХНМУ) и с Харьковским специализированным медико-генетическим центром от 11 января 2011г. при поддержке РФФИ (проект № 10-04-00267-а) и Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

Список литературы

1. Savitsky K., Bar-Shira A., Gilad Sh., Rotman G., Ziv Ya., Vanagaite L., Tagle D.A., Smith S., Uziel T., Sfez Sh., Ashkenazi M., Pecker I., Frydman M., Harnik R., Patanjali S.R., Simmons A., Clines G.A., Sartiell A., Gatti R.A., Chessa L., Sanal O., Lavin M.F., Jaspers N. G. J., Taylor A.M.R., Arlett C.F., Miki T., Weissman Sh.M., Lovett M., Collins F.S., Shiloh Yo. 1995. A Single Ataxia Telangiectasia Gene with a Product Similar to P1-3 Kinase. *Science*. 268.P.1749-53.
2. Lavin M.F., Khanna K.K. 1999. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol*. 75(10).P.1201
3. Pulverer B. 2003. ATM Machine. *Nat Cell Biol*. 5(2).P.96.
4. Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature*. 3.P.155-168.
5. Lavin M.F. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Molecular cell biology*. 9.P.759-69.
6. Bakkenist C.J., Kastan M.B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 421.P. 499-506.
7. Falck J., Mailand N., Syljuasen R.G., Bartek J., Jiri Luk J.2001. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*. 40.P.842-47.
8. Burdon D., Patel R., Charlliss R. A. J., Blank J.L.2002. Growth inhibition by the muscarinic M3 acetylcholine receptor: evidence for p21Cip1/Waf1 involvement in G1arrest. *Biochem*. 367.P. 549-55.
9. Kruse J.P., Gu W. 2009. Modes of p53 regulation. *Cell*. 137(4).P.609-22.
10. Mirzayans R., Andrais B., Scott A., Murray D. 2012, New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol*. P.170325.
11. Westphal CH. 1997.Cell-cycle signaling: Atm displays its many talents. *Curr Biol*. 7(12).P.R789-792.
12. Kitagawa R, Kastan MB. 2005. The ATM-dependent DNA damage signaling pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 70.P.99-109.
13. Taniguchi T., Garcia-Higuera I., Xu B., Andreassen P.R., Gregory R.C., Kim S.T., Lane W.S., Katsan M.B., D'Andrea A.D.2002.

Convergence of the Fanconi Anemia and Ataxia Telangiectasia Signaling Pathways. *Cell*. 109.P.459-472.

14. Xu B., O'Donnell A.M., Kim S.T., Kastan M.B. 2002. Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Res*. 62.P.4588-91.

15. Zhan H., Suzuki T., Aizawa K., Miyagawa K., Nagai R. 2010. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. *J Biol Chem*. 285(38).P.29662-70.

16. Yazdi P.T., Wang Y., Zhao S., Patel N., Lee E.Y., Qin J. 2002. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev*.16.P.571-82.

17. Спивак И.М. 1999. Наследственные заболевания с первичными и вторичными дефектами репарации ДНК. *Цитология*. 41(5).С.338-79.

18. Concannon P. 2002. ATM heterozygosity and cancer risk. *Nat Genet*. 32(1).P.89-90.

19. Хомасуридзе М.М., Спивак И.М., Плескач Н.М., Михельсон В.М. 1999. Особенности радиочувствительности клеток больных атаксией-телеангиэктазией. *Цитология*.41(5).С.412-19.

20. Полуботко Е.А., Смирнова Н.В., Плескач Н.М., Михельсон Н.М., Спивак И.М. 2009. Особенности преждевременного старения при атаксии-телеангиэктазии. *Цитология*. 51(8).С.712-718.

21. Полуботко Е.А., Шатрова А.Н., Плескач Н.М., Михельсон В.М., Спивак И.М. 2009. Клеточный репаративный потенциал в семьях больных атаксией-телеангиэктазией. *Цитология*. 52(12).С.978-85.

22. Спивак И.М., Смирнова Н.В., Плескач Н.М., Ледашева Т.А., Михельсон В.М. 1995. Особенности стабилизации белка Р53 в клетках больных атаксией-телеангиэктазией после гамма-облучения. *Цитология*. 47(10).С.898-906.

23. Спивак И.М., Смирнова Н.В., Плескач Н.М., Ледашева Т.А., Михельсон В.М. 1997. Дискриминация гетерозитного носительства атаксии-телеангиэктазии методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа. *Цитология*. 49(1).P. 55-61.

24. O'Driscoll M., Ruiz-Perez V.L., Woods C.G., Jeggo P.A., Goodship J.A. 2003. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nature Genetics*. 33.P.497-501.

25. Куранова М.Л., Спивак И.М. 2011. Эпигенетические изменения при атаксии-телеангиэктазии. НТВ СПбГПУ. 3(130).P. 252-56.
26. Sandoval N., Platzer M., Rosenthal A., Dörkl Th., Bendix R., Skawran B., Stuhmann M., Wegner R.D., Sperling K., Banin Sh., Shiloh Yo., Baumer A., Bernthaler U., Sennefelder H., Brohm M., Weber B. H.F., Schindler D.1999. Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. *Human Molecular Genetics*. 8(1).P. 69-79.
27. Lee et al., 2013
28. Lanzy G., Ballotin U., Franciotta D., Maserati E., Pasquali F., Veggiotti P. 1992. Clinical, Cytogenetic and Immunological Aspects in 4 Cases Resembling Ataxia Telangiectasia. *Eur Neurol*. 23.P.121-125.
29. Allsopp R. C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein S., Younglai E. V., Futcher A. B., Greider C. W., Harley C. B. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 89. P.10 114—10 118.
30. Михельсон В.М., Гамалей И.А. Укорочение теломер – единственный механизм старения // Рад. биология. Радиоэкология. – 2010. – Т. 50. – С. 269 – 275.
31. Bischoff C, Petersen HC, Graakjaer J, Andersen-Ranberg K, Vaupel JW, Bohr VA, Kølvrå S, Christensen K.No association between telomere length and survival among the elderly and oldest old. // *Epidemiology*. – 2006. – V. 17, №2. – P. 190 – 4.
32. Takubo K., Izumiyama-Shimomura N., Honma N., et al. Telomere lengths are characteristic in each human individual. // *Exp. Gerontol.* - 2002. – V. 37. – P. 523–31.
33. Smilenov L.B., Morgan S.E., Mellado W., Sawant S.G., Kastan M.B., Pandita T.K. 1997. Influence of ATM function on telomere metabolism. *Oncogene* 15.P.2659–65.
34. Machwe A., Xiao L., Orren DK. 2004. TRF2 recruits the Werner syndrome (WRN) exonuclease for processing of telomeric DNA. *Oncogene* 23. P.149–56.
35. Tomas-Loba A, Flores I, Fernandez-Marcos PJ, Cayuela ML, Maraver A, Tejera A et al. (2008) Telomerase reverse transcriptase elays aging in cancer-resistant mice. *Cell* 135:609–22
36. Cawthon R.M., 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*,30(10):e47.
37. Lavin M.F., Kozlov S. 2007.ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle*. 6(8). P.931-942.

Опыт внедрения фармакогенетического тестирования на модели многопрофильного медицинского центра

Лифшиц Г.И.^{1,2}, Кох Н.В.^{1,2}, Слепухина А.А.^{1,2}, Солдатова Г.С.³

¹ Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН

пр. Лаврентьева, 8, Новосибирск, Россия, 630090, e-mail: Natalikokh@gmail.com

² Центр Новых Медицинских Технологий в Академгородке ул. Пирогова, 25/4, Новосибирск, Россия, 630090

³ Академический диспансерный филиал ЦКБ СО РАН Воеводского ул., 18, Новосибирск, Россия, 630090

Experience in implementation of molecular genetic testing in the practice of a large medical center

Lifshits G.I.^{1,2}, Kokh N.V.^{1,2}, Slepukhina A.A.^{1,2}, Soldatova G.S.³

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS

Lavrentiev ave, 8, Novosibirsk, Russia, 630090, e-mail: Natalikokh@gmail.com

² Center of New Medical Technologies in Akademgorodok Pirogov str., 25/4, Novosibirsk, Russian Federation, 630090

³ Akademicheskyy dispensary affiliated CCH SB RAS

Voevodskogo str., 18, Novosibirsk, Russian Federation, 630090

Диагностика лежит в основе медицинской деятельности. В современной медицине эта сфера претерпевает серьёзные изменения, приводящие к новым значениям данного термина и к кардинальным переменам в подходах и принципах лечения. Внедрение анализа генетических маркеров дает возможность оценивать дополнительные факторы риска, влияющие на тяжесть заболевания, расшифровывать индивидуальный патогенез у конкретного пациента, персонизировать лечение, снизить риск нежелательных лекарственных реакций.

Несмотря на огромное количество научных публикаций о значении генетических маркеров и внедрении молекулярно-генетического тестирования в рутинную работу ведущих клиник мира, в России, особенно за Уралом, большинство населения не имеет доступа к высокотехнологичным диагностическим исследованиям, также имеет место недостаточная информированность медицинского персонала.

В Центре Новых Медицинских Технологий в Академгородке, благодаря сотрудничеству с лабораториями Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН), есть возможность выполнения необходимых молекулярно-диагностические тестов для пациентов. Лабораторией Персонализированной Медицины с 2006 г., впервые в Сибирском округе, ведется работа, направленная на развитие молекулярной медицины в нашей клинике. Внедрение в клиническую медицинскую практику научных разработок принято называть Трансляционной медициной (ТМ). Это подразумевает использование результатов фундаментальных исследований, которые приобретают прикладной характер, в работе рядовых клиник, что позволяет соответствовать задачам современной медицины и способствует прогрессивному развитию здравоохранения.

В рамках развития ТМ в ЦНМТ выделились несколько направлений. Первое - внедрение генетических тестов, позволяющих предсказать у пациента развитие заболевания или его течение, а также позволяющих скорректировать образ жизни здорового человека для профилактики развития патологии. Второе - внедрение фармакогенетических тестов. Третье – информирование врачей центра о достижениях молекулярной медицины, включая проведение регулярных научно-образовательных семинаров. Для широкого применения молекулярных анализов специалистами центра врачом-генетиком разрабатываются соответствующие интерпретации и пояснения результатов тестирования. Активно применяются молекулярно-генетические тесты по выявлению пациентов, входящих в группы высокого риска развития многофакторных заболеваний.

Повышение риска тромбоза может быть обусловлено предрасположенностью к усилению активности тромбоцитарного звена гемостаза (Gr-IIIa, Gr-Iba, Gr-Ia), к гиперкоагуляции (FII, FV, FXI, FXII, FBG, FGG), к снижению фибринолитической активности плазмы: (PAI-1, PLAT, FXIII), к снижению активности антикоагулянтных белков (PROC, SERPINC1), к нарушению обмена метионина и гомоцистеина, обусловленная полиморфными вариантами генов ферментов фолатного цикла (MTHFR, MTRR, MTR, MTHFD, CBS).

В феврале 2011 г. нами получено свидетельство Федерального Агентства по надзору в сфере здравоохранения РФ «Молекулярно-генетическая методика оценки риска

предрасположенности к тромбозу» ФС №2011/004. Выявление генетических факторов риска тромбоза показано молодым пациентам с выявленными эпизодами тромбоза или гиперкоагуляции, пациентам с отягощенным семейным анамнезом, пациенткам, которым планируется назначение комбинированных оральных контрацептивов или заместительной гормональной терапии, пациенткам с привычным невынашиванием беременности и другим группам пациентов.

Регуляция артериального давления происходит с помощью координированной работы нескольких гормонально-ферментативных систем – катехоламиновой, ренин-ангиотензиновой и др. Присутствие патологических аллелей генов ключевых белков этих систем повышает вероятность декомпенсации регулировки уровня артериального давления при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды – курении, стрессов, ожирения, что приводит к артериальной гипертонии. Высокий риск гипертонической болезни может быть повышен за счет изменений в следующих генах: ADRB1, ADRB2, ADRB3, GNB3 ACE, AGT, ADD1, ATGR1, ATGR2, CYP11B2. Пациентам с гипертонической болезнью или высоким риском её развития, с учетом результатов генетического тестирования, может быть подобрана индивидуальная антигипертензивная терапия. Например, при носительстве аллеля Arg389 гена ADRB1 эффект от β-адреноблокаторов более значительный, а пациентам с вариантом гена альдостеронсинтазы CYP11B2, который ассоциирован с увеличением уровня альдостерона, патогенетически обосновано назначение блокатора альдостерона – верошпирона (спиронолактона) в случае появления симптомов заболевания.

Проводится поиск наиболее частых мутаций в генах (а при необходимости секвенирование) BRCA1, BRCA2 для выявления пациенток с высоким риском рака молочной железы и яичников. Кроме того, выявляются пациенты с генетически обусловленным риском развития остеопороза (CALCR, COL1a1, FDPS, VDR (BsmI), VDR (TaqI), VDR (ApaI), VDR (FokI), ESR1, получающие рекомендации по индивидуальной профилактики и выбору лечения), болезни Бехтерева (HLA-B27), синдрома Жильбера (UGT1A1) - наследственной доброкачественной гипербилирубинемии, гемохроматоза (HFE282, HFE63), целиакии (HLA: DQ2.2, DQ2.5, DQ7, DQ8, IL22), сахарного диабета II типа с определением чувствительности к сульфонилмочевине (TCF7L2ABCC8, SLC22A1) и других патологических состояний.

Молекулярно-генетическое тестирование применяется для решения вопросов репродукции. Пациентки, наблюдающиеся по беременности в нашем центре, тестируются на наследственную тромбофилию и дефекты генов метаболизма фолатов для своевременного принятия мер по профилактики осложнений (самопроизвольных выкидышей, гестоза, фетоплацентарной недостаточности и врожденных пороков развития плода). Пациентам с азооспермией назначается анализ на делеции в AZF локусах для выявления наследственного фактора заболевания и дифференцирования пациентов, которым показано применение вспомогательных репродуктивных технологий (носители AZFc), и тем, для кого они не будут эффективны (носители AZFa, AZFb), могут быть рекомендованы донорские программы.

Диагностика некоторых орфанных заболеваний востребована как для пациентов, имеющих подозрение на эти болезни, так для скрининга на гетерозиготное носительство рецессивных заболеваний пар, планирующих беременность, для профилактики рождения детей с такой патологией. Скрининг на наследственные болезни может быть проведен на имеющемся в ИХБФМ СО РАН оборудовании - биочиповом анализаторе iScan с использованием чипа HumanCytoSNP-12. Данный микрочип содержит около 300000 маркеров, что позволяет, с помощью программного обеспечения, с высокой точностью визуализировать результат в виде идиограммы с соответствующими хромосомными изменениями, в том числе с показателями числа копий повторов участков ДНК, и вариантов потери гетерозиготности, что значительно превышает возможности стандартного кариотипирования.

Наибольший интерес для нашей лаборатории представляет фармакогенетика – наука, изучающая влияние генетических маркеров на особенности реакции организма в ответ на медикаментозное воздействие. Накоплено достаточное количество конкретных результатов научных экспериментов для того, чтобы начать использовать в практической медицине генетические тесты для прогнозирования индивидуального ответа пациента на лекарственные средства.

Около 50% вариабельности дозы варфарина объясняется генетическими полиморфизмами, влияющими на метаболизм препарата [1]. Основными генными маркерами, влияющими на подбор дозы варфарина являются аллельные варианты генов VCORC1 -1639 G>A, CYP2C9*1/*2/*3, CYP4F2 V433M [2, 3].

Продукт гена VCORC1 – молекулярная мишень варфарина, при связывании которого блокируется регенерация восстановленной формы витамина К и снижается активация витамин К- зависимых факторов свертывания крови. В гене VCORC1 обнаружены несколько полиморфных замен, которые находятся в сильном неравновесии по сцеплению и объединены в гаплогруппы (гаплогруппа А ассоциирована с меньшей дозой варфарина, гаплогруппа В – с большей). Основным катализатором метаболизма варфарина является цитохром CYP2C9. Носительство аллелей *2 и *3 приводит к снижению его активности, что влияет на индивидуальную дозу варфарина и риск НЛР [4, 5].

Нами был сформирован банк образцов ДНК пациентов Западно-Сибирского региона, принимающих варфарин с известными дозами, подобранными эмпирическим путем. При статистической обработке результатов получены достоверные отличия средних ежедневных доз варфарина в зависимости от генотипа C1173T VKORC. Для пациентов с генотипом CC средняя доза составила $7,1 \pm 2,3$ мг, с генотипом CT – $4,8 \pm 1,9$, с генотипом TT – $2,8 \pm 0,6$ мг. [6]

Далее мы проводили сравнение фармакогенетического и эмпирического подхода подбора индивидуальной дозы варфарина в рамках всероссийского консорциума «Варфаген». Мы наблюдали 34 пациента, нуждающихся в длительной антикоагулянтной терапии, в течение 6-и месяцев. Половине из них доза варфарина подбиралась с учетом фармакогенетических анализов, а остальным – эмпирическим методом.

Основным предиктором развития кровотечений являются высокие значения международного нормализованного отношения (МНО) В течение 6 месяцев наблюдения за 34 пациентами было выполнено 501 измерение МНО. В группе со стандартным подходом достоверно чаще обнаруживались эпизоды чрезмерной гипокоагуляции ($p=0,004$). Подбор дозы варфарина на основании генотипирования, по сравнению со стандартным алгоритмом, приводит к сокращению сроков, требующихся для подбора индивидуальной дозы, в среднем на 5 дней ($p=0,001$). Достижение целевых значений МНО в более короткий срок ведет к снижению количества осложнений из-за неадекватной гипокоагуляции при инициации лечения.

У всех пациентов, вошедших в исследования, индивидуальная терапевтическая доза варфарина варьировала на протяжении срока наблюдения, что ещё раз подчеркивает

необходимость регулярного лабораторного контроля всем пациентам, принимающим этот препарат. Отмечено, что более выраженные колебания индивидуальной дозы наблюдались у пациентов, имеющих аллели гена CYP2C9, ассоциированные с замедлением скорости метаболизма. У пациентов, имеющих генотип *1/*1 CYP2C9, индивидуальная ежедневная доза в течение 6 месяцев изменялась на $29 \pm 16\%$. У пациентов, имеющих генотипы *1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3, доза изменялась на $50 \pm 18\%$ ($p = 0,0058$). Это объясняется тем, что цитохром CYP2C9 не специфичен для варфарина, он метаболизирует 16% применяемых лекарственных средств, поэтому параллельное назначение таких препаратов может снижать потребность в варфарине за счет конкурентного снижения скорости инактивации варфарина. Кроме того, ряд препаратов потенцирует действие цитохрома CYP2C9, что может приводить к увеличению скорости метаболизма и потребовать повышение дозы варфарина [7, 8]. По некоторым данным, прием амиодарона, который усиливает антикоагулянтное действие варфарина, может вносить до 20% в вариабельность дозы ($p < 0,001$) [9]. Для пациентов-носителей двух «медленных» аллелей CYP2C9 (*2/*2, *2/*3, *3/*3) с высокой вероятностью будет трудно достичь стабильного контроля над терапией варфарином. Пациенты с медленными аллелями цитохрома CYP2C9 имеют наиболее высокий риск осложнений при терапии непрямыми антикоагулянтами.

Был изучен фармакогенетический подход для персонализации терапии клопидогрелем у пациентов Западно-Сибирского региона. Присутствие у пациента вариантов *2 и/или *3 гена CYP2C19 ассоциировано с отсутствием или снижением дезагрегантного эффекта клопидогреля и требует повышения его дозы, или замены на другое альтернативное лекарственное средство, ввиду риска тромбоза [10].

Основная работа на данном этапе сосредоточена на исследовании фармакогенетического подхода к назначению статинов, с целью трансляция в клиническую практику для повышения эффективности и безопасности их применения. В метаболизме статинов участвует ген SLCO1B1. Для носителей варианта гена SLCO1B1(*5) высока вероятность миопатий, вплоть до рабдомиолиза, при их применении [11]. Снижение скорости метаболизма статинов, обусловленное полиморфными вариантами цитохромов CYP2D6(*3,*4) и CYP3A4(*3), повышает риск гепатотоксичности. В зависимости от наличия полиморфных

вариантов в гене того или другого цитохрома, возможно подобрать наиболее безопасный препарат. Продукт гена HMGCR является мишенью для статинов, вариации в данном гене могут приводить к недостаточной эффективности терапии [12].

Нами создается группа пациентов (общее число около 200), принимающих статины по клиническим показаниям. У них будет проведено генотипирование для определения полиморфных вариантов генов, связанных с метаболизмом статинов HMGCR rs17238540, CYP2D6(*3,*4), SLCO1B1(*5), CYP3A4(*3), и осуществлен клинический и лабораторный контроль биохимических показателей через 1, 2, 3 и 6 месяцев. Для оценки гиполлипидемического эффекта статинов будет определен липидный спектр, для оценки возникновения НЛР (гепатотоксичности), определены биохимические показатели активности печеночных ферментов - АЛТ, АСТ, ГГТП, оценка возникновения миалгий на основе жалоб и определения уровня КФК (по показаниям).

Будут определены клинические, лабораторные и генетические особенности, связанные с вариабельностью действия аторвастатина, симвастатина и розувастатина у пациентов Западно-Сибирского региона. На основе полученных данных будет разработана программа персонализированного назначения статинов и клинических рекомендаций с учетом вклада генетических факторов. Для всех исследований было получено разрешение локального этического комитета.

Накоплено достаточное количество конкретных результатов научных экспериментов для того, чтобы начать использовать в практической медицине генетические тесты для прогнозирования индивидуального ответа пациента на лекарственные средства. У пациентов с одинаковыми диагнозами может сильно различаться эффективность одних и тех же лекарственных средств. Для большей части пациентов лекарство будет эффективно, однако у некоторых возникнут нежелательные побочные реакции или для достижения терапевтического эффекта потребуются более высокие дозировки. Предварительное молекулярно-генетическое тестирование перед назначением препарата поможет предсказать индивидуальный ответ пациента на терапию и избежать нежелательных реакций.

Работа выполнена в рамках проекта « Фундаментальные науки – медицине- 2012-20».

Список литературы

1. Caldwell M. D., Awad T., Johnson J. A., Gage B. F. 2008. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood*, V. 111, P. 4106–4112.
2. Rieder M. J., Reiner A. P., Gage B. F., et al. 2005. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose, *N. Engl. J. Med.* V. 352, P. 2285–2293.
3. Yuan H. Y., Chen J. J., Lee M.T., et al. 2005. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. In: *Hum. Mol. Genet.*, V. 14, P. 1745–1751.
4. Sanderson S., Emery J., Higgins J. 2005. CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGenet systematic review and meta-analysis. *Genet. Med.*, V. 7, P. 97–104.
5. Sconce E.A., Khan T.I., Wynne H.A., et al. 2005. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood*, V. 106, P. 2329–2333
6. Belozerceva L.A., Voronina E.N., Kokh N.V. 2012. Personalized approach of medication by indirect anticoagulants tailored to the patient-Russian context: what are the prospects? *EPMA J*, 3(1):10.
7. Shrif N.E.M.A., Won H.-H., et al. 2011. Evaluation of the effects of VKORC1 polymorphisms and haplotypes, CYP2C9 genotypes, and clinical factors on warfarin response in Sudanese patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, V. 67, C. 1119–1130.
8. Wadelius M., Leslie Y., et al. 2007. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet.*, V.121, P. 23–34.
9. Cen H.-J., Zeng W.-T., et al. 2010. CYP4F2 rs2108622 rs2108622: a minor significant genetic factor of warfarin dose in Han Chinese patients with mechanical heart valve replacement. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, V. 70, P. 234–240.
10. Кнауэр Н.Ю., Лифшиц Г.И. 2012. Возможности генетического тестирования для оптимизации персонализированной терапии клопидогрелем пациентов Западно-Сибирского региона России. *Бюллетень*

Восточно- Сибирского научного центра СО РАМН, №2, С.143-152.

11. Feng Q, Wilke RA ,Baye TM. 2012. Individualized risk for statin-induced myopathy: current knowledge, emerging challenges and potential solutions. In: *Pharmacogenomics*, V. 13, P.579-594.
12. Trompet S., de Craen A.J., Postmus I. 2011. PROSPER Study Group. Replication of LDL GWAs hits in PROSPER/PHASE as validation for future (pharmaco)genetic analyses. *BMC Med. Genet.*, V. 12, P.131.

Мутация $BRAF^{T1799A}$ – частое молекулярное событие патогенеза папиллярной микрокарциномы щитовидной железы

Маньковская С.В.

Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси
Академическая ул., 28, Минск, Беларусь, 220072
Тел.: +375 17 2841796, e-mail: mankovskaya.svetlana@gmail.com

Ключевые слова: папиллярный рак щитовидной железы, ген BRAF

The $BRAF^{T1799A}$ mutation is a frequent molecular event of pathogenesis of papillary thyroid microcarcinoma

Mankovskaya S.V.

Institute Physiology National Academy Sciences of Belarus
Akademicheskaya str., 28, Minsk, Belarus, 220072
Тел.: +375 17 2841796, e-mail: mankovskaya.svetlana@gmail.com

Key words: papillary thyroid carcinoma, gene BRAF

Введение. Папиллярная микрокарцинома (ПМК) щитовидной железы (ЩЖ) – опухоль диаметром 10 мм и менее [1]. По данным аутопсийных исследований, эта нозологическая форма широко распространена у лиц обоего пола [2, 3] и в настоящее время, благодаря развитию визуализирующей техники, обнаруживается почти у половины пациентов, оперированных по поводу тиреоидного рака [1, 3].

Клиническое течение ПМК чрезвычайно вариабельно: от медленно развивающихся, - иногда подвергающихся спонтанной регрессии, - до инфильтрирующих опухолей со множественными

метастазами в регионарных лимфатических узлах шеи и легких. Поэтому предлагаются и различные подходы в хирургическом лечении: от органосохраняющей операции до тотальной тиреоидэктомии с двусторонней модифицированной шейной диссекцией [4, 5]. В связи с этим одной из задач современной тиреодологии является поиск признаков, определяющих характер опухолевого процесса.

По данным различных авторов, в 29 – 69% случаев папиллярной тиреоидной карциномы обнаруживается активирующая точечная мутация T1799A в 15 экзоне гена *BRAF* (*BRAF*^{T1799A}), приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту в 600-аминокислотном остатке соответствующего полипептида [6-10]. Результаты исследований, оценивающих прогностическое значение *BRAF*^{T1799A} мутации, весьма противоречивы. В некоторых работах показано существование связи точечной мутации T1799A в гене *BRAF* с экстра tireоидным распространением опухоли, стадией заболевания и метастазированием в регионарные лимфоузлы и отдаленные органы [6-8]. Однако эти сведения не были подтверждены другими научными группами [9, 10].

Цель исследования заключалась в определении частоты распространения *BRAF*^{T1799A} мутации в ПМк ЩЖ и анализ ее связи с клинико-морфологическими характеристиками заболевания.

Материал и методы. Проведен поиск активирующей мутации T1799A в гене *BRAF* в биопсийном материале 26 морфологически верифицированной ПМк ЩЖ. Исследуемая группа включала 5 мужчин и 21 женщину, средний возраст которых составил 37±11 лет (от 19 до 53 лет). Всем пациентам до операции выполнялась тонкоигольная аспирационная биопсия под контролем ультразвукового сканера «Hitachi EUB-405» с линейным датчиком частотой 7,5 МГц. Полученный биоптат направлялся на цитологический анализ, а смывы из пункционной иглы использовали для выделения ДНК. Для проведения молекулярного тестирования получено добровольное информированное согласие пациентов.

Тотальную ДНК экстрагировали с помощью реагента TRIzol («GibcoBRL Life Technologies», США) по протоколу фирмы-производителя. Поиск онкогенов *BRAF*^{T1799A} осуществляли методом специфической амплификации мутантного аллеля. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с двумя парами праймеров: одна из них (OPF: 5'-AGCCATGGTATGTA CTGTGAATGCAA-3' и

OPR: 5'-TCCGTGGGAAAATCAGTGACC-3') служила для детекции ДНК в ПЦП-продукте, а другая (BRAF mut Ex15F: 5'-GTGATTTTGGTCTAGCTACAGA-3' и BRAF Int15R: 5'-GATTTTGTGAATACTGGGAACSTATGA-3') – для точковой мутации в 15 экзоне гена *BRAF*. В реакционную смесь (конечный объём 25 мкл) добавляли 5 мкл раствора исследуемой ДНК (10-100 нг) и амплифицировали с использованием полимеразы AmpliTaq Gold («Applied Biosystems», США) при следующих условиях: 94°C – 10 мин; 40 циклов 94°C – 30 сек, 58°C – 30 сек; 72°C – 30 сек. Продукты ПЦП подвергались электрофорезу в течение 30 мин в горизонтальных блоках 1,5% агарозы с последующим окрашиванием бромистым этидием. Результаты электрофоретического разделения фрагментов визуализировались при помощи камеры с ультрафиолетовой подсветкой. Наличие активирующей мутации в гене *BRAF* в исследованном образце определяли по присутствию в геле фрагмента длиной 204 п.о. (рис.1).

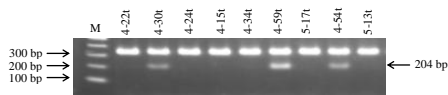


Рисунок 1. Электрофореграмма ПЦП-продуктов при скрининге точковой мутации Т1799А в гене *BRAF*

Статистическая обработка данных выполнена с помощью программы Microsoft Excel. Различия между сопоставляемыми показателями определяли с применением теста ранговой корреляции Спирмена и двустороннего теста Фишера.

Результаты. Точковая мутация Т1799А в гене *BRAF* обнаружена в 15 (57,7%) из 26 случаев ПМк ЩЖ. Отметим, что в аналогичных исследованиях, выполненных в России и Португалии, частота этого молекулярного повреждения оказалась значительно ниже (29,0% и 40,0%, соответственно) [11, 12].

Проведен сравнительный клиничко-морфологический анализ *BRAF*-позитивных и *BRAF*-негативных ПМк, результаты которого представлены в таблице.

Параметры	Наличие мутации <i>BRAF</i> (n = 15)	Отсутствие мутации <i>BRAF</i> (n = 11)
Соотношение м:ж	1:4	1:4,5

Средний возраст, лет	43,7*	32,5
III – IV стадия заболевания	3 (20,0%)	2 (18,2%)
Регионарные метастазы	4 (26,7%)	6 (54,5%)
Многофокусный рост	2 (13,3%)	2 (18,2%)
Наличие капсулы новообразования	4 (26,7%)	2 (18,2%)
Фоновый неспецифический тиреоидит	5 (33,3%)	7 (63,6%)

* $p=0,007$ по сравнению *BRAF*-негативными карциномами

Таблица 1. Сравнительная клиничко-морфологическая характеристика папиллярных микрокарцином щитовидной железы при наличии/отсутствии мутации в 15 экзоне гена *BRAF*

Как видно из таблицы, ПМк при наличии в опухолевых клетках точковой мутации T1799A в гене *BRAF* развивались в более позднем возрасте (43,7 лет) по сравнению со случаями с неизмененным геном, где средний возраст пациентов составил 32,5 лет ($p=0,007$). Метастазы в регионарные лимфатические узлы шеи реже регистрировались при *BRAF*-позитивных, чем при *BRAF*-негативных ПМк (26,7% и 54,5%, соответственно). В обеих подгруппах количество наблюдений со множественными очагами опухолевого роста и с III – IV стадией заболевания существенно не различались. Изученные ПМк в малой степени проявляли инвазивные свойства. Не выявлено ни одного случая инвазии в собственную капсулу узла, в капсулу ЩЖ и выходом за её пределы. Аналогичные результаты получены при исследовании ПМк у российских и португальских пациентов. В то же время у китайских и корейских пациентов мутация T1799A оказалось связана с экстра tireоидным распространением [13, 14], что, возможно, указывает на этнические особенности в биологическом поведении аденокарцином. Отметим также, что ПМк, несущие активирующую мутацию в гене *BRAF*, чаще обнаруживались в нормальной железистой ткани, чем на фоне сопутствующего иммуно-воспалительного процесса в ЩЖ, однако эти различия оказались статистически недостоверны.

ПМк с мутированным и неизмененным геном *BRAF* обнаруживались приблизительно с одинаковой частотой при размерах опухоли 1-3 мм и 4-6 мм. При размере опухолевого узла от 7 до 10 мм количество случаев с точковой мутацией T1799A оказалось в 1,7 раза больше, чем *BRAF*-негативных (Рис 2). Аналогичные результаты были получены в ранее опубликованной работе [13].

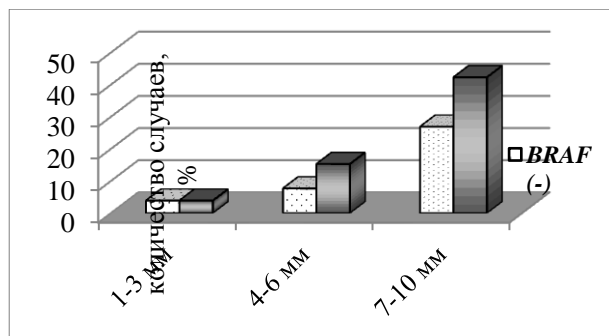


Рисунок 2. Частота *BRAF* генотипов у больных ПМк в зависимости от размера опухоли

При гистологическом исследовании 440 ПМк Лушников и соавт. обнаружили метастазы в регионарные шейные лимфоузлы в 107 случаях (24,3%) и установили, что по мере увеличения размера опухоли склонность её к лимфогенному метастазированию возрастает [15]. В данной работе регионарные метастазы найдены в 10 наблюдениях (38,5%), из них в 2-х случаях при размере опухоли 1-3 мм, в 2-х – при 4-6 мм и в 6-ти – при 7-10 мм. При распределении этих случаев по генотипу выявлено, что при размере опухолевого узла до 6 мм *BRAF*-позитивные и *BRAF*-негативные микрокарциномы с регионарными метастазами обнаруживались с одинаковой частотой (по 50,0%), а при размере опухоли от 7 до 10 мм количество случаев с метастатическим поражением регионарных лимфатических узлов шеи оказалось в 2 раза выше при отсутствии мутации T1799A в гене *BRAF* (66,7% против 33,3%). Таким образом, при увеличении размера опухолевого узла обнаружена тенденция к увеличению частоты ПМк с мутированным геном *BRAF*, характеризующихся более низкой частотой регионарного метастазирования по сравнению с ПМк с неизмененным геном *BRAF*.

Заключение. Полученные данные демонстрируют, что мутация *BRAF*^{T1799A} является частым молекулярным событием патогенеза папиллярной микрокарциномы ЩЖ., но, по-видимому, этот онкоген нельзя рассматривать в качестве потенциального маркера опухолевой инвазии и метастазирования. Вместе с тем полученные результаты носят предварительный характер и требуют более тщательной проверки на большей выборке.

Список литературы

1. Rosai J. 2004. Thyroid gland. In: *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology: 9th edition*. Elsevier Inc., P.515-594.
2. Harach H.R. Franssila K.O., Wasenius V.M. Occult papillary carcinoma of the thyroid cancer. 1985. *Cancer*. Vol.56. P. 531-538.
3. Bramley M.D., Harrison B.J. 1996. Papillary microcarcinoma of the thyroid gland. *Brit. J. Surg*. Vol. 83. P. 1674-1683.
4. Appetecchia M., Scarcello G., Pucci E. et al. 2002. Outcome after treatment of papillary thyroid microcarcinoma. *J Exp. Clin. Cancer Res*. Vol. 21. P. 159-164.
5. Ito Y., Tomoda C., Urono T. et al. 2004. Papillary microcarcinoma of the thyroid: How should it be treated? *World J Surg*. Vol. 28. P. 1115-1121.
6. Kim K.H., Kang D.W., Kim S.H. et al. 2004. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med. J*. Vol. 45. P. 818-821.
7. Namba H., Nakashima M., Hayashi T. et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. 2003. *J Clin. Endocrinol. Metab*. Vol. 88. P. 4393-4397.
8. Xing M., Westra W.H., Tufano R.P. et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. 2005. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. Vol. 90. № 12. P.6373-6379.
9. Puxeddu E., Moretti S., Elisei R., Santeusanio F. BRAF (V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. 2004. *J Clin. Endocrinol. Metab*. Vol. 89. P. 2414-2420.
10. Trovisco V., Soares P., Preto A. et al. 2005. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. *Virchows Arch*. Vol. 446. № 6. P.589-595.
11. Sedliarou I., Saenko V., Lantsov D. et al. 2004. The BRAFT1796A transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma. *Int. J Oncol*. Vol. 25. № 6. P.1729-1735.
12. Trovisco V., Castro V., Soares P. et al. 2004. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol*. Vol. 202. P.247-251.

13. Kwak J.Y., Kim E.K., Chung W.Y. et al. 2009. Association of BRAFV600E mutation with poor clinical prognostic factor and US features in Korean patients with papillary thyroid microcarcinoma. *Radiology*. Vol.253. №3. P.854-860.
14. Lee X, Gao M, Ji Y. et al. 2009. Analysis of differential BRAF(V600E) mutational status in high aggressive papillary thyroid microcarcinoma. *Ann Surg. Oncol*. Vol.16. №2. P.240-245.
15. Лушников Е.Ф., Втюрин Б.М., Цыб А.Ф. 2003. Микрокарцинома щитовидной железы. М.: Медицина, 264

**Пренатальная ДНК-диагностика наиболее частой
хромосомной патологии на основе количественной
флуоресцентной ПЦР (КФ-ПЦР) в Беларуси**

Осадчук Т.В., Новикова И.В., Савенко Л.А., Шепелевич Е.В.,
Плевако Т.А., Крицкая Т.М., Подлециук Л.В.*

ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»,
МЗ РБ

Орловская ул., 66/7, Минск, Республика Беларусь, 220053

Тел.: +375172335575, e-mail: t.asadchuk@gmail.com

**Prenatal DNA diagnostics of the most frequent
chromosomal pathology on the basis of quantitative fluorescent
PCR analysis in Belarus**

Asadchuk T.V., Novikova I.V., Savenko L.A., Shepelevich E.V., Plevako
T.A.,*

Kritskaya T.M., Padliashchuk L.V.

Republican Medical Center “Mother and Child”

Orlovskaya str., 66/7, Minsk, Belarus, 220053

Тел.: +375172335575, e-mail: t.asadchuk@gmail.com

Summary. Numerical abnormalities of human chromosomes (aneuploidies) are the most frequent cause of congenital human pathology. The frequency of trisomy for chromosome 21 (Down syndrome) constitutes 1:780 newborns in Belarus. One of the most effective strategies of molecular diagnostics of aneuploidies is based on quantitative PCR analysis. On the basis of current molecular genetic technologies a method of DNA diagnostics of the most frequent

aneuploidies has been developed, using multiplex PCR and automated capillary electrophoresis based on the simultaneous testing of 15 microsatellite markers of chromosomes 13, 18, 21, X, Y in a single analysis. Method was tested on the samples with known numerical chromosomal abnormalities. Besides, with this particular test, we have analyzed 200 DNA samples from fetus having the risk of chromosomal pathology. As the result, numerical chromosomal abnormalities were identified in 19 cases.

Введение. Числовые аномалии хромосом являются одной из наиболее частых причин врожденной патологии человека. Частота наиболее распространенной трисомии хромосомы 21 составляет в Беларуси 1 на 780 новорожденных [1]. Кроме того, наличие анеуплоидии у плода является одной из ведущих причин самопроизвольных аборт и невынашивания беременности.

В настоящее время в Беларуси пренатальная и постнатальная диагностика числовых аномалий хромосом проводится с помощью стандартного кариотипирования, надежного и широко используемого метода выявления хромосомных болезней. Тем не менее, он имеет недостатки – трудоемкость, относительно высокую стоимость и, что особенно важно, большую длительность выполнения анализа - 3-4 недели [2].

Современные молекулярно-генетические технологии позволяют проводить эффективную диагностику числовых аномалий хромосом с применением ДНК-анализа. Наибольшее распространение получил метод количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции (КФ-ПЦР) [3-7]. Для выявления анеуплоидий исследуют области хромосом, содержащие полиморфные тандемные повторы - микросателлитные маркеры. С целью увеличения информативности, как правило, используют 3-4 маркера на каждую хромосому [8]. Метод КФ-ПЦР основан на количественном определении аллелей микросателлитных маркеров с использованием флуоресцентно-меченых праймеров. Важно отметить, что эта технология не заменяет исследования кариотипа. В пренатальной диагностике данный метод применяется в качестве дополнительного при необходимости быстрого исследования отдельных хромосом кариотипа плода с высоким риском наличия хромосомной патологии, в том числе и с хромосомным мозаицизмом.

Целью исследования являлась разработка и внедрение эффективной технологии ДНК-диагностики наиболее частых числовых аномалий хромосом человека.

Материалы и методы. Для исследования были сформированы две группы. В первую группу вошли 29 плодов, абортированных после установления хромосомной патологии с помощью цитогенетического анализа (кариотипирования). По результатам скрининга первого триместра, в 10 из 19 случаев беременные женщины имели высокий комбинированный риск хромосомной патологии у плода. В остальных девяти случаях были обнаружены видимые при УЗИ пороки развития плода.

Во вторую группу вошли 200 беременных женщин, имеющих риск хромосомной патологии у плода, у которых на момент проведения молекулярно-генетического исследования анализ кариотипов плодов находился в работе.

В качестве биологического материала в первой группе использовали ДНК, экстрагированную из фрагментов мышечной ткани абортированных плодов. Во второй группе использовалась ДНК плодов, выделенная из клеток амниотической жидкости (амниоцитов). Амплификацию проводили с использованием праймеров, фланкирующих последовательности, содержащие микросателлитные маркеры. В ПЦР использовались меченые варианты прямых праймеров, имеющие одну из четырех флуоресцентных меток. Продукты ПЦР анализировали с помощью автоматического капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 310. Обработку данных и определение аллелей выполняли, используя пакет компьютерных программ GENESCAN.

Результаты. На основании изучения баз данных проведен отбор микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y. Для определения уровня гетерозиготности и информативности микросателлитных маркеров выполнен анализ исследуемых фрагментов ДНК в 50 образцах (100 хромосом) контрольной группы из популяции Беларуси. Гетерозиготность маркеров рассчитывали по формуле $H=1-\sum q^2$, исходя из закона Харди-Вайнберга для мультиаллельных локусных систем. Полученные данные свидетельствуют о том, что все маркеры обладают высоким уровнем гетерозиготности (от 62% до 96%) и могут быть эффективно использованы для определения анеуплоидий хромосом 13, 18, 21 и X методом количественного определения аллелей внутриллокусных микросателлитных маркеров.

Отработаны условия мультиплексной ПЦР, включающие состав и концентрации компонентов реакционной смеси и оптимальные температурно-временные характеристики для синтеза

фрагментов ДНК, содержащих тестируемые маркеры. Разработан метод ДНК-диагностики наиболее частых хромосомных анеуплоидий (трисомия по хромосомам 13, 18 и 21, числовые аномалии X хромосомы) и триплоидии с использованием мультиплексной ПЦР и автоматического капиллярного электрофореза. Методика включает в себя одновременное исследование 15 микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y.

Тестирование образцов ДНК от плодов с установленной хромосомной патологией по данным цитогенетического анализа, с использованием разработанного протокола, показало совпадение с результатами кариологической диагностики во всех 29 случаях, что свидетельствует о высокой информативности разработанного протокола.

Разработанный протокол был также использован для анализа анеуплоидий в группе из 200 беременных женщин, имеющих риск хромосомной патологии у плода по данным пренатального скрининга. Числовые аномалии хромосом были идентифицированы в 19 образцах ДНК (9,5%) и включали трисомию хромосомы 21 у 8 плодов (4%), трисомию хромосомы 18 у 5 плодов (2,5%), трисомию хромосомы 13 у 1 плода – 0,5%) и триплоидию у 3 плодов (1,5%). Во всех случаях диагноз, установленный с помощью ДНК-анализа, был подтвержден кариотипированием. С помощью молекулярно-генетического анализа также были идентифицированы случаи редкой хромосомной патологии: мозаицизм по моносомии хромосомы X (кариотип 45,X[50]/46,XY[5]) у 1 плода (0,5%) и наличие трех хромосом 13 и 21 и двух хромосом 18 и X у 1 плода (0,5%). По данным кариологического анализа установлен мозаичный кариотип 67,XX,-18[14]/47,XX,+18[1]. С помощью ДНК-анализа были обследованы родители пробанда и установлено, что дополнительный набор в триплоидном клоне имел отцовское происхождение.

Нами также проанализированы временные характеристики разработанного протокола. Показано, что результат ДНК-диагностики числовых аномалий хромосом при применении технологии КФ-ПЦР может быть получен менее чем через 6 часов после выполнения амниоцентеза. Это значительно сокращает время диагностики числовых аномалий хромосом и позволяет прервать беременность при обнаружении тяжелой хромосомной патологии в оптимальном сроке.

Заключение. Молекулярно-генетический анализ может быть рекомендован для выявления трисомии хромосом 21 (синдром Дауна), 13 (синдром Патау), 18 (синдром Эдвардса), моносомии X (синдром Шерешевского-Тернера), полисомии X, дополнительной хромосомы X в мужском кариотипе (синдром Кляйнфельтера), триплоидии в следующих случаях: при проведении пренатальной диагностики у плодов, имеющих высокий риск хромосомной патологии; новорожденным и пациентам с клиническими признаками хромосомной патологии; при установлении диагноза у плодов, прерванных по медико-генетическим показаниям. Данная технология может применяться также для установления родительского происхождения дополнительной хромосомы при анеуплоидии или хромосомного набора при триплоидии, а также для определения зиготности плодов при многоплодной беременности для оценки генетических рисков. Однако результаты ДНК-анализа дают информацию о состоянии только определенного локуса, и этот метод не может заменить стандартный хромосомный анализ. В случае наличия в кариотипе мозаицизма (двух и более клеточных клонов) регистрируемая электрофореграмма может иметь нестандартный вид и, в некоторых ситуациях, сложности в интерпретации. Для выявления такой патологии требуются другие методы исследования. Только комплексное исследование, включающее ДНК-анализ и цитогенетический анализ позволяет определять кариотип и механизм формирования аномалии при сложной хромосомной патологии.

Список литературы:

1. Никитина, В.А. Молекулярно-генетические методы пренатальной диагностики анеуплоидий / В.А. Никитина, Е.Ю. Воскобоева, Е.А. Калашникова // Российский вестник акушера-гинеколога. 2009. № 5. С. 35–38.
2. Антоненко, В.Г. Рекомендации по обеспечению качества и надежности цитогенетических исследований. Европейские стандарты для цитогенетических исследований конституциональных и приобретенных хромосомных аномалий / В.Г. Антоненко, И.Г. Лильп // Мед. генетика. 2008. № 3. С. 13–33.
3. Баранов, В.С. Цитогенетика эмбрионального развития человека / В.С. Баранов, Т.В. Кузнецова. Ст-Петербург, издательство Н-Л 2007. С. 370–371.

4. Dudarewicz, L. [et al.] Molecular methods for rapid detection of aneuploidy / L. Dudarewicz [et al.] // J. Appl. Genet. – 2005. – Vol. 46, № 2. – P. 207–215.

5. Mansfield, E.S. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms / E.S. Mansfield // Hum. Mol. Genet. 1993. Vol. 2. P. 43–50.

6. Pertl, B. [et al.] Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome / B. Pertl [et al.] // Lancet. 1994. Vol. 343. P. 1197–1198.

7. Schmidt, W. [et al.] Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk / W. Schmidt [et al.] // Mol. Hum. Reprod. 2000. Vol. 6, № 9. P. 855–860.

Пренатальная ДНК-диагностика наиболее частой хромосомной патологии на основе количественной флуоресцентной ПЦР (КФ-ПЦР) в Беларуси

Осадчук Т.В., Новикова И.В., Савенко Л.А., Шепелевич Е.В., Плевако Т.А., Крицкая Т.М., Подлециук Л.В.*

ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», МЗ РБ

Орловская ул., 66/7, Минск, Республика Беларусь, 220053

Тел.: +375172335575, e-mail: t.asadchuk@gmail.com

Резюме. Числовые аномалии хромосом (анеуплоидии) являются самой частой причиной врожденной патологии человека. Частота трисомии хромосомы 21 (синдром Дауна) составляет в Беларуси 1:780. Одним из эффективных подходов для быстрой диагностики анеуплоидий является метод флуоресцентной количественной ПЦР. На его основе разработан метод ДНК-диагностики наиболее частых анеуплоидий с использованием мультиплексной ПЦР и автоматического капиллярного электрофореза, позволяющий одновременно тестировать 15 микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y. Метод протестирован на биологическом материале с установленной с помощью кариотипирования хромосомной патологией. Также проанализировано 200 образцов ДНК плодов из группы риска по

выявлению хромосомной патологии, числовые аномалии хромосом обнаружены в 19 случаях.

Ключевые слова: пренатальная диагностика, числовые аномалии хромосом человека, анеуплоидия, количественная флуоресцентная ПЦР.

Prenatal DNA diagnostics of the most frequent chromosomal pathology on the basis of quantitative fluorescent PCR analysis in Belarus

Asadchuk T.V.; Novikova I.V., Savenko L.A., Shepelevich E.V., Plevako T.A.,*

Kritskaya T.M., Padliashchuk L.V.

Republican Medical Center "Mother and Child"

Orlovskaya str., 66/7, Minsk, Belarus, 220053

Tel.: +375172335575, e-mail: t.asadchuk@gmail.com

Summary. Numerical abnormalities of human chromosomes (aneuploidies) are the most frequent cause of congenital human pathology. The frequency of trisomy for chromosome 21 (Down syndrome) constitutes 1:780 newborns in Belarus. One of the most effective strategies of molecular diagnostics of aneuploidies is based on quantitative PCR analysis. On the basis of current molecular genetic technologies a method of DNA diagnostics of the most frequent aneuploidies has been developed, using multiplex PCR and automated capillary electrophoresis based on the simultaneous testing of 15 microsatellite markers of chromosomes 13, 18, 21, X, Y in a single analysis. Method was tested on the samples with known numerical chromosomal abnormalities. Besides, with this particular test, we have analyzed 200 DNA samples from fetus having the risk of chromosomal pathology. As the result, numerical chromosomal abnormalities were identified in 19 cases.

Key words: prenatal diagnosis, numerical abnormalities of human chromosomes, aneuploidy, quantitative fluorescent PCR.

Введение. Числовые аномалии хромосом являются одной из наиболее частых причин врожденной патологии человека. Частота наиболее распространенной трисомии хромосомы 21 составляет в Беларуси 1 на 780 новорожденных [1]. Кроме того, наличие анеуплоидии у плода является одной из ведущих причин самопроизвольных аборт и невынашивания беременности.

В настоящее время в Беларуси пренатальная и постнатальная диагностика числовых аномалий хромосом проводится с помощью стандартного кариотипирования, надежного и широко используемого метода выявления хромосомных болезней. Тем не менее, он имеет недостатки – трудоемкость, относительно высокую стоимость и, что особенно важно, большую длительность выполнения анализа - 3-4 недели [2].

Современные молекулярно-генетические технологии позволяют проводить эффективную диагностику числовых аномалий хромосом с применением ДНК-анализа. Наибольшее распространение получил метод количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции (КФ-ПЦР) [3-7]. Для выявления анеуплоидий исследуют области хромосом, содержащие полиморфные тандемные повторы - микросателлитные маркеры. С целью увеличения информативности, как правило, используют 3-4 маркера на каждую хромосому [8]. Метод КФ-ПЦР основан на количественном определении аллелей микросателлитных маркеров с использованием флуоресцентно-меченых праймеров. Важно отметить, что эта технология не заменяет исследования кариотипа. В пренатальной диагностике данный метод применяется в качестве дополнительного при необходимости быстрого исследования отдельных хромосом кариотипа плода с высоким риском наличия хромосомной патологии, в том числе и с хромосомным мозаицизмом.

Целью исследования являлась разработка и внедрение эффективной технологии ДНК-диагностики наиболее частых числовых аномалий хромосом человека.

Материалы и методы. Для исследования были сформированы две группы. В первую группу вошли 29 плодов, абортированных после установления хромосомной патологии с помощью цитогенетического анализа (кариотипирования). Во вторую группу вошли 200 беременных женщин, имеющих риск хромосомной патологии у плода, у которых на момент проведения молекулярно-генетического исследования анализ кариотипов плодов находился в работе.

В качестве биологического материала в первой группе использовали ДНК, экстрагированную из фрагментов мышечной ткани абортированных плодов. Во второй группе использовалась ДНК плодов, выделенная из клеток амниотической жидкости (амниоцитов). Амплификацию проводили с использованием праймеров, фланкирующих последовательности, содержащие

микросателлитные маркеры. В ПЦР использовались меченые варианты прямых праймеров, имеющие одну из четырех флуоресцентных меток. Продукты ПЦР анализировали с помощью автоматического капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 310. Обработку данных и определение аллелей выполняли, используя пакет компьютерных программ GENESCAN.

Результаты. На основании изучения баз данных проведен отбор микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y. Для определения уровня гетерозиготности и информативности микросателлитных маркеров выполнен анализ исследуемых фрагментов ДНК в 50 образцах (100 хромосом) контрольной группы из популяции Беларуси. Гетерозиготность маркеров рассчитывали по формуле $H=1-\sum q^2$, исходя из закона Харди-Вайнберга для мультиаллельных локусных систем. Полученные данные свидетельствуют о том, что все маркеры обладают высоким уровнем гетерозиготности (от 62% до 96%) и могут быть эффективно использованы для определения анеуплоидий хромосом 13, 18, 21 и X методом количественного определения аллелей внутрилокусных микросателлитных маркеров.

Отработаны условия мультиплексной ПЦР, включающие состав и концентрации компонентов реакционной смеси и оптимальные температурно-временные характеристики для синтеза фрагментов ДНК, содержащих тестируемые маркеры. Разработан метод ДНК-диагностики наиболее частых хромосомных анеуплоидий (трисомия по хромосомам 13, 18 и 21, числовые аномалии X хромосомы) и триплоидии с использованием мультиплексной ПЦР и автоматического капиллярного электрофореза. Методика включает в себя одновременное исследование 15 микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y.

Тестирование образцов ДНК от плодов с установленной хромосомной патологией по данным цитогенетического анализа, с использованием разработанного протокола, показало совпадение с результатами кариологической диагностики во всех 29 случаях, что свидетельствует о высокой информативности разработанного протокола.

Разработанный протокол был также использован для анализа анеуплоидий в группе из 200 беременных женщин, имеющих риск хромосомной патологии у плода по данным пренатального скрининга. Числовые аномалии хромосом были

идентифицированы в 19 образцах ДНК (9,5%) и включали трисомию хромосомы 21 у 8 плодов (4%), трисомию хромосомы 18 у 5 плодов (2,5%), трисомию хромосомы 13 у 1 плода (0,5%) и триплоидию у 3 плодов (1,5%). Во всех случаях диагноз, установленный с помощью ДНК-анализа, был подтвержден кариотипированием. С помощью молекулярно-генетического анализа также были идентифицированы случаи редкой хромосомной патологии: мозаицизм по моносомии хромосомы X (кариотип 45,X[50]/46,XY[5]) у 1 плода (0,5%) и наличие трех хромосом 13 и 21 и двух хромосом 18 и X у 1 плода (0,5%). По данным кариологического анализа установлен мозаичный кариотип 67,XX,-18[14]/47,XX,+18[1]. С помощью ДНК-анализа были обследованы родители пробанда и установлено, что дополнительный набор в триплоидном клоне имел отцовское происхождение. Отсутствие хромосомы 18 в триплоидной линии и наличие дополнительной хромосомы 18 в анеуплоидной линии, а также отцовское происхождение дополнительного набора свидетельствуют о механизме коррекции триплоидии, причем с нерасхождением хромосомы 18 и потерей гоносомы. Такая хромосомная нестабильность в процессе диплоидизации триплоидии была предсказана российским ученым М.Д. Голубовским [9].

По результатам скрининга первого триместра, в 10 из 19 случаев беременные женщины имели высокий комбинированный риск хромосомной патологии у плода. В остальных девяти случаях были обнаружены видимые при УЗИ пороки развития плода.

Нами также проанализированы временные характеристики разработанного протокола. Показано, что результат ДНК-диагностики числовых аномалий хромосом при применении технологии КФ-ПЦР может быть получен менее чем через 6 часов после выполнения амниоцентеза. Это значительно сокращает время диагностики числовых аномалий хромосом и позволяет прервать беременность при обнаружении тяжелой хромосомной патологии в оптимальном сроке.

Заключение. Молекулярно-генетический анализ может быть рекомендован для выявления трисомии хромосом 21 (синдром Дауна), 13 (синдром Патау), 18 (синдром Эдвардса), моносомии X (синдром Шерешевского-Тернера), полисомии X, дополнительной хромосомы X в мужском кариотипе (синдром Кляйнфельтера), триплоидии в следующих случаях: при проведении пренатальной диагностики у плодов, имеющих высокий риск хромосомной

патологии; новорожденным и пациентам с клиническими признаками хромосомной патологии; при установлении диагноза у плодов, прерванных по медико-генетическим показаниям. Данная технология может применяться также для установления родительского происхождения дополнительной хромосомы при анеуплоидии или хромосомного набора при триплоидии, а также для определения зиготности плодов при многоплодной беременности для оценки генетических рисков.

Однако результаты ДНК-анализа дают информацию о состоянии только определенного локуса, и этот метод не может заменить стандартный хромосомный анализ. В случае наличия в кариотипе мозаицизма (двух и более клеточных клонов) регистрируемая электрофореграмма может иметь нестандартный вид и, в некоторых ситуациях, сложности в интерпретации. Для выявления такой патологии требуются другие методы исследования. Только комплексное исследование, включающее ДНК-анализ и цитогенетический анализ позволяет определять кариотип и механизм формирования аномалии при сложной хромосомной патологии.

Благодарности. Выражаем искреннюю благодарность Наталии Виталиевне Ковалевой за помощь в обсуждении механизмов образования редкой хромосомной патологии.

Список литературы:

1. Зацепин И.О. 2004. Ауtosомные трисомии у потомков облученных родителей на примере синдрома Дауна: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Мн., 21 с.
2. Никитина В.А., Воскобоева Е.Ю., Калашникова Е.А. 2009. Молекулярно-генетические методы пренатальной диагностики анеуплоидий. *Российский вестник акушера-гинеколога*, № 5, С. 35–38.
3. Антоненко В.Г., Лильп И.Г. 2008. Рекомендации по обеспечению качества и надежности цитогенетических исследований. Европейские стандарты для цитогенетических исследований конституциональных и приобретенных хромосомных аномалий. *Мед. генетика*, № 3, С. 13–33.
4. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. 2007. Цитогенетика эмбрионального развития человека. Ст-Петербург, *издательство Н-Л*. С. 370–371.

5. Dudarewicz L., Holzgreve W., Jeziorowska A., Jakubowski L., Zimmermann B. 2005. Molecular methods for rapid detection of aneuploidy. *J. Appl. Genet.*, V. 46, № 2, P. 207–215.
6. Mansfield E.S. 1993. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum. Mol. Genet.*, V. 2, P. 43–50.
7. Pertl B., Yau S.C., Sherlock J., Davies A.F., Mathew C.G., Adinolfi M. 1994. Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome. *Lancet*, V. 343, P. 1197–1198.
8. Schmidt W., Jenderny J., Hecher K., Hackeloer B.J., Kerber S., Kochhan L., Held K.R. 2000. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Mol. Hum. Reprod.*, V. 6, № 9, P. 855–860.
9. Golubovsky M.D. 2003. Postzygotic diploidization of triploids as a source of an unusual cases of mosaicism, chimerism and twinning. *Hum. Reprod.*, V. 18, P. 236–242.

**Доминантные формы наследственной моторно-сенсорной
нейропатии I типа: клиничко-молекулярно-генетическая
диагностика в Беларуси**

Румянцева Н.В.^{1}, Осадчук Т.В.¹, Наумчик И.В.¹, Жевнеронек И.В.²,
Качан Ю.П.¹*

¹ ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»,
МЗ РБ

Орловская ул.66/8 Минск, Республика Беларусь, 220053

Тел. +375172880525, e-mail: rumiantseva@inbox.ru

² Белорусская медицинская академия последипломного
образования, Минск, Республика Беларусь

**Dominant forms of hereditary motor and sensory neuropathy I:
clinical and molecular diagnostics in Belarus**

Rumiantseva N.^{1}, Asadchuk T.¹, Naumchik I.¹, Jevneronok I.²,
Kachan J.¹*

¹ Republican Medical Centre “Mother and Child”,

Orlovskaya str., 66/8, Minsk, Belarus, 220053

Tel.: +375172880525, e-mail: rumiantseva@inbox.ru

² Belorussian Medical Academy of PostGraduate Education, Minsk, Belarus

Резюме. Наследственная моторно-сенсорная нейропатия I типа (НМСН I), обусловленная мутациями в генах миелиновых белков, манифестирует прогрессирующей мышечной слабостью, утратой рефлексов, расстройством чувствительности в конечностях по дистальному типу. Подтипы НМСН IA (дупликация гена RMP22) и НМСН IB (мутации гена MPZ) характеризуются аутосомно-доминантным наследованием, НМСН IX (мутации гена GJB1) наследуется по X-сцепленному доминантному типу. В работе представлены результаты мутационного анализа генов RMP22, MPZ, GJB1, проведенного в 51 семье с НМСН I (у 101 пациента выявлено 10 вариантов мутаций, в том числе 5 новых), соотношение подтипов: IA - 82.4%, IX - 13.7%, IB - 3.9%, клинические характеристики. Показана генетическая гетерогенность НМСН IA и IB, меж- и внутрисемейная вариабельность фенотипов при всех подтипах. Представлен диагностический алгоритм. Идентификация мутации позволяет определить генетический прогноз и провести ДНК-анализ генотипа плода в семьях с НМСН I.

Введение. Наследственная моторно-сенсорная нейропатия I типа (НМСН I) – демиелинизирующий тип нейропатии с преимущественным поражением мышц дистальных отделов конечностей. По данным литературы, частота всех форм НМСН в различных популяциях варьирует от 1 до 4 на 10000 [1]. Наиболее частые подтипы НМСН IA, IB и IX обусловлены мутациями в генах RMP22, MPZ, GJB1, кодирующих синтез миелиновых белков периферических нервов, характеризуются аутосомно-доминантным (IA и IB) и X-сцепленным доминантным (IX) наследованием [2, 3]. Пациенты (семьи) с НМСН подлежат проведению медико-генетического консультирования (МГК).

НМСН I манифестирует прогрессирующими моторными нарушениями, последовательной утратой сухожильных и периостальных рефлексов (СПР), сенсорными расстройствами в нижних конечностях, с последующим вовлечением верхних конечностей. При электронейромиографическом (ЭНМГ) исследовании регистрируются признаки симметричного полиневритического поражения преимущественно демиелинизирующего характера, снижение скорости проведения импульса (СПИ) по исследуемым нервам (<38 м/с), причем наибольшее значение придается СПИ по срединному нерву. Ввиду

выраженного сходства основных проявлений всех форм НМСН I, для выбора последовательности проведения ДНК-анализа предпринимались попытки выделить дифференцирующие клинические и ЭНМГ признаки отдельных подтипов [4, 5]. Алгоритмы клинико-молекулярно-генетической диагностики НМСН, используемые в зарубежных странах и России, были разработаны с учетом Международных диагностических критериев [6]. Поскольку распространенность НМСН в Республике Беларусь не установлена, поиск мутаций осуществлялся, исходя из наиболее частых, по опубликованным данным, генетических вариантов.

Цель исследования – проанализировать спектр мутаций, соотношение подтипов IA, IB, IX и клинические проявления при доминантных формах НМСН I у белорусских пациентов для оптимизации проведения ДНК-диагностики и МГК.

Материалы и методы. Объект исследования – пациенты с диагнозом НМСН I типа. Использованы клинико-генеалогический анализ, оценка неврологического статуса, ЭНМГ, молекулярно-генетические методы (ПЦР, фрагментный анализ, сиквенсный анализ). Образцы геномной ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови пациентов, были протестированы: на наличие дупликации гена PMP22, точковых мутаций в 6-ти экзонах гена MPZ, точковых мутаций в гене GJB1 у пробандов мужского пола. При обнаружении генного дефекта у пробанда анализ проводился всем доступным членам семьи. Для определения мутаций у плода использована ДНК, выделенная из амниоцитов.

Результаты. На этапе становления ДНК-диагностики НМСН I в Беларуси исследование с помощью молекулярно-генетических методов было проведено в отношении наиболее частой клинической формы – НМСН IA у 470 пациентов, направленных врачами-неврологами и генетиками с диагнозом болезнь Шарко-Мари-Тус, болезнь Русси-Леви, нервно-мышечное заболевание. Диагноз НМСН IA (дупликация гена PMP22) был верифицирован у 16,2% больных (76/470).

Поскольку эффективность ДНК-диагностики определяется точностью отбора больных группы риска, а врачи-неврологи недостаточно информированы о типах наследования и дифференцирующих критериях отдельных подтипов НМСН, было решено проводить молекулярно-генетическое обследование пациента/семьи после предварительного МГК в областных МГЦ или РНПЦ «Мать и дитя». Поиск мутаций в генах GJB1 и MPZ осуществлялся в группе пациентов, отобранных с учетом

Международных критериев [6]. ДНК-диагностика других генетических типов НМСН I в Беларуси не проводится.

Исследуемая группа лиц с подтвержденной НМСН I включает 51 семью с общим числом пациентов 101: 51 пробанд и 50 родственников. Соотношение по полу: 46 мужчин и 55 женщин. Распределение по возрасту дебюта НМСН I: манифестация на первой декаде жизни отмечена у 50% больных, на второй декаде – у 18,7%, взрослые лица с дебютом в 20-40 лет составили 31.2%. Доля семейных наблюдений при НМСН IA - 54.8%, НМСН IX – 85.7%, подгруппа НМСН IB недостаточно информативна, поскольку представлена 2-мя семьями, в одной из которых выявлены 4 носителя ранее не описанной мутации в 3 поколениях, в другой – один взрослый пациент (родители не доступны для исследования).

Для ДНК-диагностики НМСН IA использовались внутрилокусные микросателлитные маркеры хромосомы 17, сцепленные с геном PMP22: D17S2218, D17S2220, D17S2223, D17S2226, D17S2229. Все маркеры расположены на участке дупликации, имеют ди- или тетрануклеотидную структуру. Для усовершенствования молекулярно-генетического анализа нами были разработаны условия мультиплексной ПЦР, позволяющие одновременно анализировать три высокополиморфных динуклеотидных ДНК-маркера: D17S2218, D17S2223, D17S2229. Дупликация обнаружена в 42 семьях у 76 пациентов (42 пробанда и 34 родственника). После исключения дупликации гена PMP22 проводилось определение мутаций в гене GJB1 у пробандов мужского пола в семьях с предположительно X–сцепленным доминантным типом наследования - были идентифицированы 7 различных мутаций, включая 4 новые, у 7 пробандов и 13 родственников. Поиск мутаций в гене MPZ осуществлялся у пробандов женского и мужского пола, у которых были исключены изменения в генах PMP22 и GJB1: мутации IVS1-2A>C и Thr124Met обнаружены у 2-х пробандов и у 3-х родственников. Спектр мутаций представлен в таблице 1. Соотношение подтипов НМСН I в изученных семьях составило: IA - 82.4% (42/51), IX – 13.7% (7/51), IB - 3.9% (2/51).

№ п/п	Мутация	Положение мутации (нуклеотидная замена)	Изменение в кодирующем кодоне	Число пациентов
I	Ген	дупликация	-	76

	PMP22	локуса 17(p11.2)		
II	Ген GJB1			20
1.	Ser50Cys	c.149C>G*	TCC→TGC	3
2.	Leu90Ile	c.268C>A*	CTC→ATC	4
3.	Trp133Stop	c.398G>A*	TGG→TAG	2
4.	Tyr135Cys	c.404A>G	TAT→TGT	1
5.	Val181Met	c.541G>A	GTG→ATG	6
6.	Glu208Lys	c.622G>A	GAG→AAG	2
7.	Stop284Leu	c.851G>T*	TGA→TTA	2
III	Ген MPZ			5
1.	IVS1-2A>C	c.68-2A>C	agTG→cgTG	4
2.	Thr124Met	c.371C>T	ACG→ATG	1

Таблица 1. Мутации, обнаруженные у пациентов с НМСН I типа. * мутации, описанные впервые в мире

Основные клинические и ЭНМГ проявления НМСН I, по опубликованному данным, хорошо известны и являются общими для всех подтипов [7]. Характерная симптоматика разной степени выраженности (мышечная слабость в нижних конечностях, изменение походки, гипотрофия мышц голени, деформация стоп, последовательное снижение/выпадение СПР, нарушение чувствительности в конечностях по дистальному типу) была отмечена у всех пациентов с установленной мутацией. При ЭНМГ у всех обследованных отмечались признаки демиелинизирующего полиневритического поражения, симметричное снижение СПИ по срединному нерву < 38 м/сек (15,0 - 32,5 м/сек), денервационные изменения. Нарушения на ЭНМГ были также отмечены у детей 2-х и 3-х летнего возраста, унаследовавших мутацию IVS1-2A>C от матери-пробанда с НМСН IB, и не имеющих на момент обследования явных клинических симптомов. Интенционный тремор, атаксия, нистагм, нарушения рефракции и слуха, а также различные висцеральные проявления регистрировались у всех информативных по возрасту пациентов с НМСН IB. У мужчин с НМСН IX имели место более тяжелые проявления – ранний дебют, выраженное нарушение походки, деформация стоп (у части больных с необходимостью оперативной коррекции), утрата рефлексов, вовлечение верхних конечностей – совокупность моторных и сенсорных расстройств отмечена уже в течение первой-второй декады жизни. Анализ фенотипов изученных

пациентов в отношении признаков, выделенных российскими исследователями в качестве дифференцирующих для подтипов IV и IX, не позволил столь же однозначно оценить их значения для выбора последовательности проведения ДНК-анализа, возможно, вследствие небольшого числа пациентов с подтипами IV (3 взрослых пациентов, двое детей младшего возраста) и IX (9 информативных мужчин) в нашей выборке.

При анализе фенотипов больных с ранее не описанными мутациями не выявлено значимых особенностей в отношении возраста дебюта, течения, клинической картины. В исследованной группе семей с НМСН I при всех подтипах отмечена меж- и внутрисемейная вариабельность по возрасту манифестации и тяжести клинического симптомокомплекса. Активность креатинфосфокиназы у большинства пациентов определялась в пределах нормы.

Таким образом, диагностический алгоритм с целью выявления генетического варианта НМСН I включает следующие этапы. I. Первичная МГК. Клинико-генеалогический анализ: определение возраста манифестации, оценка неврологического статуса и данных ЭНМГ, установление числа больных в семье и типа наследования - аутосомно-доминантный (семейный или спорадический случай) либо X-сцепленный доминантный. II. ДНК-диагностика. Молекулярно-генетическое исследование начинается с поиска дупликации гена PMP22, как наиболее частой причины НМСН I типа, при ее исключении, делается выбор последовательности поиска мутаций в генах MPZ или GJB1 с учетом пола пациента, типа наследования и детального анализа клинических особенностей. III. МГК по результатам ДНК-диагностики. В семьях с установленным диагнозом (подтипом НМСН I) прогноз потомства определяется в соответствии с закономерностями наследования генетического варианта. При НМСН IA и IB, характеризующихся аутосомно-доминантным наследованием, пациенты имеют 50% риск рождения пораженного потомства (независимо от пола). Прогноз потомства сибсов/родственников пробандов определяется их генотипом: для носителей мутации риск рождения больного ребенка составляет 50%. В семьях с НМСН IX генетический прогноз определяется, исходя из X-сцепленного доминантного типа наследования: при наличии мутации у матери вероятность наследования полинейропатии для потомства составляет 50% с более тяжелыми проявлениями у сыновей; у отца с НМСН IX все дочери будут

наследовать мутацию с вариабельными клиническими исходами. В семьях с установленной мутацией в профилактических целях возможно определение генотипа плода. В Беларуси в семьях,отягощенных по НМСН IA, была проведена пренатальная ДНК-диагностика, в результате которой было исключено носительство мутации у плода.

Заклучение. Спектр мутаций, идентифицированных у 101 пациента с НМСН I, включая 5 новых, демонстрирует генетическую гетерогенность заболевания; соотношение подтипов в исследуемой выборке составляет: IA - 82.4%, IX – 13.7%, IB - 3.9%. При наличии ключевых диагностических признаков при всех подтипах НМСН I у пациентов отмечается меж- и внутрисемейная вариабельность по возрасту дебюта и тяжести клинической картины. Последовательность проведения ДНК-диагностики дупликации гена PMP22 и мутаций генов MPZ и GJB1 в нашей практике определяется распространенностью генетических вариантов с последующим учетом пола, типа наследования и наличия дифференцирующих признаков. Обоснованный отбор лиц группы риска по НМСН I типа для проведения молекулярно-генетической диагностики дает возможность подтвердить клинический диагноз, установить генетический дефект, повысить эффективность диагностического этапа и МГК.

Список литературы

1. Emery A.E. 1991. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a world survey. *Neuromuscul. Disord.*, Vol. 1, P. 19–29.
2. Mersiyanova I.V., Ismailov S.M., Polyakov A.V., et al. 2000. Screening for mutations in the peripheral myelin genes PMP22, MPZ and Cx32 in Russian Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. *Hum. Mutat.*, Vol. 15, P. 340–347.
3. *The Mutation Database of Inherited Peripheral Neuropathies* [Electronic resource]. Mode of access: <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations>. Date of access: 16.09.2010.
4. Луцкий М.А., Бабкин П.С., Федотов В.П. и др. 2003. Генетическая гетерогенность наследственных моторно-сенсорных нейропатий: клинико-молекулярно-генетические корреляции [Электронный ресурс]. *Научно-мед. вестник Центрального Черноземья*. N12. Режим

доступа: <http://www.vзма.ac.ru/publ/vest/012/Site/index>. Дата доступа: 25.01.2006.

5. Миловидова Т.Б., Щагина О.А., Дадали Е.Л. и др. 2011. Классификация и алгоритмы диагностики различных генетических вариантов наследственных моторно-сенсорных полинейропатий. *Медицинская генетика*, №4, С.10-16.
6. De Visser S. 1997. Hereditary motor and sensory neuropathy or Charcot–Marie–Tooth disease Types IA and IB. *Diagnostic Criteria for Neuromuscular Disorders*, 2nd edition. ed. Emery A.E., Royal Society of Medicine PressLtd, P. 49–52.
7. Левин О.С. *Полинейропатии*. М.: Медицинское информационное агентство, 2006. С. 357-391.

Воспроизводимость и предсказательная ценность результатов в генетике предрасположенностей

Рубанович А.В.¹, Хромов-Борисов Н.Н.^{2,3,4}

¹Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН

Ул. Губкина, д. 3, Москва, 119991, ГСП-1, Россия

Тел.: +7-, e-mail: Rubanovich@vigg.ru

²Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова; ³Российский НИИ травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена; ⁴НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН

Ул. Льва Толстого, д. 6-8, Санкт-Петербург, 197022, Россия

Тел.: +7-952-204-89-49, e-mail: Nikita.KhromovBorisov@gmail.com

Reproducibility of results in the genetic of predisposition and their predictive values

Rubanovich A.V.¹, Khromov-Borisov N.N.^{2,3,4}

¹Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academy of Sciences Gubkina str. 3, Moscow, 119333, Russia

Тел.: +7- 499-132-89-58, e-mail: Rubanovich@vigg.ru

²Saint Petersburg State I.P. Pavlov Medical University; ³Russian R.R. Vreden Research Institute of Traumatology and Orthopedy; ⁴D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology of NWD RAMS

Leo Tolstoy str., 6-8, Saint Petersburg, Russia, 197022

Тел.: +7-952-204-89-49, e-mail: Nikita.KhromovBorisov@gmail.com

Резюме. Плохая воспроизводимость и низкая предсказательная ценность результатов являются *системной проблемой* генетики предрасположенностей. При статистическом контроле качества используемых тестов надо обязательно сообщать не только интегральные показатели связи типа отношения шансов (*OR*), но и пост-тестовые (апостериорные) предсказательные вероятности (*PPV* и *NPV*) и отношения правдоподобий (*LR[+]* и *LR[-]*). Полезным инструментом для визуализации их взаимоотношений являются графики предсказательностей.

Ключевые слова: генетика предрасположенностей, воспроизводимость, предсказательные вероятности, графики предсказательностей

Summary. Poor reproducibility and low predictive values of the results in the genetics of predispositions become a systemic problem. In statistical quality control of the tests in the study it is necessary to report not only integral indices such as odds ratios (*OR*), but the post-test (posterior) predictive probabilities (*PPV* and *NPV*) and likelihood ratio (*LR [+]* and *LR [-]*). A useful tool for visualization of their relationship are predictive (Bayesian) graphs.

Key-words: genetics of predisposition, genetic association, reproducibility, predictive values, Bayesian graphs

Генетика предрасположенностей

Модное ныне увлечение исследованиями генетической предрасположенности к заболеваниям или склонностей к занятиям той или иной деятельностью (например, к занятиям спортом) целесообразно называть *генетикой предрасположенностей*. Едва ли не наиболее фундаментальный результат генетики предрасположенностей - противоречивость результатов и противоречивость их интерпретаций. Основная причина противоречивости результатов и противоречивости их интерпретаций – их плохая воспроизводимость и чрезвычайно низкая предсказательная способность, см. один из недавних обзоров на эту тему [1]. Поэтому не следует доверять утверждениям о якобы практической (клинической) ценности этих исследований, которыми пестрят бесчисленные исследования генетических предрасположенностей [2]. Они остаются голословными, если не подтверждены многократно в независимых исследованиях. Но даже если они воспроизводятся, то должна быть

продемонстрирована (оценена) их предсказательная способность, приемлемая для практического (клинического) использования.

Опытная проверка имеет статистический характер

В подавляющем большинстве случаев эксперимент позволяет установить лишь *статистический* характер зависимости между изучаемыми явлениями. Статистический характер результатов неизбежно приводит к необходимости многократно повторять эксперименты и наблюдения и проверять их воспроизводимость.

Повторение – мать познания

Научные выводы воистину становятся научными, когда они обладают *предсказательной силой или прогностической (эвристической) способностью*. Выводы, сделанные на основе анализа единичной повторности эксперимента, не могут обладать предсказательной способностью. В стандартных учебных пособиях по статистике эта проблема даже не упоминается.

«Повторение составляет суть науки: ученый должен всегда задумываться о том, что произойдет, если он или другой ученый повторят его эксперимент» (Guttman, 1977). «Ученые разработали метод определения надежности (валидности) своих результатов. Они научились задавать вопрос: воспроизводимы ли они?» (Scherr, 1983, [3]). Результаты исследования заслуживают внимания, опубликования и цитирования только после того, как независимые исследователи повторяют их, используя описанные авторами материалы и методы. Ни один уважающий себя ученый не ограничивается в своих исследованиях одним-единственным опытом (или наблюдением), хотя бы ради того, чтобы исключить неизбежные ошибки наблюдения, измерений, подсчетов и т. д. Недавно появилось сообщение о том, что ученые известной биотехнологической компании Amgen не смогли подтвердить (воспроизвести) результаты 47 из 53 статей, которые казались очень плодотворными для запуска программ по производству новых лекарств. В одном исследовании, которое за короткий период цитировалось более 1900 раз, даже сами авторы впоследствии не смогли воспроизвести собственные результаты. Авторы приходят к выводу, что плохая воспроизводимость результатов становится *системной проблемой современной науки* [4]. Обширный перечень зачастую курьезных медицинских заблуждений о разнообразных факторах риска, оказавшихся несостоятельными, приведен в работе [5].

Мифы об АВ0

Классическим примером опровергнутых связей с различными состояниями человека может служить группа крови АВ0. Сообщались самые невероятные явления. Якобы у субъектов с А более тяжелое похмелье; у субъектов с 0 более здоровые зубы; военные с 0 слабохарактерны, а с В более импульсивны; субъекты с В более склонны к преступлениям; между АВ0 и пищеварением – сильная связь: для каждой группы своя диета; аллель 0 якобы более древняя и поэтому ее носители – охотники и плотоядны, а аллель А моложе и поэтому ее носители – фермеры и вегетарианцы; у субъектов с A_2 более высокий IQ; люди с группой В чаще испражняются. Все эти связи не воспроизводятся и практически забыты.

Статистически «доказанными» до сих пор остаются лишь связи между группами крови АВ0 и злокачественными новообразованиями, тромбозами, пептическими язвами, кровотечениями, бактериальными и вирусными инфекциями. Увы, практической ценности эти связи не имеют, поскольку такой показатель статистической связи как отношение шансов (OR) для них не превышает значения $OR = 1,5$.

Общепринято для OR интерпретировать значения $\leq 1,5$ как практически ничтожные, от 1,5 до 3,5 – низкие, от 3,5 до 9,0 – умеренные, от 9,0 до 32 – высокие и > 32 – очень высокие [6]. Наше теоретическое исследование показывает, что при $OR < 2,2$ маркер обладает заведомо низкой прогностической эффективностью во всех смыслах и при любых частотах встречаемости заболевания и маркера [7]. Маркер может быть хорошим классификатором, если $OR > 5,4$, при условии, что его популяционная частота достаточно высока ($p_M > 0,3$). На практике это означает, что указанным неравенствам должны удовлетворять нижние границы $100(1 - \alpha)$ доверительного интервала для оцениваемого значения OR_L [7]. Ранее близкие значения критических уровней наблюдаемых эффектов в генетике предрасположенностей предлагались для относительных рисков ($RR < 2$ и $RR > 5$) [8].

Предсказательная способность

Рассмотрим нейтральный пример (казалось бы, далекий от генетики) о связи между алопецией (облысением) и ишемической болезнью сердца (ИБС). 9510 врачей-мужчин наблюдали за собой в течение 11 лет и фиксировали у себя наступление двух событий – развитие алопеции и ИБС [9]. Данные представлены в таблице. Мы можем рассматривать алопецию как маркер (M) наличия ИБС (D).

Алопеция	ИБС		Всего	Предсказательности
	Есть, D+	Нет, D-		
Есть, M+	127 0,094 0,070 0,123	1224	1351	$PPV = P(D+ M+) = 0,070,10,12$
Нет, M-	548 0,067 0,058 0,077	7611	8159	$NPV = P(D- M-) = 0,920,93,0,94$
Всего	675	8835	9510	$Prev_D = P(D+) = 0,060,07,0,08$
Распознавательность	$Se = P(M+ D+) = 0,140,19,0,24$	$Se = P(M- D-) = 0,850,86,0,87$	$Prev_M = P(M+) = 0,130,14,0,15$	
	$LR[+] = P(M+ D+)/P(M+ D-) = 1,021,36,1,77$	$LR[-] = P(M- D-)/P(M- D+) = 1,001,06,1,14$		
	$AUC = (Se + Sp)/2 = 0,500,53,0,56$			
Однородность	$P_{val} = 0,00058$			
	$BF_{10} = 18,9$			
Связь	$OR = 1,021,45,2,01$			

Таблица. Алопеция и ишемическая болезнь сердца (ИБС)

Использованы традиционные обозначения для основных показателей распознавательной и предсказательной способностей диагностического теста [10,11]: Se - чувствительность, Sp - специфичность, $LR[+]$ и $LR[-]$ - отношения правдоподобий для «позитивов» и «негативов» (положительных и отрицательных результатов теста), PPV и NPV - предсказательные ценности «позитивов» и «негативов», $Prev_D$ и $Prev_M$ - распространенности маркера и заболевания, AUC - площадь под ROC-кривой, P_{val} - значение P , BF - бейзов фактор и OR - отношение шансов. В виде построчных индексов слева и справа от точечных статистических оценок этих показателей указаны границы 99,9%-х доверительных интервалов [12]. Использованы программа LePAC (<http://www.univ-rouen.fr/LMRS/Persopage/Lecoutre/PAC.htm>) и оригинальная программа DiagStat.xls [13].

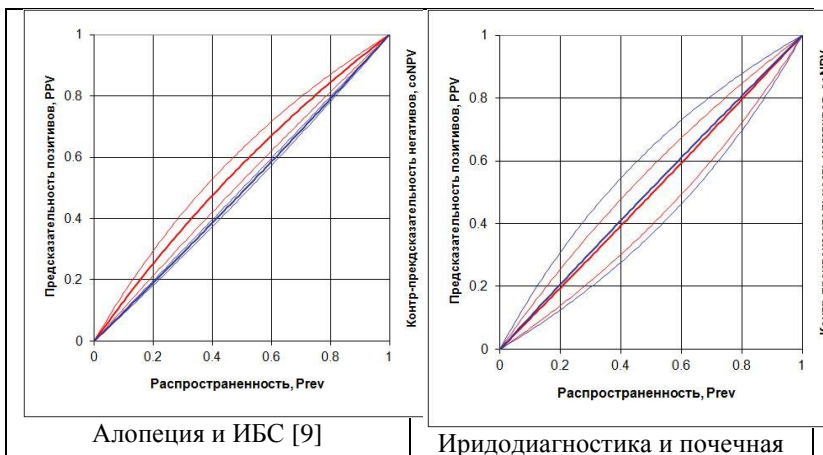
Статистически связь между алопецией и развитием ИБС оказывается высоко значимой ($P_{val} = 0,00058 \approx 6 \cdot 10^{-4}$). Полученное значение бейзова фактора ($BF_{10} = 18,9$) показывает, что примерно в 19 раз более правдоподобно получить такие данные, когда эта связь действительно есть, чем когда ее нет. Соответственно, шансы

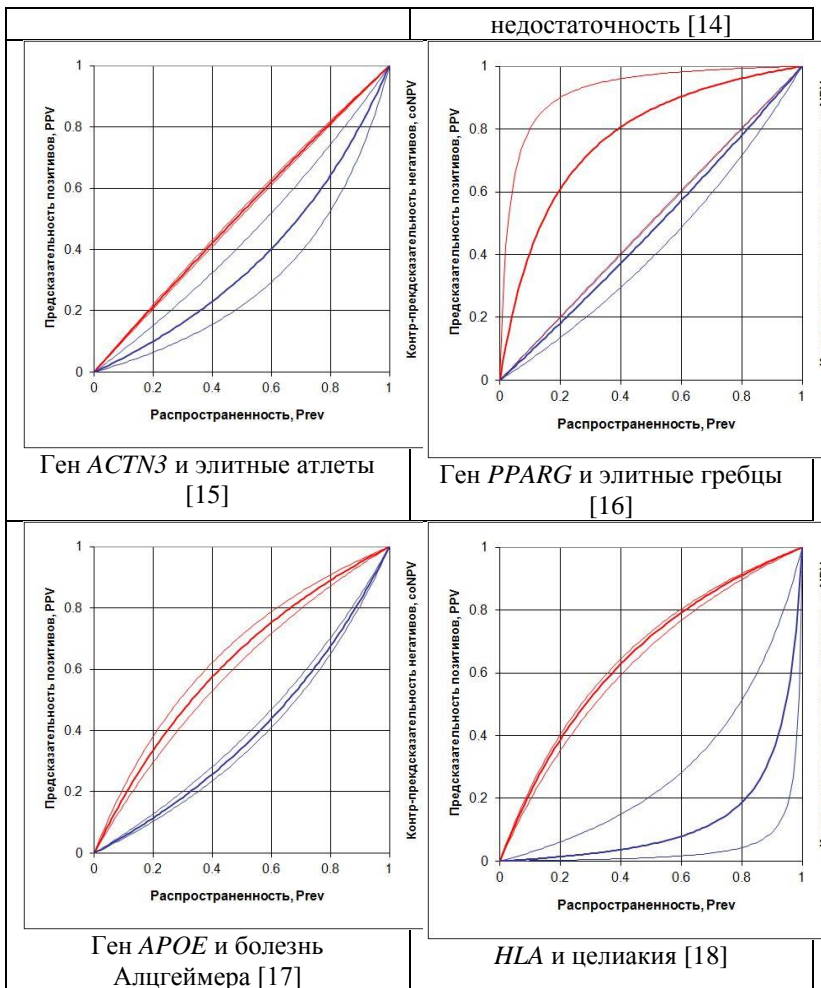
(odds) в пользу наличия связи между алопецией и ИБС в 19 раз превышают шансы в пользу отличия такой связи. Однако клиническая ценность этих данных ничтожная. Чувствительность алопеции как маркера для ИБС – неинформативная. Специфичность умеренная. Значение AUC практически не отличается от неинформативного значения $AUC_{uninf} = 0,5$. Оба отношения правдоподобий ничтожно мало отличаются от их неинформативных значений $LR[+]_{uninf} = LR[-]_{uninf} = 1$. Посттестовая (апостериорная) вероятность наличия ИБС у субъектов с алопецией пренебрежимо мало отличается от ее распространенности, т.е. от претестовой (априорной) вероятности.

Известно, что евнухи, когда они становятся евнухами в возрасте до 25 лет, не лысеют. Вряд ли найдется врач, который на основании этих данных будет рекомендовать молодым людям обзаводиться детьми до 25 лет, а потом становиться евнухами для того, чтобы на 2% снизить риск развития у них ИБС. Однако это очень похоже на рекомендации медицинских генетиков, подавляющее большинство которых слишком часто бывают основаны на столь же клинически ничтожных значениях распознавательной и предсказательной способностей генетических маркеров. Редко значения отношения шансов в этих работах превышают значение $OR > 5$.

Лучше один раз увидеть

Результаты статистического контроля качества диагностических тестов полезно наглядно представлять в виде графиков предсказательностей. Примеры приведены на рисунке.





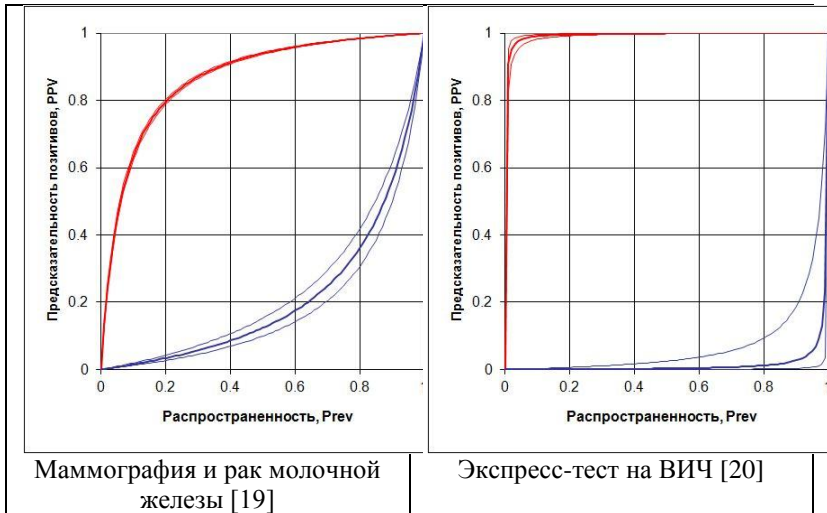


Рисунок. Примеры графиков предсказательностей для нескольких приборных, иммунологических и генетических диагностических тестов.

Верхние линии – для PPV , нижние – для $(1-NPV)$. Чем дальше они отстоят от неинформативной диагонали, тем лучше предсказательная способность «позитивов» и/или «негативов». Тонкие линии суть границы соответствующих доверительных зон. Использована программа $PPVNPV.xls$ (<http://medicine.cf.ac.uk/primary-care-public-health/resources/>).

Список литературы

1. Li A., Meyre D. 2013. Challenges in reproducibility of genetic association studies: lessons learned from the obesity field. *Internat. J. Obesity*, V. 37, P. 559-567.
2. Генетический паспорт - основа индивидуальной и предикативной медицины. (Под ред. В. С. Баранова). СПб.: Н-Л, 2009, 528 с.
3. Scherr G.H. 1983. Irreproducible science: Editor's introduction, in: *The Best of the Journal of Irreproducible Results*, Workman Publishing, New York. Цит. по: Lindsay R.M., Ehrenberg A.S.C. 1993. The design of replicated studies. *Amer. Statistician*, V. 7, P. 217-228.

4. Begley C.G., Ellis L.M. 2012. Raise standards for preclinical cancer research. *Nature*, V. 483, P. 531-533.
5. Buchanan A.V., Weiss K.M., Fullerton S.M. 2006. Dissecting complex disease: the quest for the Philosopher's Stone? *Internat. J. Epidemiol.*, 2006, V. 35, P. 562–571.
6. Hopkins W.G. 2002. A scale of magnitude for effect statistics. In: *New View of Statistics*. <http://www.sportsci.org/resource/stats/effectmag.html>
7. Рубанович А.В., Хромов-Борисов Н.Н. 2013. Теоретический анализ показателей предсказательной эффективности бинарных генетических тестов. *Экол. генетика*. Т. 11, С. 77-90.
8. Ioannidis J. 2006. Commentary: Grading the credibility of molecular evidence for complex diseases. *Intern. J. Epidemiol.*, V. 35, P. 572–577.
9. Lotufo P.A., Chae C.U., Ajani U.A., et al. 2000. Male pattern baldness and coronary heart disease: The Physician's Health Study. *Arch. Intern. Medicine*, V. 160, P. 165-171.
10. Тишков А.В., Хромов-Борисов Н.Н., Комашня А.В., и др. 2013. *Статистический анализ таблиц в диагностических исследованиях*. СПб.: Изд-во СПбГМУ, 20 с.
11. ГОСТ Р 53022.3-2008 Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.
12. Louis T.A., Zeger S.L. 2009. Effective communication of standard errors and confidence intervals. *Biostatistics*, V. 10, № 1, P. 1–2.
13. Хромов -Борисов Н.Н., Тишков А.В., Комашня А.В., и соавт. 2012. *Статистический анализ данных клинических исследований: таблица 2×2*. Версия Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2012616821.
14. Simon A., Worthen D. M., Mitas J. A.1979. An evaluation of iridology. *JAMA*, V. 242, N 1, P. 1385-1389.
15. Mäki M., Mustalahti K., Kokkonen J., et al. 2003. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N. Engl. J. Med.*, V. 348, 2517-2524.
16. Druzhevskaya A.M, Ahmetov I.I., Astratenkova I.V., Rogozkin V.A. 2008. Association of the *ACTN3 R577X* polymorphism

with power athlete status in Russians. *Eur. J. Appl. Physiol.*, V. 103, P. 631–634.

17. Кундас Л.А., Жур К.В., Бышнев Н.И. и др. 2013. Анализ молекулярно генетических маркеров, ответственных за устойчивость к физическим нагрузкам, у представителей академической гребли. *Молекулярная и прикладная генетика*: сб. науч. тр. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; (гл. ред. А.В. Кильчевский). Минск: ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Т. 14, С. 101-105.
18. Mayeux R., Saunders A.M., Shea S., et al. 1998. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.*, V. 338, P. 506-511.
19. Mäki M., Mustalahti K., Kokkonen J., et al. 2003. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N. Engl. J. Med.*, V. 348, P. 2517-2524.
20. Banks E., Reeves G., Beral V. et. al. 2004. Influence of personal characteristics of individual women on sensitivity and specificity of mammography in the Million Women Study: cohort study. *BMJ*, V. 329, N. 7464, P. 477-479.
21. Kevin P. Delaney K.P., Branson B.M., Apurva Uniyal A. et al., 2006. Performance of an oral fluid rapid HIV-1/2 test: experience from four CDC studies. *AIDS*, V. 20, P. 1655–1660.

**Современное общедоступное программное обеспечение
статистического анализа в молекулярной медицине и генетике.
Мастер-класс**

Хромов-Борисов Н.Н.

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова; Российский НИИ травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена; НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН

Ул. Льва Толстого, д. 6-8, Санкт-Петербург, Россия, 197022

Тел.: +7-952-204-89-49, e-mail: Nikita.KhromovBorisov@gmail.com

Modern free software for biostatistical analysis. Workshop

Khromov-Borisov N.N.

Saint Petersburg State I.P. Pavlov Medical University; Russian R.R.
Vreden Institute of Traumatology and Orthopedy; D.O. Ott Institute of
Obstetrics and Gynecology of NWD RAMS
Leo Tolstoy str., 6-8, Saint Petersburg, Russia, 197022
Tel.: +7-952-204-89-49, e-mail: Nikita.KhromovBorisov@gmail.com

Резюме. Мастер-класс посвящен практическому ознакомлению с современными свободно доступными компьютерными программами для биостатистического анализа результатов в молекулярной медицине и медицинской генетике.

Ключевые слова: некоммерческое программное обеспечение, статистические программы, анализ данных, биомедицинская статистика, генетика предрасположенностей, популяционная генетика

Summary. Workshop (Master Class) is dedicated to practical acquaintance with the modern nonprofit software for biostatistical analysis and population genetics listed below.

Key words: free software, statistical software, data analysis, biomedical statistics, genetics of predisposition, population genetics

Планируются практические занятия с пакетами новейших некоммерческих статистических и популяционно-генетических компьютерных программ, перечисленных ниже. Для этого их необходимо скачать и установить на свой компьютер. Если на компьютере находятся более ранние версии программ, то перед установкой свежих версий старые версии лучше удалить (т.е. не записывать новые версии поверх старых).

1. Программа анализа данных AtteStat:
<http://sourceforge.net/projects/attestat/>

Программа устанавливается как надстройка к Excel, поэтому перед ее установкой должны быть закрыты все экселевские страницы. По запросу от автора можно получить очень полезное мощное 500-страничное «Руководство пользователя». Это одна из немногих программ, для которой также свободно доступен (по запросу от автора) исходный текст программы. Кроме ссылки на Поскольку некоторые отечественные научные журналы не принимают ссылки на электронные ресурсы, то кроме ссылки на сайт программы, можно ссылаться на статью автора: Гайдышев И.П. Статистика в публикациях // «Гений ортопедии», 2005. - №4. - С. 155-161.

2. R - свободная программная среда для вычислений с открытым исходным кодом: <http://cran.r-project.org/bin/windows/base/> Новейшая версия R-3.0.1:

<http://cran.r-project.org/bin/windows/base/R-3.0.1-win.exe>

Программа интенсивно совершенствуется и обновляется, поэтому стоит регулярно посещать ее сайт.

3. RStudio - интегрированная среда разработки для дружественной работы в R: <http://www.rstudio.com/> Новейшая версия RStudio-0.97.551 (2013-05-11):

<http://download1.rstudio.org/RStudio-0.97.551.exe>

4. WinBUGS – гибкое программное обеспечение для байзовского анализа сложных статистических моделей с использованием методов Монте-Карло на марковских цепях: <http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml>

Последняя версия WinBUGS 1.4:

<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/WinBUGS14.exe>

После установки требуется скопировать и установить заплатку (patch):

http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/WinBUGS14_cumulative_patch_No3_06_08_07_RELEASE.txt и ключ:

<http://www.mrc->

[bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/WinBUGS14_immortality_key.txt](http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/WinBUGS14_immortality_key.txt)

Ссылки для цитирования: Lunn D.J., Thomas A., Best N., Spiegelhalter D. (2000) WinBUGS -- a Bayesian modelling framework: concepts, structure, and extensibility // *Statistics and Computing*, 2000. – Vol. 10. – P. 325--337. Lunn, D., Spiegelhalter, D., Thomas, A. and Best, N. (2009) The BUGS project: Evolution, critique and future directions (with discussion), *Statistics in Medicine* **28**: 3049--3082.

Первая статья свободно доступна на:

<http://www.panic->

lab.rutgers.edu/users/kkonst/Papers_03_10_05/content.asp.pdf

Некоторые программы работают посредством вызова WinBUGS из среды R.

Для этого в R требуется установить пакет R2WinBUGS:

<http://cran.r-project.org/web/packages/R2WinBUGS/index.html>

Легче всего это осуществляется в интегрированной среде RStudio.

5. OpenBUGS – дальнейшее развитие WinBUGS: <http://www.openbugs.info/w/>

Новейшая версия 3.2.2 (2013-04-30):
http://www.openbugs.info/w.cgi/OpenBUGS_3_2_2?action=AttachFile&do=get&target=OpenBUGS322setup.exe

Для вызова из среды R следует в R установить пакет R2OpenBugs:

<http://cran.r-project.org/web/packages/R2OpenBUGS/index.html>

Новейшая версия R2OpenBugs 3.2-2.2 (2013-04-10):

http://cran.r-project.org/bin/windows/contrib/r-release/R2OpenBUGS_3.2-2.2.zip

Другой вариант – установить в R пакет BRugs:

<http://cran.r-project.org/web/packages/BRugs/index.html>

Новейшая версия BRugs 08-1 (2013-05-27):

http://cran.r-project.org/bin/windows/contrib/r-release/BRugs_0.8-1.zip

6. PAST – пакет программ для анализа данных:

<http://folk.uio.no/ohammer/past/>

Новейшая версия PAST 2.17c:

<http://www.nhm2.uio.no/norlex/past/Past.exe>

Программа не требует инсталляции, ею можно пользоваться даже на флэшке.

Там же следует скопировать полезное руководство:

<http://www.nhm2.uio.no/norlex/past/pastmanual.pdf> Там же

можно скопировать некоторые дополнительные обучающие материалы и примеры: <http://nhm2.uio.no/norlex/past/doc1.html>

Авторы постоянно совершенствуют программу PAST и расширяют ее возможности, поэтому полезно подписаться на рассылку новостей и обсуждений (число подписчиков достигло 1753): <https://sympa.uio.no/nhm.uio.no/info/past-users>

В публикациях авторы просят ссылаться на: Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 2001. – Vol. 4. – No. 1: 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

7. Instat+, статистический пакет общего назначения:

http://www.reading.ac.uk/ssc/n/n_instat.htm Новейшая версия Instat+ v3.37:

http://www.reading.ac.uk/ssc/n/software/instat/337/Instat+_v3.37.msi

Там же доступно руководство:

<http://www.reading.ac.uk/ssc/n/software/instat/tutorial.pdf>

Не путать с довольно примитивной программой InStat от фирмы GraphPad (<http://www.graphpad.com/scientific-software/instat/>), выпускающей полезную, но коммерческую программу Prism (<http://www.graphpad.com/>)

8. ESCI – наборы описательных экселевских программ для доверительных интервалов. Приложение к книге Cumming G. *Understanding The New Statistics: Effect Sizes, Confidence Intervals, and Meta-Analysis*. - New York: Routledge, 2012. – 535 p.
<http://www.latrobe.edu.au/psy/research/projects/esci>

http://webstat.latrobe.edu.au/www/__data/assets/file/0006/162699/ESCI-for-Excel-07-10.zip

<http://www.latrobe.edu.au/psy/research/projects/esci/2001-to-2010>

9. Набор экселевских программ. Приложение к книге: Newcomb R.G. *Confidence Intervals for Proportions and Related Measures of Effect Size*. - CRC Press, 2012. – 468 p.
<http://medicine.cf.ac.uk/primary-care-public-health/resources/>

10. LePAC – программа для статистического анализа экспериментальных данных, посвященная в основном байзовским методам:

<http://www.univ-rouen.fr/LMRS/Persopage/Lecoutre/PAC.htm>

Новейшая версия LePAC 2.0.41 (8 November 2012): <http://www.univ-rouen.fr/LMRS/Persopage/Lecoutre/telechargements/LePAC2Englishsetup.zip>

Для предпочитающих французский язык там же доступна французская версии программы. Полезно также ознакомиться с публикациями автора на этом сайте.

11. LePrep – «вероятности воспроизведения и статистические предсказания»:

Новейшая версия LePrep 2.1.0 (01 April 2011):
[http://www.univ-](http://www.univ-rouen.fr/LMRS/Persopage/Lecoutre/telechargements/LePrep2setup.zip)

[rouen.fr/LMRS/Persopage/Lecoutre/telechargements/LePrep2setup.zip](http://www.univ-rouen.fr/LMRS/Persopage/Lecoutre/telechargements/LePrep2setup.zip)

Для владеющих французским языком там же доступна французская версия.

12. Программа G*Power для анализа мощности статистических критериев:

<http://www.psych.uni-duesseldorf.de/abteilungen/aap/gpower3>

Новейшая версия G*Power 3.1.7 (19 April 2013):

http://www.psych.uni-duesseldorf.de/abteilungen/aap/gpower3/download-and-register/Dokumente/GPower_3.1.7.zip

Для ссылок авторы просят цитировать одну из двух или обе статьи, доступные на сайте: Faul F., Erdfelder E., Buchner A., Lang A.-G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses // Behavior Research Methods, 2009. – Vol. 41. – P. 1149-1160. Faul F., Erdfelder E., Lang A.-G., Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences // Behavior Research Methods, 2007. – Vol. 39. – P. 175-191.

Руководство к программе организовано не слишком удобно в виде вэб-страниц: оно состоит из трех глав, каждая из которых разбита на мелкие вэб-страницы:

<http://www.psych.uni-duesseldorf.de/abteilungen/aap/gpower3/user-guide-by-design>
<http://www.psych.uni-duesseldorf.de/abteilungen/aap/gpower3/user-guide-by-distribution>
http://www.psych.uni-duesseldorf.de/abteilungen/aap/gpower3/user-guide-type_of_power_analysis

На сайте доступны также ссылки на работы, иллюстрирующие различные применения программы G*Power; некоторые из них представлены в виде электронных копий. Программа постоянно совершенствуется, поэтому стоит зарегистрироваться для получения уведомлений об обновлениях:

<https://wwwmail.uni-duesseldorf.de/mailman-lists/listinfo/register-gpower>

13. GENEPOP – мощный пакет генетико-популяционных программ: Новейшая версия GENEPOP 4.2.1 (26 May 2013):

<http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm> Программа не требует инсталляции. Ссылка для цитирования: Rousset F. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux // Molecular Ecology Resources, 2008. – Vol. 8. – No. 1. – P. 103–106.

14. Популяционно-генетическая программа GenAlEx - генетический анализ в Excel:

<http://biology.anu.edu.au/GenAlEx/Welcome.html> К ней прилагается многостраничное руководство:

http://biology.anu.edu.au/GenAlEx/Download_files/GenAlEx%2006.5b3%20Guide.pdf

При цитировании следует ссылаться на: Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update // Bioinformatics, 2012. –

Vol. 28. – No. 19. – P. 2537-2539. Статья свободно доступна на: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2012/07/20/bioinformatics.bts460.full.pdf+html> Программа постоянно совершенствуется, поэтому стоит зарегистрироваться для получения уведомлений об обновлениях:

<http://biology.anu.edu.au/GenAIEx/GenAnalRegNew.html>

15. GDA – анализ генетических данных: <http://www.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php> Создана как приложение к книге Б.С. Вейра «Анализ генетических данных» – М.: Мир, 1995. – 400 с. (Новейшее 3-е изд.: Weir B.S. "Genetic Data Analysis III" 1996, Sinaur Associates, 2013. – 400 p.). Последняя версия GDA 1.1 (11 January 2008):

<http://www.eeb.uconn.edu/people/plewis/downloads/gda-1.1.win32.zip>

16. PowerMarker – набор статистических методов для всестороннего анализа данных о генетических маркерах: Фактически новая версия GDA. <http://statgen.ncsu.edu/powermarker/>
<http://statgen.ncsu.edu/powermarker/downloads/PowerMarker%20Installer.msi>

Здесь же можно скачать руководство к программе:

<http://statgen.ncsu.edu/powermarker/downloads/Manual.pdf>

Перед установкой этой программы требуется установить Microsoft .NET Framework, но не новейшие версии, а 1.1.4322: <http://www.microsoft.com/en-us/download/details.aspx?id=26>

Без нее PowerMarker не работает.

17. Arlequin – интегрированное программное обеспечение для анализа генетико-популяционных данных: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/> Новейшая версия Arlequin 3.5.1.3 (19.11.2011):

<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/win/winarl35.zip>

Не требует инсталляции. При цитировании следует ссылаться на:

Excoffier L., H.E. L. Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Molecular Ecology Resources, 2010. – Vol. 10. – No. 3. - P. 564-567.

18. S2 ABOestimator – оценка аллельных частот и проверка согласия с РХВ в системе групп крови АВО: <http://webpages.fc.ul.pt/~pjns/Soft/ABOestimator/>

<http://webpages.fc.ul.pt/~pjns/Soft/ABOestimator/S2ABO.zip>

19. Finetti – интерактивная (online) программа для проверки согласия с PXB и критериев связи (ассоциации): <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>

20. Web-Assotest – интерактивная (online) программа для анализа связей генотип-признак: <http://www.ekstroem.com/assotest/assotest.html>

21. ISW - Статистический анализ интервальных наблюдений одномерных непрерывных случайных величин:

<http://ami.nstu.ru/~headrd/> Новейшая версия ISW 4.4.1.98:
http://ami.nstu.ru/~headrd/ISW_exe-r1012-2012.12.28-14_03.zip

22. Reference Value Advisor – надстройка для Excel с макросами для вычисления референсных интервалов. <http://www.biostat.envt.fr/spip/spip.php?article63> Новейшая версия 2.1 (February 29th 2012) требует наличия Excel 2010:

<http://www.biostat.envt.fr/spip/IMG/zip/refvaladvv-2.zip> Версия 1.4. работает в Excel 2003:
<http://www.biostat.envt.fr/spip/IMG/zip/RefvalAdvV14.zip> Ссылка для цитирования: Geffré A., Concordet D., Braun J.P., Trumel C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel // Vet. Clin. Pathol., 2011. – Vol. 40. – N0. 1. – P. 107-112.

Статья свободно доступна на:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2011.00287.x/pdf>

23. Обучающая программа WinStats – русская версия: <http://math.exeter.edu/rparris/winstats.html> Последняя версия от 07.08.2012:

<http://math.exeter.edu/rparris/peanut/wsru32z.exe>

24. Программа SANCT – структурный анализ таблиц сопряженности. Авторы: Хромов-Борисов Н.Н., Lazzarotto G.B., Kist T.B.L.

25. Программа DiagStat для статистического контроля качества диагностических тестов с бинарными исходами. Авторы: Хромов-Борисов Н.Н., Тишков А.В., Семенова Е.М.

Эволюционная медицинская геномика

Хромов-Борисов Н.Н.^{1,2,3}, Рубанович А.В.⁴

¹Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова; ²Российский НИИ травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена; ³НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН

Ул. Льва Толстого, д. 6-8, Санкт-Петербург, 197022, Россия

Тел.: +7-952-204-89-49, e-mail: Nikita.KhromovBorisov@gmail.com

⁴Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН

Ул. Губкина, д. 3, Москва, 119991, ГСП-1, Россия

Тел.: +7-, e-mail: Rubanovich@vigg.ru

Evolutionary medical genomics

Khromov-Borisov N.N.^{1,2,3}, Rubanovich A.V.⁴

¹Saint Petersburg State I.P. Pavlov Medical University; ²Russian R.R. Vreden Research Institute of Traumatology and Orthopedy; ³D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology of NWD RAMS

Leo Tolstoy str., 6-8, Saint Petersburg, Russia, 197022

Tel.: +7-952-204-89-49, e-mail: Nikita.KhromovBorisov@gmail.com

⁴Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academy of Sciences Gubkina str. 3, Moscow, 119333, Russia

Tel.: +7- 499-132-89-58, e-mail: Rubanovich@vigg.ru

Резюме. «Ничто в биомедицине не имеет смысла кроме как в свете эволюции». С этой точки зрения генетика предрасположенностей обязана дать ответы на два основных вопроса: (1) Является ли природный генетический полиморфизм, выявляемый современной геномикой, результатом нейтральной эволюции или же он является отягчающим генетическим (мутационным) грузом, определяющим предрасположенность к распространенным болезням, и который почему-то естественный отбор вовремя не отбраковал? (2) Усиливаются ли, или хотя бы складываются, эффекты предрасполагающих аллелей при их объединении в одном генотипе, или же они взаимно нейтрализуются? Эволюционная медицинская геномика свидетельствует, что подавляющее большинство вариантов генов (аллелей), которые наблюдаются в геномах современных популяций человека, являются селективно нейтральными. Во многих случаях эффекты различных предрасполагающих аллелей нейтрализуются

благодаря механизмам разнонаправленной плейотропии и гомеостаза.

Ключевые слова: генетика предрасположенностей, эволюционная медицинская геномика, генетический полиморфизм, нейтральная эволюция, генетический груз, разнонаправленная плейотропия, гомеостаз

Summary. "Nothing in biomedicine makes sense except in the light of evolution." From this point of view, genetics of predispositions have to answer two basic questions: (1) Is the natural genetic polymorphism identified with modern genomics the result of neutral evolution or whether it is an aggravating genetic (mutation) load determining susceptibility to common diseases, which somehow was not culled by the natural selection in time? (2) Are effects of different predisposing alleles synergistic or at least additive when combined in a single genotype, or they are mutually neutralized? Evolutionary medical genomics presents evidence that the vast majority of gene variants (alleles) observed in the genomes of modern human populations are selectively neutral. In many cases, the effects of various predisposing alleles are neutralized through the mechanisms of opposite (antagonistic) pleiotropy and homeostasis.

Key-words: genetics of predispositions, evolutionary medical genomics, genetic polymorphism, neutral evolution, genetic load, opposite pleiotropy, homeostasis

Эпиграфы

«Мы не сможем решить [научные] проблемы, если будем использовать тот же стиль мышления, который мы использовали, когда создавали их» Альберт Эйнштейн (цит. по: [1]). «Ничто в биологии не имеет смысла кроме как в свете эволюции» Феодосий Добржанский [2]. «Эволюция есть свет, который освещает все факты, траектория, которой должны следовать все линии мышления – вот что такое эволюция» Пьер Тейярд де Шарден. Pierre Teilhard de Chardin - один из величайших мыслителей нашего времени. Он был креационистом, но таким, кто понимал, что Творение реализовано в этом мире посредством эволюции. «Для биолога альтернативой мышлению в эволюционных терминах является не думать вообще» Питер Медавар (цит. по: [3]). «Ничто в медицине не имеет смысла кроме как в свете эволюции. Понимание эволюции человека, т.е. того, откуда мы пришли, очень важно для понимания, куда мы идем» [4].

Основные проблемы эволюционной медицинской генетики

Эволюция приходит в медицину, геномика уходит в эволюцию. Тело человека является живым архивом эволюции, записанным в наших генах, клетках и органах. Почему мы такие, какие есть? Почему существуют болезни? Почему наши тела являются хрупкими в некоторых аспектах? Почему одни наши органы, структуры, механизмы и метаболические пути сохранились в ходе эволюции, а другие нет? Подобные вопросы требуют эволюционных ответов. Дарвиновская (эволюционная) медицина никоим образом не является практическим методом. Она есть просто применение основ эволюционной биологии к медицине, точно так же, как медицинская генетика использует основы генетики.

В теории эволюции сосуществуют две не исключают одна другую ветви: теория естественного отбора и теория нейтральной эволюции. С этой точки одним из первейших вопросов, на который обязана дать ответ эволюционная медицинская геномика, может звучать так: является ли генетический полиморфизм, выявляемый современной геномикой, результатом нейтральной эволюции или же он является отягчающим генетическим (мутационным) грузом, определяющим предрасположенность к распространенным болезням, и который почему-то естественный отбор вовремя не отбраковал? Нарождающаяся на наших глазах новая область молекулярной медицины – эволюционная медицинская геномика – свидетельствует, что *подавляющее большинство вариантов (аллелей), которые наблюдаются в геномах современных популяций человека, являются селективно нейтральными.* Действительно, оказывается, что кодирующие, т.е. функционально значимые районы в геноме человека, демонстрируют гораздо меньшую степень варьирования, чем не кодирующие, т.е. участки, функция которых неизвестна. Абсолютное число синонимичных вариантов превышает число несинонимичных (миссенс) вариантов, несмотря даже на то, что число позиций, в которых могут происходить несинонимичные варианты, в три раза превышает число позиций, в которых могут происходить синонимичные мутации. Доля синонимичных вариантов в 4 раза больше доли несинонимичных: 80% и 20%, соответственно.

В целом, нейтралистские эволюционные воззрения приводят к выводу, что исторические адаптивные эволюционные события не являются источником болезней. Напротив, эволюция является источником устойчивости и причиной того, что люди столь успешно существуют в широко изменяющихся условиях.

Эволюционно-популяционные воззрения помогают понять, что в генетике предрасположенностей изучается природный сбалансированный генетический полиморфизм, т.е. не генетические новообразования (мутации), а аллели, прошедшие естественный отбор и закрепившиеся в популяциях человека. Изучаются не аномалии генома, не патологические или патогенные его варианты, а его бесконечно разнообразные, но естественные, «нормальные» вариации. Поэтому следует ожидать, что их вклад в ту или иную предрасположенность будет заведомо малым. Нейтральностью и сбалансированностью объясняется тот факт, что предрасполагающие генотипы встречаются как у больных, так и у здоровых, и различаются лишь их частоты в группах субъектов с данной болезнью и без нее. То есть заведомо наличие в генотипе данного человека предрасполагающей аллели не свидетельствует о неизбежном наличии у него болезни или иной склонности в настоящем или о ее возникновении в будущем.

В генетике предрасположенностей предаётся забвению гомеостаз, обусловленный во многом избыточностью (дублированием) и взаимозаменяемостью многих жизненно важных генов и компенсаторными и регуляторными генными взаимодействиями. Мало внимания уделяется классической проблеме взаимодействия хромосомных и митохондриевых генов, упускаются из виду повсеместно распространенные энтеровирусы и прочие инфекционные агенты. Человек коэволюционирует со множеством симбионтов и патогенных организмов. «Гены паразитов – фенотипы хозяев» Ричард Докинз [5]. Сейчас становится ясным, что генетика человека в немалой степени становится генетикой его микробиоты, т.е. населяющих его микробов

Плейотропия и гомеостаз

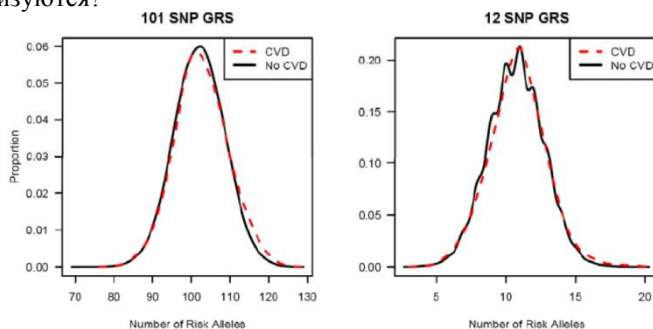
Одной из основных причин практической нейтральности предрасполагающих аллелей является плейотропия (множественное, разветвленное действие гена на несколько признаков), особенно когда она разнонаправленная (*«компромиссная»* или *«компенсаторная»*) и/или антагонистическая. Ее следствием могут быть внутригеномные межгенные конфликты, и продолжительность жизни эволюционирует посредством компромиссов между признаками, которые обуславливают приспособленность на ранних стадиях развития и на поздних стадиях. Например, ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) не только контролирует кровяное

давление, но и принимает участие в процессах оплодотворения, формирования иммунных клеток, развития атеросклероза. Его высокая экспрессия в иммунных клетках макрофагах предотвращает формирование злокачественных опухолей [6]. В частности, АПФ оказывается фактором, защищающим от болезни Альцгеймера, и поэтому применение ингибиторов АПФ может спровоцировать рак и болезнь Альцгеймера. Показано, что гомеостатическая адаптация успешно нормализует кровяное давление у мышей с измененным числом копий гена ACE [7].

Почти каждая болезнь зависит от многих генов. Почти каждый ген может принимать участие в становлении сразу нескольких заболеваний. Рекордсменами в этом являются гены рецептора витамина Д (*VDR*) и рецептора эстрогена (*ESR*) Активность *VDR* простирается далеко за пределы метаболизма кальция и паратиреоидного гормона (ПТГ). Он участвует в транскрипции 900 генов, некоторые из которых являются ключевыми для здоровья, такие как *MTSS1* (белок 1, супрессирующий метастазирование), а также ключевые компоненты врожденного иммунитета (антимикробный пептид кателицидин, бета-дефензины, TLR2 – толл-подобный рецептор и др.). Роль *VDR* во врожденном иммунитете уникальна для человека. Никакое другое модельное животное (в частности мышь) не выработало эволюционно такую функцию для этого рецептора. Рецептор эстрогена прямо или опосредованно отвечает за экспрессию 6000 генов, т.е. 26% всего генома.

Аддитивность, синергия или взаимная нейтрализация

Второй важнейший вопрос в генетике предрасположенностей: Усиливаются ли, или хотя бы складываются, «вредные» эффекты предрасполагающих аллелей при их объединении в одном генотипе или же они взаимно нейтрализуются?



На рисунке представлены частотные распределения числа предрасполагающих аллелей у женщин с сердечнососудистыми заболеваниями (CVD) и без них (No CVD). 19313 белых женщин наблюдались в среднем течение 12,3 лет. Из них у 777 возникли CVD (инфаркты миокарда, инсульты, смерть от сердечной недостаточности, реваскуляции). Представлены распределения для 101 и 12 аллелей, для которых связь с сердечнососудистыми заболеваниями была статистически высоко значима ($P_{\text{val}} \leq 10^{-7}$). Видно, что они почти полностью перекрываются. Получается, что так называемые «баллы генетического риска» (GRS - genetic risk score) не улучшают предсказание риска сердечнососудистых заболеваний [8]. Отсюда становится очевидной ошибочность использования баллов для идентификации индивидуумов с повышенным риском гипертензии и других заболеваний.

Казалось, следовало ожидать, что чем больше у носителя предрасполагающих аллелей, тем выше риск заболевания. Это справедливо, однако, только если эффекты таких аллелей складываются, а не нейтрализуют друг друга. Теоретически можно идентифицировать людей с очень высоким риском заболевания, но практически они будут встречаться чрезвычайно редко. Представим себе, что нам удастся собрать в одном геноме все известные аллели, предрасполагающие к занятиям определенным видом спорта. Очевидно, что в силу неаддитивности межгенных и средовых влияний спортивные способности субъекта с таким геномом не будут кратными числу предрасполагающих аллелей. 200 предрасполагающих аллелей в одном геноме вряд ли приведут к 200-кратному увеличению спортивных характеристик у их носителей. Поэтому заменять слово «аллель» словом «балл» и подсчитывать число баллов некорректно, поскольку их суммарный вклад не будет равен сумме вкладов каждой из аллелей по отдельности. А в силу разнонаправленной плейотропии этих аллелей не окажется ли наш супермен «суперидиотом»?

Парадокс уникальности

Генотип каждого человека (даже у каждого из однойцевых близнецов) уникален. Поэтому заведомо невозможно доказать, что именно данный уникальный генотип является причиной данного заболевания или данной склонности. Для этого надо иметь большие выборки субъектов с таким генотипом, но он уникален.

Наличие или развитие болезни не предсказываются, а лишь оцениваются их вероятности. При этом прогностическая эффективность подавляющего большинства выявляемых связей

«предрасполагающих» вариантов (аллелей, генотипов, гаплотипов) с той или иной многопричинной болезнью оказывается очень низкой.

Тень Ламарка

Неоднозначность в генетике предрасположенностей кроется уже в неопределенности при диагностике изучаемого признака. Например, как отличить «спортсмена» от «неспортсмена»? В качестве неспортсменов часто отбирают людей, ведущих сидячий образ жизни. Но если вдуматься, то это чистой воды ламаркизм, подразумевающий влияние «упражнения» и «неупражнения» органа на его эволюционную судьбу.

Соблазны, от которых следует избавляться

(1) *Катастрофизм* (или «страшилизм») – внушение самим себе и окружающим, что наш геном – свалка опасных для здоровья аллелей. (2) *Генетицизм* – он же генетический детерминизм – слепая, фанатичная вера во всемогущество генов. «Генетика – основа медицины» (В.С. Баранов [9]). (3) *Евгенизм* – подспудное желание подправить природу человека, селекционировать породу «хороших» или «нужных» людей, «элиту», например, спортсменов.

Новые напасти

(5) *Коммерциализация* фундаментальной науки, которая, не дай бог, может опуститься и до криминализации. Фундаментальная наука теряет непорочность и становится продажной. На эту скользкую дорожку («на панель») ее толкают администраторы от науки, которые требуют, чтобы наука была самокупаемой. «Государство с таким отношением к науке, которое мы наблюдаем последнее время, обречено» (С.Г. Инге-Вечтомов [10]). (6) *Мания секретности* – утверждение о том, что сведения о генетических маркерах, отвечающих за спортивные задатки, все реже публикуются в открытой печати и что якобы в ряде стран они относят к категории «для служебного пользования» (И.Б. Моссе, <http://mk.by/2012/03/30/57901/>; <http://mk.by/page/26/?s=акты+на>). Причина, однако, отнюдь не в «засекречивании» данных, а скорее всего, более прозаичная: исследователи все более убеждаются в бесперспективности ДНК-тестирования и селекции на ее основе элитных спортсменов. Поэтому явно следует прислушаться к мнению, что «В настоящее время предсказательная способность спортивной генетики нулевая. Нет никаких прямых доказательств существования генетических показателей успешности спортсменов. Эффективность спортсмена зависит прежде всего от социоэкономических, культурных и средовых факторов. Так что

секундомер намного лучше предсказывает спортивные достижения бегуна, чем вся эта генетика» (Yannis Pitsiladis, University of Glasgow <http://news.menshealth.com/why-kenyans-keep-winning-marathons/2011/06/03/>)

Некоторые практические выводы

Генетика есть наука о наследственности, а наследственность есть способность организмов передавать свои признаки и особенности развития потомству. Поэтому результаты исследований генетических предрасположенностей должны подтверждаться изучением не менее двух поколений родственников, т.е. обязательно надо проводить анализ семей, родословных и близнецов. Прежде чем заниматься геномикой, следовало бы поначалу внедрить в клиническую практику регистрацию родословных. Это и дешевле и эффективнее.

Насушно необходима статистическая экспертиза работ, представляемых к публикации в биомедицинских журналах. За рубежом в состав редколлегии журналов входят эксперты по статистике. Надо вменить в обязанность рецензентов проверять правильность представленных результатов вычислений. Для этого надо сделать открытыми все исходные данные, как это делается, например, в журналах *Science*, *International Forensic Sciences: Genetics*. Когда результаты опубликованы в открытой печати, тогда исходные данные перестают быть собственностью авторов и должны быть доступными для специалистов. Еще Френсис Гальтон писал, что «никто не должен публиковать ... результаты без представления хорошо организованной и хорошо переплетенной копии своих данных в некотором месте, где она будет доступна (при разумных ограничениях) тому, кто пожелает проверить его работу» [11].

В медицинских вузах надо сделать обязательным преподавание эволюционной медицинской геномики, и таких ее составляющих, как теория эволюции, популяционной и эволюционной генетика, генетика количественных признаков. Надо наложить мораторий на поспешные клинические (и иные практические) применения результатов генетики предрасположенностей. Надо приостановить деятельность фирм и фирмочек, занимающихся гаданием на генной гуще. Нам насушно необходимо «генетическое законодательство» и «генетико-этический кодекс». Медицинские генетики и клиницисты обязаны нести не только моральную, но и юридическую ответственность за свои сомнительные диагнозы и практические рекомендации

пациентам. «Можно заниматься в науке чем угодно, только не следует забывать о последствиях и об ответственности» (М.Е. Лобашев).

Эволюционная медицинская геномика, осознаем ли мы это или нет, является фундаментом генетики предрасположенностей, главной целью которой должно быть не предсказание персонализированного риска болезни, а познание ее генетико-эволюционной истории и механизмов для разработки стратегии лечения и предупреждения (см., например, [12]).

Список литературы

1. Heng H.H.Q. The genome-centric concept: resynthesis of evolutionary theory. *BioEssays*, 2009, V. 31, P. 512–525.
2. Dobzhansky T. Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. *The American Biology Teacher*, 1973, V. 35, P. 125-12.
3. Little J. Evolution: myth, metaphysics, or science? *New Scientist*, 1980, V. 87, № 1217, P. 708-709.
4. Varki A. Nothing in medicine makes sense, except in the light of evolution (invited commentary). *J. Mol. Med.*, 2012, V. 90, P. 481-494.
5. Докинз Р. Расширенный фенотип: длинная рука гена. М.: Астрель: CORPUS, 2010. 512 с.
6. Nawaz S.K., Hasnain S. Pleiotropic effects of ACE polymorphism. *Biochemia Medica*, 2009, V. 19, № 1, P. 36–49.
7. Krege J.H., Kim H.-S., Moyer J.S., et al., Angiotensin-converting enzyme gene mutations, blood pressures, and cardiovascular homeostasis. *Hypertension*, 1997, V. 29, P. 150-157.
8. Paynter N.P., Chasman D.I., Pare G., et al. Association between a literature-based genetic risk score and cardiovascular events in 19,313 women. *JAMA*, 2010, V. 303, № 7, P. 631–637.
9. Баранов В.С. Генетика – основа современной медицины. *Современные технологии профилактики наследственных болезней и детской инвалидности* (к 40-летию Медико-генетического центра). СПб. ГУЗ МГЦ: «Феникс», 2009. 368 с.
10. Инге-Вечтомов С.Г. Язык ученого и национальная идея. *Проблемы деятельности ученого и научных коллективов* (под ред. С.А. Кугеля). Вып. 26. <http://www.grammar.ru/KOL/?id=1.60>
11. Galton F. Biometry. *Biometrika*, 1901, V. 1, № 1, P. 7-10.

12. Lander E.S. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*, 2011, V. 470, P. 187-197.

Как учить врача-патолога? Патофизиология преобразуется в системную патобиологию и служит введением в трансляционную медицину

Чурилов Л.П.^{1}, Строев Ю.И.¹, Утехин В.И.¹, Цинзерлинг В.А.¹,
Балахонов А.В.²,
Молитвин М.Н.³, Ковач З.⁴*

¹Кафедра патологии, ²кафедра физиологии, медицинский факультет, ³кафедра гистологии и цитологии, биолого-почвенный факультет

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*197106, Россия, Санкт-Петербург, В.О. 21-я линия, д. 8а, оф. 111;
тел: +7 904 336 3017, e-mail: elpach@mail.ru

⁴Кафедра патофизиологии, медицинский факультет, Загребский университет, Загреб, Хорватия

Резюме. Патофизиология как наука и учебный предмет стоит перед лицом крупнейшего вызова в своей истории. Она расширилась далеко за пределы своего исторического названия и включила аспекты патохимии, иммунопатологии, патобиофизики, патоинформатики, при взаимопроникновении с трансляционной медициной. Подобные процессы превалируют и в области патологической анатомии, что способствует реинтеграции ранее разветвившихся сестринских отраслей патологии. Обучение/изучение патофизиологии должно быть изменено в соответствии с нуждами современности, интегративной ролью в системе медицинских наук, аналогичной системной биологии в немедицинских науках о живом. Патофизиология вырастает в клинику через лабораторные и функционально-диагностические пробы, представляющие собой контролируемые клинические эксперименты в целях лечебно-диагностического процесса. Таким образом, врачи кабинетов функциональной диагностики, служб клинической иммунологии, биохимии, генетики являются клиническими патологами. Каждый диагност создает концептуальную модель заболевания с целью объяснить и скомпоновать данные применительно к сути конкретного случая

заболевания. Но именно в этом суть клинической патофизиологии, следовательно, компетенция диагноста основывается на ней. Патобиология связывает научное и клиническое мышление и обеспечивает формирование общего языка многообразных ветвей медицины. Дан критический анализ нестыковок между имеющимися программами медицинского и биологического образования, как причин задержки в развитии трансляционных исследований из-за нехватки компетентного персонала. Рассмотрен опыт инновационного междисциплинарного обучения в СПбГУ и Университете Загреба применительно к необходимости разработки новых учебных направлений и программ по патобиологии, открытых для студентов медицинских и биологических факультетов (библ. ** ист.)

Ключевые слова: алгоритмизованное обучение, междисциплинарное обучение, патобиология, патофизиология, патология, проектно-ориентированное обучение, системный подход, типовые патологические процессы, трансляционная медицина, этиопатогенетические кластеры, язык медицины.

How to Teach a Physician-Pathologist? Pathophysiology transforms into Syst Pathobiology Being an Introduction into Translational Medic

Churilov L.P.^{1*}, *Stroev Y.I.*¹, *Utekhin V.I.*¹, *Zinserling V.A.*¹, *Balakhonov A.B.*²,

*Molitvin M.N.*³, *Kovač Z.*⁴

¹Dept of Pathology, ²Dept of Physiology, School of Medicine, ³Dept of Histology & Cytology, Faculty of Biology & Soil Science, St. Petersburg State University,

St.Petersburg, Russian Federation

*of. 111, bld 8a, 21st line V.O., St. Petersburg, Russian Federation, 197106;

phone: +7 904 336 3017, e-mail: elpach@mail.ru

⁴Dept of Pathophysiology, School of Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia.

Abstract. Pathophysiology as a science and curriculum discipline stands in front of biggest challenge in its history. It extended far beyond the limits of its historical name and embedded aspects of Pathochemistry, Immunopathology, Pathobiophysics and Pathoinformatics, intermingling with Translational Medicine. Similar process prevails in Anatomic

Pathology, thus re-integrating sister branches of Pathology, earlier ramified. Teaching and learning of Pathophysiology should be modernized in accordance with the needs of nowadays, under the bias of its integrative role for Medicine, analogous to that of Systems Biology among non-medical Life Sciences. Current Pathophysiology grew into clinics (via laboratory and functional diagnostic tests, which are controlled clinical experiments). Thus, physicians of functional diagnosis, clinical immunology and biochemistry services, are in fact clinical pathologists. Every diagnostician has to compose a conceptual model of disease in order to explain and combine data for comprehension of a case. But, such modeling is inherent to Pathophysiology; hence competence of diagnostician is based on it. Pathobiology is bridging scientific and clinical modes of reasoning and establishing common thesaurus for multiple branches of Medicine. The discrepancy between existing biological and medical education is criticized as a reason for retardation in competent staff supply for translational studies. The experience of multidisciplinary innovative teaching from St. Petersburg and Zagreb Universities is discussed in relation to needs in new educational programmes in Pathobiology, open both for students of biological and medical faculties. [bibl.: ** refs]

Keywords: algorythmic learning, interdisciplinary teaching, etiopathogenetic clusters, medical thesaurus, pathobiology, pathophysiology, pathology, project-oriented learning, systemic approach, translational medicine, typical pathological processes.

Оставаясь прикладной областью человеческой культуры, связанной со здоровьем и болезнями [1], современная медицина, более чем когда-либо ассимилирует и использует достижения фундаментальных наук и создаваемые на их основе методы, технологии, приборы и инструменты. С другой стороны, в комплексе классических естественных наук активно развиваются направления, целью которых служит непосредственный и быстрый перевод (translation) получаемых результатов в медицинскую лабораторную и клиническую практику. Уже сложился специальный термин: «translational sciences». Однако, в отличие от зарубежных университетов, в системе российского высшего профессионального образования пока не готовят специалистов широкого профиля для работы на границах медицины и естественных наук. Это неизбежно приводит к отставанию в числе и качестве естественно-научных разработок для медицины, а существующие программы подготовки студентов-физиков, химиков, биологов и т.п. не предусматривают достаточно

глубокого погружения в медицинскую тематику. Это ограничивает профессиональную состоятельность биолога, работающего в медицинском учреждении.

В то же время выпускники медфаков классических университетов (да и медвузов, лишенных естественных факультетов), обучающиеся по специальностям «Лечебное дело», «Педиатрия», «Стоматология», в силу специфики этих специальностей не могут получить достаточно глубоких естественно-научных знаний, которые могли бы использоваться ими для создания, освоения и применения в практике здравоохранения современных методик и технологий, а также для грамотной постановки задач перед исследователями смежных специальностей. Холизм клинической медицины и редукционизм молекулярной и клеточной биологии не стыкуются в компетенциях выпускников разных факультетов. Поэтому развитие отечественной трансляционной медицины сдерживается нехваткой компетентных кадров. Переучивание и доучивание молодого биолога или медика на рабочих местах ведет к снижению эффективности работы смешанных коллективов, которые фактически решают в это время не научные, а образовательные задачи

В некоторых российских медвузах с конца 60-х годов XX в. реализуются основные образовательные программы подготовки специалистов: 060112 «Медицинская биохимия», 060113 «Медицинская биофизика» и 060114 «Медицинская кибернетика». Они ориентированы, соответственно, на подготовку врача-биохимика, врача-биофизика и врача-кибернетика для работы в учреждениях здравоохранения. К сожалению, в силу специфики подготовки клинициста и особенностей профессорско-преподавательского состава медвузов, а также оторванности многих учебных заведений от современных естественно-научных исследований и разработок, компетенции выпускников данных программ не соответствуют в полной мере вызовам времени. К тому же по каждой из этих специальностей подготовка дает достаточно узкий профиль и спектр дальнейшего трудоустройства. Для решения этой проблемы необходимо начать подготовку нового поколения кадров. Она должна осуществляться в классических университетах, где имеются все необходимое для интеграции достижений медицины и естественных наук и ее воплощения в учебном, клиничко-диагностическом и научно-исследовательском процессе. В связи с этим и ввиду перспективной задачи создания современной университетской клиники, в СПбГУ разрабатываются

соответствующие образовательные программы. В рамках этого нового направления обучения нам видится *основная образовательная программа (магистратура)* для выпускников бакалавриата естественнонаучных направлений. Она ориентирована на подготовку исследователей и разработчиков лечебных, диагностических и профилактических методов и технологий, концептуальных и экспериментальных моделей болезней и патологических процессов, лекарственных средств и включает в числе прочего введение в медицинский тезаурус и тематику, а также формирование основ клинического мышления.

На общей кадровой, информационно-методической и материально-технической базе может параллельно развиваться *образовательная программа послевузовского образования (клиническая ординатура)* для выпускников по специальностям «Лечебное дело», «Педиатрия», «Стоматология». Она ориентирована на подготовку врачей, способных эффективно проводить исследования и разработку методов, технологий, лекарственных средств и т.п. в области медицины, и включает в числе прочего углубление естественно-научных умений и навыков и формирование основ естественно-научного мышления. Медицина как база здравоохранения и как целостное явление общественной практики включает не только научную деятельность, но и другие формы общественного сознания и человеческого действия: в ней есть элементы искусства, ремесла, бизнеса, права и даже мифологии и квази-религии [3]. В связи с этим, освоение врачебной деятельности *не сводится просто к применению научного мышления и научной методологии для решения медицинских задач*, а требует выработки у студента особого, этически более богатого, но не прецизионного клинического мышления.

Клиническое мышление – основной инструмент профессиональной умственной деятельности врача. Его важными составляющими являются распознавание болезней и патологических процессов и выбор оптимальной стратегии и тактики лечебно-профилактических мероприятий в условиях заведомо *ограниченного* естественным ходом болезни времени и априорно *неполной* информации о заболевании, о больном и лекарстве. При этом клиническое мышление ориентировано на достижение пользы для пациента как объекта приложения, реализуется в условиях повышенной ответственности и необходимости исключения (снижения) возможных рисков, руководствуется ограничивающим принципом “*primum non*

посере»". Бесспорно, оно базируется на научном мировоззрении, поскольку врач, как и естествоиспытатель, постоянно создает в голове концептуальную модель того или иного клинического случая болезни, сопоставляет ее с данными собственных наблюдений и литературы, предпринимает функциональные пробы и диагностические тесты, которые, по сути, представляют собой контролируемые клинические эксперименты в интересах лечебно-диагностического процесса [4]. Но приходится признать, что клиническая наука в устоявшемся у нас понимании носит прецедентный, алгоритмический характер. Широко внедряемая ныне «доказательная медицина» зачастую сводится к следованию авторитетным шаблонам, что, в конечном счете, не созвучно боткинскому принципу: «Лечить не болезнь, а больного» [5].

Естественнонаучное мышление ориентировано на профессиональную исследовательскую деятельность. Ее важнейшей основой служит эксперимент, т.е. создание модельных условий для изучения какого-либо феномена. При этом исследовательская деятельность в области естественных наук не может располагать алгоритмами на все случаи жизни, для решения новых проблем. Постоянно пробуя и ошибаясь, приходится находить новые подходы и методы, способы интерпретации результатов, что предопределяет их новизну. Ученый-естественник вынужден рассматривать явления в широкой совокупности связей, взаимодействий и взаимовлияний, поэтому естественнонаучные результаты представляют собой обобщения, обладающие прогностическим характером. Наконец, естественнонаучное мышление располагает значительно большей свободой как в выборе методов воздействия на объекты исследования (вплоть до разрушительного), так и во времени. Его конечная цель – собственно истина, а не благополучие и целостность объекта исследований. В классическом университетском образовании эпохи премодерна и раннего модерна естествознание и медицина были очень близки, многие выдающиеся медики того периода (например, И.-Л. Шёнляйн, И.П. Павлов, А.А. Богданов) до получения врачебной специальности заканчивали естественные факультеты университетов Европы. Но затем, в силу бурного развития методологической базы естествознания, создания государственных систем медицинского обслуживания и превращения врачебной специальности в массовую, растущей специализации медиков и биологов – несовпадение целей и задач подготовки естествоиспытателей и лечащих врачей возрастало. Особенно

отчетливо разрыв между подготовкой ученых и врачей почувствовался в СССР, где медицинское образование в начале 30-х годов было по политико-прагматическим причинам искусственно выведено правительством за рамки классических университетов. Существующая с советских времен номенклатура научных специальностей до сих пор предусматривает присуждение ученых степеней кандидата и доктора наук по прикладным клиническим специальностям (например, стоматологии, акушерству и гинекологии, ЛОР-болезням, хирургии, педиатрии, внутренним болезням и т.д.). Этого нет в странах, лидирующих в современных фундаментальных медико-биологических науках, где обладатель степени M.D. (доктор медицины) должен обязательно выйти за рамки своей клинической специальности, выполняя естественнонаучное или гуманитарное исследование, чтобы стать Ph.D.

Несовпадение и даже противоположность некоторых черт естественно-научного и клинического мышления (медик должен избегать ошибок, а для ученого цепь проб и ошибок – естественный ход экспериментального процесса), отмеченные впервые еще в 1918 г. классиком отечественной медицины Н.Я. Чистовичем [7], и поныне приводят к относительным неудачам при попытке *массово* готовить «врача-ученого».

Ограничение клинической подготовки, связанное с временными рамками учебного плана, половинчатость и односторонность научно-практических навыков и умений основной массы подготовленных по существовавшим в СССР программам «врачей-исследователей», в конечном итоге, не позволили обеспечивать конкурентоспособность отечественной медицинской науки и состоятельность отечественного здравоохранения на должном уровне. Ни одна из ранее внедренных программ обучения «врачей-ученых» не была ориентирована на подготовку клинического патолога широкого профиля, который мог бы быть системным патобиологом, интегрирующим частности для целей лечебно-диагностического процесса. В СПбГУ с самого начала формирования медицинского факультета (1995) его основателем акад. Ю.В. Наточиним была заложена идея полноценной, а не редуцированной клинической подготовки выпускников, наряду с расширенными, по сравнению с медвузами, возможности приобретения компетенций для научной деятельности [9]. Думается, что идейной основой предлагаемых новых

образовательных программ послужит *интеграция двух описанных форм научного мышления.*

Предлагаемые в рамках проекта программы магистратуры и ординатуры направлены не на подготовку врачей-ученых, а на обеспечение выпускникам (в том числе – врачам) *новых компетенций.* При этом выпускники естественно-научных факультетов, наряду с новыми знаниями, позволяющими вести ориентированную на медицинские цели исследовательскую работу, получают знание законов патологии, медицинского тезауруса и недостающие основы клинического мышления. У выпускников медфака, в свою очередь, наряду с навыками постановки естественнонаучных задач в медицинской области, планирования, проведения и анализа результатов экспериментов, будет культивироваться естественно-научное мышление, медико-инженерный и медико-информационный подходы, чему собственно профессиональная подготовка врача способствует в недостаточной мере.

Секвенирование человеческого генома и связанные с ним передовые молекулярные направления исследований фенотипа (эпигенетика, протеомика, метаболомика, фармакогеномика, антигеномика, аутоиммуномика и т.д.), успешный поиск новых объективных маркеров и критериев для прогностической и превентивной медицины, прогресс биофизики и информатики – подчеркивают важность интеграции фундаментальных и клинических дисциплин. Быстрое развитие клинических отраслей физиологии, морфологии, иммунологии, биохимии, фармакологии, медицинской генетики, появление принципиально новых неинвазивных и малоинвазивных методов функциональной диагностики, прижизненной визуализации структур и прижизненного исследования организма человека, его органов, тканей и отдельных клеток – открывают пути дальнейшего взаимообогащения различных отраслей патобиологии в ходе изучения структурно-функциональных характеристик организма пациента [11].

Патоморфология более не сосредоточена только в прозекторских и только на работе с трупным материалом, а, прежде всего, занимается прижизненной диагностикой и связанными с нею научными исследованиями. На наших глазах патофизиология из науки лабораторий и вивариев превращается в системную патобиологию, интегрируя аспекты патохимии, иммунопатологии, медицинской генетики и патоинформатики [12]. Именно эту

тенденцию трансформации патофизиологии в системную патофизиологию предвосхитил ещё основоположник патологии как науки Рудольф Вирхов, когда писал: «Под именем патологической физиологии мы понимаем настоящую теоретическую научную медицину...» [13]. Патофизиология — интегративная медико-биологическая наука и часть культуры [14-15]. Подобно тому, как в начале XX века под влиянием революции в естествознании медицина вынуждена была переосмыслить некоторые, казавшиеся незыблемыми, истины, и пришла к идеям кондиционализма и конституционализма, сейчас мы являемся свидетелями и участниками преобразования патофизиологии, диктуемого итогом развития фундаментальных наук в XX веке.

Современная патофизиология (также, впрочем, как и патологическая анатомия) переросла рамки своего исторического названия. В СССР специальность «клинический патолог» традиционно понимали только как клиническую патоморфологию, постсоветские страны унаследовали эту одностороннюю трактовку. Ныне клиническими патологами по сути своей работы являются (и именно так за рубежом и именуется – см. [17]) врачи кабинетов функциональной диагностики, врачи-иммунологи, врачи-генетики и врачи-лаборанты. А мы по-прежнему используем в штатных расписаниях странноватые термины, рожденные более 40 лет назад, то «пришпиливающие» врача к кабинету, то именующие его «лаборантом» (?). Термин «клиническая физиология» тоже интегрируется при таком прочтении как «клиническая патофизиология», ибо в больницах объектами применения физиологических методов являются не здоровые, а *больные* с их патофизиологией.

Таким образом, в XXI веке, в эпоху постмодерна после относительного разобщения эпохи модерна, фундаментальные медико-биологические науки и клиническая медицина стали сближаться. Все это позволяет многие базовые медико-биологические науки считать клиническими дисциплинами, создает основу для реинтеграции их преподавания с клиникой без утери специфики этих предметов. Возможно, пора обществам патофизиологов, патологоанатомов, клинических иммунологов, биохимиков, генетиков, физиологов – интегрироваться в ассоциацию обществ клинических патологов? Функцию интегратора клинического и естественнонаучного подходов в медицинском образовании должна выполнять патофизиология – современная синтетическая, междисциплинарная научно-

прикладная дисциплина, изучающая естественнонаучные основы патологических процессов и болезней на основании их экспериментального моделирования, а также наблюдения изменений, возникающих в клетках, тканях, органах и системах больного организма с целью установления закономерностей жизнедеятельности больного организма и закономерных изменений его структур при различных заболеваниях.

В высшем образовании многих ведущих научных держав существование «зазора» в системах подготовки врачебных и научных кадров и его растущее пагубное влияние на эффективность использования научных достижений в здравоохранении были осознаны еще на рубеже столетий [18]. Ответом на это послужила разработка учебных программ междисциплинарного характера по специальностям «Патобиология» и «Трансляционная медицина», введение специальности «патобиолог» в официальные реестры медицинских и ветеринарных специальностей в Северной Америке и ряде стран Евросоюза. В Греции это «биопатолог», в Хорватии «патобиолог», в странах Бенилюкса, Австрии и Франции применяют термины «клинический, медицинский биолог». С начала века в издательстве “S. Karger” под редакцией специалистов из Японии и Швейцарии выходит специализированный научный журнал «Pathobiology», освещающий вопросы «инновационных исследований в медико-биологических и трансляционных медицинских областях».

В странах Северной Америки, в отличие от России, Германии, Китая и ряда восточноевропейских государств, ранее не было исторической традиции преподавания медикам патофизиологии как отдельного предмета, а кафедры патологии имели патоморфологический профиль. Поэтому, заново открыв во второй половине XX века необходимость преподавания не только морфологических, но и более широких аспектов патобиологии, академическое сообщество США и Канады откликнулось не только открытием курсов патофизиологии – как это стало с 2003 г. в Гарварде) [19], но и изобретением термина «трансляционная медицина». Однако при ближайшем рассмотрении оказывается, что так обозначается изучение причин и механизмов болезни и клиническое использование полученных результатов, то есть именно сфера интересов патофизиологии, включая ее клиническую ветвь.

В отечественной практике, с учетом наследования лучших традиций медицинского образования, аналогичные цели и задачи

могло бы решать расширение преподавания патологии за рамки патофизиологии и патологической анатомии, до системной и прикладной патобиологии. Для этого в зарубежных университетах уже созданы специализированные образовательные программы под разными названиями.

В Загребском университете (Хорватия) преподавание патофизиологии перестроено на основе изучения «этио-патогенетических кластеров» (суть которых близка к известным в российской традиции преподавания типовым патологическим процессам и блок-схемам программированного обучения), и большое внимание уделяется алгоритмизации обучения, в тесной связи с клиническими дисциплинами, на основе коллекции выписок из *научно обработанных* (то есть, взятых не прямо из архивов клиник, а из научных публикаций жанра клинических случаев) историй болезни [21]. На кафедре патологии СПбГУ практикуется междисциплинарное интегрированное преподавание патологии, включая чтение лекций патологом и клиницистом, с демонстрацией реальных больных и клинико-патологическим разбором историй болезни, а будущие врачи-лечебники защищают курсовые и дипломные работы, в том числе по патофизиологии и патологической анатомии [4, 12].

В течение многих лет инновации в области учебных планов и программ в отечественных медвузах сдерживались централизованным контролем министерств здравоохранения и образования их учебных планов. Принятие «Закона о двух университетах» [22] облегчило инновации для профессорско-преподавательского состава МГУ и СПбГУ. В частности, в СПбГУ был принят собственный новый образовательный стандарт реализации программ по специальности «лечебное дело», кардинально отличающийся и от старого и от нового общероссийского. Значительному сокращению подверглись дисциплины общеобразовательного цикла 1-2 курсов. В то же время в обязательной программе медицинского факультета появились молекулярная биология, общая иммунология, общая онкология, частная (клиническая) патология, дополнившие - вместе с разнообразными элективами - преподавание базовых классических курсов патофизиологии и патологической анатомии. В результате студенты-медики проходят «линейку» патобиологических дисциплин с 3-го по 8-й семестры. Расширилось и удлинилось до выпускного курса преподавание английского языка. А на 6-м курсе появилось время для

полноценной субординатуры и период, выделенный для подготовки выпускной квалификационной работы [23]. Междисциплинарный характер носят созданные в СПбГУ учебные стенды по общей патологии, комбинирующие материал по патофизиологии, патоморфологии, иммунопатологии, клиническим дисциплинам и истории медицины. Они внедрены в учебный процесс не только в СПбГУ, но и в МГУ, Военно-медицинской академии и еще ряде медвузов России и Украины [1, 4].

В СССР разрыв между здравоохранением и медицинской наукой оказался настолько значительным и растущим, что он не преодолен в постсоветских странах до сих пор, тогда как в других развитых странах он в последней трети XX века нивелировался в силу инновационного характера их экономик [1]. Интеграция сестринских ветвей патологии не должна осуществляться по принципу поглощения одного другим или «двойникового уродства», когда гипертрофируется одна ветвь в ущерб другой ветви. Речь идет о содержательной интеграции, расширении взаимной эрудиции преподавателей в смежных областях.

В последние годы российское государство, ставящее перспективную задачу увеличить эффективность научных разработок в области биомедицины [25], усилило финансирование сферы медицинских услуг. В качестве инструмента для концентрации и контроля над расходованием инвестиций в государственной политике используется создание крупных медицинских центров федерального или регионального подчинения по ключевым проблемным направлениям. Правильная инвестиционная политика не имеет, однако, соответствующей программной, учебно-методической поддержки со стороны системы медицинского образования. Как следствие, переподготовку и повышение квалификации медицинских работников создаваемых центров и обслуживающего персонала порой приходится проводить с привлечением иностранных специалистов либо за рубежом.

Эта проблема имеет и другую сторону. Врачи на местах зачастую не представляют себе диагностических и лечебных возможностей, которыми располагают новейшие медицинские центры, не способны корректно ставить задачи для лечения направляемых туда пациентов. Это приводит к дублированию многих видов медицинских работ, затягиванию сроков пребывания пациентов в специализированных центрах, к снижению их

пропускной способности, сокращает число граждан, получающих в срок высокотехнологичную медицинскую помощь.

В ряде ведущих университетов создаются ресурсные центры развития молекулярных и клеточных исследовательских технологий. Открытие программ и направлений патобиологического образования могло бы сделать их полем практики и последующего трудоустройства для таких специалистов, сняло бы трудности, связанные с тем, что клиническая наука, руководящие кадры которой воспитывались старой системой медицинского образования, порой долго и трудно ищет «мосты» для взаимодействия с биологами, работающими в таких центрах, грамотного «озадачивания и загрузки» имеющегося потенциала медицинской проблематикой.

Таким образом, актуальность этих программ в русле государственной политики, в свете интересов потенциальных работодателей и запросов рынка труда определяется потребностью в универсальных специалистах как с медицинским, так и с фундаментальным научным образованием, обладающих междисциплинарной подготовкой и способных обеспечить использование наиболее современных методов и приборов для решения задач биомедицины и здравоохранения. Ключевым риском может оказаться отсутствие в номенклатуре специальностей позиций, адекватно отражающих компетенции выпускников создаваемых программ. Риск может быть исключен в ходе работы с соответствующими федеральными структурами, в первую очередь – Минздравом.

Актуальной остается еще одна трудность на пути обновления подходов в медицинском образовании. Медицина – последняя из важнейших наук, все еще не создавшая, в отличие от физики и химии, единого для всех своих областей и субспециализаций языка. Вместо него существует совокупность узкопрофессиональных жаргонов. Зачастую медики разных специальностей именуют разными терминами одно и то же, а одинаковыми – различные по сути предметы и явления. Многие исторически сложившиеся названия пришли в коренное противоречие со вновь открытой сутью тех медицинских понятий, которые ими обозначаются или с содержанием смежных областей медицины, став лже-терминами [26]. О пагубности этого писал еще И.В. Давыдовский (1887-1968), выдающийся патолог, блестяще интегрировавший в своем мышлении и патофизиологию, и патоморфологию [27]. Основой единого, интегрированного языка

биомедицины, основного средства системного патобиологического мышления врача-патолога должен стать общепатологический тезаурус, и эта задача также приблизится к решению, если в университетах начнется подготовка кадров по направлению «патобиология».

Список литературы:

1. Орлов С.Н., Строев Ю.И., Чурилов Л.П. Что такое современная патофизиология? Размышления участников всемирного форума патофизиологов в Монреале // Патол. физиол. эксперим. терап. – 2011. - №2. – с. 3 – 12.
2. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 07.07.2009 N 415н «Об утверждении квалификационных требований к специалистам с высшим и послевузовским медицинским и фармацевтическим образованием в сфере здравоохранения». Интернет-ресурс, URL: <http://base.garant.ru/12168285/> [дата доступа: 26 мая 2013 г.]
3. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Быть здоровым или иметь здоровье? Сообщение I. Медико-этическая проблема в индустриальном и постиндустриальном мире // Актуальн. пробл. трансп. медицины (Одесса). – 2013. — № 1(31). – с. 8 – 15.
4. Строев Ю.И., Утехин В.И., Чурилов Л.П. Опыт междисциплинарной интеграции и применения инновационно-образовательных технологий // Мед.— XXI век. – 2007. — № 9(10). – с. 28 —37.
5. Боткин С.П. Курс клиники внутренних болезней. – М., 1950.
6. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Общая патофизиология с основами иммунопатологии. СПб.: ЭлБи-СПб, 2008. – с. 15 – 17.
7. Чистович Н.Я. Клинические лекции. – Петроград: Изд. К.Л. Риккера, 1918. – С. 4–6.
8. Зильбер А.П. Врачи-труэнты. Очерки о врачах, прославившихся вне медицины. СПб.: АРКА-Эрмитаж, 2012. – 460 с.
9. Стратегия развития Медицинского лечебно-профилактического учебно-научного центра ФГОУВПО СПбГУ на 2006-2010 гг. // Мед. XXI век. –2006.–№4(5).– с. 3 – 7.

10. Форум студентов биолого-почвенного факультета СПбГУ. Интернет-ресурс, URL: <http://pda.spbgu.ru/t46566.html> [дата доступа - 26 мая 2013 г.].
11. Методические рекомендации по преподаванию патофизиологии. Выработаны Шанхайским международным симпозиумом 2009 г. по проблемам преподавания патофизиологии. Утверждены 6-м Монреальским конгрессом международного общества патофизиологов 2010 г. (пер. с англ. Чурилова Л.П., Мясникова А.А.)// Таврич. мед.-биол. вестн. – 2012. – т. 15. - № 3. – ч. 2. – с. 282 – 283.
12. Чурилов Л.П. , Строев Ю.И., Утехин В.И., Цинзерлинг В.А. Об университетской практике интегрированного преподавания: возврат к прошлому или шаг в будущее? В кн.: Тезисы 4-й Всеросс. уч.-метод. конф-и. по преподаванию патологической анатомии в высш. мед. учебных заведениях. М.: ММА им. И.М. Сеченова, 2004.– с.148–149.
13. Вирхов Р., цит. по: Саркисов Д. С. Очерки истории общей патологии/АМН СССР. — М.: Медицина, 1988, с. 13.
14. Крыжановский Г.Н. Современная патофизиология – состояние и перспективы // Лекции I Росс. конгресса по патофизиологии 17-19 окт. 1996 г. – М., 1996. – с. 25.
15. Калинин М.Н. Преподавание патофизиологии в XXI веке: патофизиология как элемент российской культуры // Мат-лы научн. конф-и, посв. 100-летию каф. патофизиологии СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова 23-29 окт. 1998 г.— СПб.: СПбГМУ, 1998.— С. 48-49.
16. Брикман Т. Как повысить эффективность клинической диагностики и лабораторной медицины? // Клини.-лаб. консилиум. – 2009. – №4. – с. 7 – 9.
17. Chandrasoma P., Taylor C.L. Who is Pathologist? /Concise Pathology, 3rd Ed. Stamford: Appleton & Lange, 1998. – P. 3 – 4.
18. Gray M.L., Bonventre J.V. Training PhD researchers to translate science to clinical medicine: Closing the gap from the other side// Nature - Medicine. - 2002. - V. 8, Pp. 433 - 436 (2002), doi:10.1038/nm0502-433.
19. Shields H., Nambudiri V.E., Leffler D.A.... Llerena-Quinn R. et al. Using medical students to enhance curricular interaction

- of cross-cultural content // Kaohsiung J. Med. Sci. – 2009. – V. 25. – N 9. – Pp. 493 – 502.
20. Rotstein O.D., Training in translational research for graduate students at the University of Toronto // Chinese J. Pathophysiol. – 2009. – v. 25. – N 11. – Suppl. Abstracts of Internat. Sympos. for Pathophysiology Teaching (ISPT 2009), Nov. 20–Nov. 23, 2009, 2nd Military Medical Univ. Shanghai, PRC, URL: <http://cpfd.cnki.com.cn/Article/CPFDTOTAL-ZGBH200911002049.htm> (дата доступа: 13 августа 2011 г.).
21. Kovač Z. Case-based methodology in synthetic learning/teaching of Pathophysiology// Gene-Environment interaction in health and disease. 6th Internat. Congr. of Pathophysiology, 22-25 Sept. 2010. Montreal : ISP Publ. Abstract book. – P. 28.
22. Федеральный закон Российской Федерации от 10 ноября 2009 г. N 259-ФЗ "О Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова и Санкт-Петербургском государственном университете". Интернет-ресурс, URL: <http://www.rg.ru/2009/11/13/university-dok.html> [дата доступа: 26 мая 2013 г.].
23. Санкт-Петербургский государственный университет. Медицинский факультет. Образовательные стандарты. Интернет-ресурс, URL: <http://med.spbu.ru/index3.htm> [дата доступа: 26 мая 2013 г.].
24. Линдеман В.К. Учебник общей патологии. Тт.1-2, Киев, 1910-1911.
25. Стратегия развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 г. Интернет-ресурс, URL: http://rosminzdrav.ru/health/62/Strategiya_razvitiya_meditcins_koj_nauki.pdf [дата доступа: 26 мая 2013 г.].
26. Балахонов А.В., Мясников А.А., Строев Ю.И., Чурилов Л.П. Системное естественнонаучное знание и единый язык медицины – когнитивный фундамент высшего медицинского образования// Бюлетень Х читань ім. В.В. Подвысоцького.- 26-27 травня 2011 року, Одеса: ОНМУ, 2011.–с. 8–12.

Научное издание

**МУЛЬТИДИСЦИПЛИНАРНЫЕ АСПЕКТЫ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЫ**

Сборник материалов I Международного форума
«Молекулярная медицина – новая модель здравоохранения XXI
века:
технологии, экономика, образование»

26-27 июня 2013 года

Под научной редакцией И.А. Максимцева, В.И. Ларионовой

Тезисы и статьи печатаются в авторской редакции

Подписано в печать 20.06.13. Формат 60x84 1/16.
Усл. печ. л. 14,25. Тираж 300 экз. Заказ 267. РТП изд-ва СПбГЭУ.

Издательство СПбГЭУ. 191023, Санкт-Петербург, Садовая ул., д.21