

Результати досліджень показали, що делеції 7,8 екзонів гена SMN та ексона 5 гена NAIP супроводжуються важкими клінічними проявами СМА.

Приведены результаты делеционного анализа 7-го и 8-го экзонов гена SMN и 5-го экзона гена NAIP в пробандов с I, II, III типами СМА из западного региона Украины. Результаты исследований показали, что делеции 7,8 экзонов гена SMN и экзона 5 гена NAIP сопровождаются тяжелыми клиническими проявлениями СМА.

It is shown the results of 7 and 8 exons of SMN gene and 5 exon of NAIP gene deletion analysis among probands with I, II, III types of SMA from the west Ukrainian region. The results revealed that deletions of the SMN gene 7 and 8 exons and 5 exon of NAIP gene were detected among the patients with heavy clinical symptoms of SMA.

**ТЫЖНЕНКО Т.В.<sup>1</sup>, КАРАЧЕНЦЕВ Ю.И.<sup>1</sup>, ПОЧЕРНЯЕВ А.К.<sup>1</sup>,  
ГОРШУНСКАЯ М.Ю.<sup>2</sup>, АТРАМЕНТОВА Л.А.<sup>1,3</sup>, КРАВЧУН Н.А.<sup>1</sup> ПОЛТОРАК В.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ГУ “Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины”, Украина, 61002, Харьков, ул. Артёма, 10;

<sup>2</sup> Харьковская медицинская академия последипломного образования Украина, 61176, Харьков, ул. Корчагинцев, 58;

<sup>3</sup> Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина Украина, 61077, Харьков, пл.Свободы, 4. E-mail: [wshkoda23@rambler.ru](mailto:wshkoda23@rambler.ru)

#### **РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ ПО ЛОКУСАМ *PON1* И *APM1* В ГРУППЕ ДОНОРОВ НАСЕЛЕНИЯ ХАРЬКОВА**

Эндокринные и кардиоваскулярные заболевания являются наиболее многочисленными в группе так называемых «болезней цивилизации», поэтому поиск их маркёров и кандидатных генов – актуальная задача медицинской генетики. В связи именно с этой проблемой интенсивно исследуется полиморфизмы гена параоксоназы *PON-1* и гена адипонектина *APM1*.

Ген параоксоназы локализован на седьмой хромосоме (7q21–22) [1]. Его продукт – фермент параоксоназа проявляет активность по отношению к широкому спектру субстратов, участвуя в детоксикации органофосфатов, предупреждая атерогенные модификации липопротеинов низкой и высокой плотности [2-4]. Известны различные полиморфизмы *PON-1*, приводящие к изменению активности параоксоназы. Один из них – однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism, SNP) *PON-1* представляет собой несинонимическую замену Q192R SNP в Region Ex6+78A>G [1]. Полиморфизм *PON-1* 192 неодинаково представлен в разных популяциях и по-разному ассоциирован с кардиоваскулярными и эндокринными заболеваниями [5-7].

Ген адипонектина *APM1*, находится на третьей хромосоме в локусе 3q27 [8, 9, 10]. Ему отводится роль кандидатного гена сахарного диабетом 2-го типа [11], так как продукт этого гена – гормон адипонектин, модулируя чувствительность к инсулину, участвует в регуляции инсулинорезистентности [8, 12–14]. Как показано на ряде этнических групп и популяций, однонуклеотидный полиморфизм, представляющий собой замену гуанина (G) на тимин (T) во втором интроне (SNP +276G>T (регион IVS2+62G>T)), наиболее тесно, ассоциирован с заболеванием.

Несовпадение результатов относительно ассоциаций генов с заболеваниями [12, 15-18] вызывает дискуссии среди учёных, в которых высказываются различные соображения относительно источников разногласий. Одной из причин несогласованности результатов называют статистическую флуктуацию, связанную с размером выборок, статистические погрешности, связанные с эффектом множественных сравнений, работой на смещённых выборках. В качестве другой

причины называют несопоставимость характеристики генофондов у представителей разных этнических групп и популяций, не учёт пола и возраста обследованных. Считается также, что помехи могут быть связаны с неодинаковой семейной историей обследованных. Кроме того, могут не совпадать критерии при формировании контрольной группы.

Связь полиморфизма генов с особенностями метаболизма обычно изучают на группах больных, поэтому данных о распределении полиморфизмов в общих популяциях немного. Между тем, информация о региональной частоте аллелей и генотипов является той базой, на которой строится система генетического прогнозирования и первичной профилактики. Всё изложенное определило цель данного исследования: сравнить распределение генотипов в выборке из населения Харькова по двум аутосомным генам *PON1* и *APM1*.

### Материалы и методы

Образцы крови и генеалогические данные 109 доноров были получены на Харьковской областной станции службы крови с их письменного согласия. ДНК выделена из лейкоцитов при помощи ионообменной смолы *Челекс-100 (ChelexR100)* [19]. Однонуклеотидную замену, которая ведет к изменению в аминокислотной последовательности параоксоназы в позиции 192 с глутамина на аргинин, определяли путём амплификации в полимеразной цепной реакции фрагмента гена размером 199 пар нуклеотидов с последующим гидролизом эндонуклеазой *BspPI*. Были использованы прямой (*PON192F TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG*) и обратный (*PON192R GACATACTTGCCATCGGGTGAA*) праймеры [20]. Определяли также однонуклеотидную замену, локализованную во 2 интроне гена адипонектина (SNP +276G>T). Был использован прямой (*APM276F GGCCTCTTTCATCACAGACC*) и обратный (*APM276R AGATGCAGCAAAGCCAAAGT*) праймеры и эндонуклеаза *SmaI* [21]. В качестве маркера молекулярной массы была использована ДНК *pUC19*, гидролизованная эндонуклеазой *MspI*. Разделение фрагментов ДНК после рестрикции проводили с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле.

Проверка статистических гипотез о соответствии фактического и теоретического распределений проведена с помощью критерия  $\chi^2$  на уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В изученной группе по гену *PON1* частота аллеля *Q* составляет 0,67, аллеля *R* – 0,33. Распределение генотипов значимо не отличается от соотношения, характерного для панмиктической популяции. В этой же группе частоты аллелей гена *APM1* составили для *T* и *G* соответственно 0,55 и 0,45. По этому гену фактическое соотношение генотипов с теоретически ожидаемым не совпало (табл.1). Удельный вес гетерозигот *TG* оказался 1,55 раз больше, а число гомозигот меньше, чем при панмиксии (*TT* составляет 0,55, а *GG* 0,33 от теоретически ожидаемого).

Таблица 1

Распределение генотипов

Локус	Генотипы	Количество		Статистики
		фактическое	теоретическое	
<i>PON1</i>	<i>QQ</i>	47	49,38	$\chi^2 = 1,44; \chi^2_{st} = 3,84; df = 1; p > 0,05$
	<i>QR</i>	53	48,64	
	<i>RR</i>	9	11,98	
<i>APM1</i>	<i>TT</i>	17	31,16	$\chi^2 = 31,0; \chi^2_{st} = 3,84; df = 1; p < 0,001$
	<i>TG</i>	79	50,98	
	<i>GG</i>	7	20,86	

Примечание:  $\chi^2$  и  $\chi^2_{st}$  – фактическое и пороговое значение критерия, *df* - число степеней свободы, *p* – уровень значимости

В качестве обсуждения причин, по которым изученная группа оказалась смещённой от состояния равновесия, можно выдвинуть следующие причины. Одна из них – отбор в пользу гетерозигот. Учитывая, что в современном населении Харькова до взрослого состояния доживает почти 98 % родившихся [22], можно предположить, что такой отбор происходит пренатально и осуществляется путём элиминации гомозигот или избирательного гетерогамного оплодотворения по локусу *APM1*. К избытку гетерозигот может приводить и отрицательная брачная ассортативность по признакам, сопряжённым с анализируемым геном. Нельзя исключить также и то, что наблюдаемый эффект может быть связан с особенностью формирования группы. Дело в том, что группа в строгом смысле не может считаться репрезентативной выборкой населения, поскольку формировалась из доноров крови, к здоровью которых, как известно, предъявляются довольно жёсткие требования. Возможно, по этой причине в выборку не попала часть населения с ослабленным здоровьем. Такая ситуация возможна, если ген *APM1* действительно ассоциирован с заболеваниями, по которым определяется пригодность к донорству. В этом случае в выборку с большей вероятностью попадают люди с более крепким здоровьем, что часто сопряжено с повышенной гетерозиготностью.

**Выводы.** Различия в структуре популяции по указанным локусам могут указывать на их неодинаковую эволюционно-генетическую роль в патогенезе эндокринных и сердечно-сосудистых заболеваний. Хотя высказанные предположения ещё ждут экспериментальной проверки, найденные популяционно-генетические характеристики уже могут быть использованы в качестве отправной точки при поиске молекулярных маркёров наследственной предрасположенности к таким заболеваниям как сахарный диабет 2 типа, атеросклероз, метаболический синдром и ассоциированное с ним ожирение, в основе которых лежит инсулинорезистентность (формирование последней так или иначе связано с параоксоназой или адипонектином).

#### Литература

1. *GenBank*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. GenBank is the NIH genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences.
2. Mackness M.I., Arrol S., Abbot C., Durrington P.N. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase // *Atherosclerosis*. – 1993. – Vol.104. – P.129-135.
3. Горшунська М.Ю. Активність параоксонази у жінок, хворих на цукровий діабет 2 типу: кореляція з параметрами оксидативного стресу, ліпідного профілю та глікемічного контролю // *Ендокринологія*. – 2001. – Т.6., № 2. – С. 160-165.
4. Draganov. D.I., La Du B.N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review // *Naunyn Schmiedelberg Arch. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 369. – P.78-88.
5. Antikainen M., Murtomaki S., Syvanne M. et. al. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns // *J. Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 98. – P.883-885.
6. Huang Q., Lui Y.H., Yang Q.D. et. al. Human serum paraoxonase gene polymorphism, Q192R and L55M, are not associated with the risk of cerebral infarction in Chinese Han population // *Neurol. Res.* – 2006. – Vol. 28(5). – P. 549-554.
7. Sanghera D.K., Saha N., Aston C.E., Kamboh M.I. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1997. – Vol. 17(6). – P. 1067 - 1073.
8. Fumeron F., Aubert R., Siddiq A. et. al. Adiponectin gene polymorphisms and adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period // *Diabetes*. – 2004. – V.53. – P.1150-1157.
9. Mackness M.I., Mackness P.N., Durrington P.W. et. al. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins // *Curr. Opin. Lipidol.* – 1996. – Vol.7. – P.69-76.

10. *Dursun P., Demirta E., Bayrak A., Yarali H.* Decreased serum paraoxonase 1 (PON1) activity: an additional risk factor for atherosclerotic heart disease in patients with PCOS? // *Human Reproduction*. – 2006. – Vol. 21(1). – P.104-108.
11. *Kissenbah, Sonnenberg, Myklebust J et.al.* Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – V. 97. – P. 144478-14483.
12. *Hara K., Boutin P., Mori Y. et.al.* Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population // *Diabetes*. – 2002. – V. 51. – P. 536-540.
13. *Menzaghi C., Ercolo T., Paola R.D et. al.* A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome // *Diabetes*. – 2002. – V.51. – P.2306-2312.
14. *Stumvoll M., Tschrutter O., Fritsche A. et.al.* Assotiation of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity // *Diabetes*. – 2002. – V.51. – P. 37-41.
15. *Vasseur F., Helbecque N., Dina C., et al.* Single-nucleotide polymorphism haplotypes in both proximal promoter and exon 3 of the *APM1* gene modulate adipocyte-secreted adiponectinhormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians // *Hum Mol Genet*. – 2002. – V.11. P. 2607-2614.
16. *Ohashi K., Ouchi N., Kihara S., et.al.* Adiponectin 1164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease // *J Am Coll Cardiol*. – 2004. – P. 1195-2000.
17. *Hu F.B., Doria A., Meigs J.D. et.al.* Genetic a variation of the adiponectin locus and risk of type 2 diabetes in women // *Diabetes*. – 2004. – V. 53. – P.209-231.
18. *Tso A.W.K, P.C.Sham, N.M.S. Wat, A.Xu, B.M.Y.Cheung, R.Rong, C.H.Y.Fong, J.Y.Xu, K.K.Y.Cheng, E.D.Janus, K.S.L.Lam.* Polymorphism of the gene encoding adiponectin and outcome of Chinese subjects with impaired glucose tolerance: a 5-year follow-up study // *Diabetologia*. – 2006. – V. 49. – P.1806-1815.
19. *Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R.* Chelex 100 as a medium for extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material // *BioTechniques*. – 1991.– №10. – P.506-513
20. *Ombres D., Pannitteri G., Montali A. et. al.* Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. – 1998. –Vol.18. – P.1611–1616.
21. *Pollin T. I., Tanner K., O'Connell J. R. et al.* Linkage of plasma adiponectin levels to 3q27 explained by assosiation with variation in the *APM1* gene // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54. – P. 268–274.
22. Людський розвиток в Україні: інноваційний вимір/ За ред. Лібанова. К.: Інститут демографічних та соціальних досліджень, 2008. – 315 с.

### Резюме

Собрана информация о 109 практически здоровых жителей г. Харькова. Частота аллеля *Q* гена параоксоназы среди здоровых жителей составляет 0,67; частота аллеля *R* – 0,33. Распределение генотипов значимо не отличается от равновесного соотношения. В этой же группе частоты аллелей гена адипонектина для *T* и *G* соответственно 0,55 и 0,45. Гетерозигот *TG* оказалось в 1,55 раз больше, а гомозигот в 2 раза меньше, чем при панмиксии.

Зібрана інформація про 109 практично здорових мешканців м. Харкова. Частота алеля *Q* гена параоксонази серед здорових мешканців складає 0,67 частота алеля *R* – 0,33. Розподіл генотипів значущо не відрізняється від рівноважного співвідношення. В цій же групі частоти алелей гена адипонектину для *T* і *G* відповідно 0,55 і 0,45. Гетерозигот *TG* виявилось в 1,55 раз більше, а гомозигот у 2 рази менше ніж при панміксії.

The data about 109 practically healthy Kharkov habitants were collected. Frequency of *Q* allele of paraoxonase gene is 0,67; frequency of *R* allele - 0,33 among healthy habitants. Distributing of genotype

frequencies did not deviate from equilibrium. In the same group frequency of alleles adiponektin gene for T and G was 0,55 and 0,45 correspondingly. Heterozygotes TG were 1,55-fold higher than in panmictic population; on the contrary, homozygotes were twice lower.

**ЧЕРЕДНИК Ю.А.<sup>1</sup>, КУЗЬМИН А.В.<sup>2</sup>, ЧЕРНОУСОВА Л.Н.<sup>2</sup>, АНОПРИЕНКО О.В.<sup>3</sup>, ГОРОВЕНКО Н.Г.<sup>4</sup>, КОСТРОМИНА В.П.<sup>1</sup>, БЕЛОГОРЦЕВА О.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф.Г. Яновского АМН Украины, ул. Н. Амосова, 10, г. Киев, 03680, Украина.*

<sup>2</sup>*Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, г. Москва, Россия.*

<sup>3</sup>*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, ул. Заболотного, 150, г. Киев, 03143, Украина.*

<sup>4</sup>*Киевская Медицинская Академия последипломного образования им. Шутика П.Л. МЗ Украины, ул. Дорогожицкая, 9, г. Киев, 03112, Украина.*

*E-mail: [yurach@ukr.net](mailto:yurach@ukr.net)*

### **ДНК-ДИАГНОСТИКА И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *M.tuberculosis* У ДЕТЕЙ С ЛЕГОЧНОЙ ФОРМОЙ ТУБЕРКУЛЕЗА**

По данным ВОЗ за последние несколько лет заболеваемость туберкулезом среди взрослого населения выросла в несколько раз. Ежегодно в мире туберкулезом заболевает свыше 8 млн. человек, и более 2 млн. человек умирает от этой болезни. В Украине каждый год от туберкулеза умирает свыше 10 тысяч человек. Отмечено увеличение количества случаев заболевания у лиц с впервые выявленным туберкулезом, среди которых каждым девятым больным является ребенок [1]. Растет число больных детей разных возрастных групп с преобладанием острых, быстро прогрессирующих деструктивных процессов.

Отсутствие «золотого стандарта» лабораторной диагностики туберкулеза у детей делает необходимым разработку и применение новых современных диагностических процедур, поскольку традиционные методы диагностики туберкулеза, такие как бактериоскопический и культуральный характеризуются продолжительностью выявления МБТ, недостаточной специфичностью и чувствительностью. Так, с помощью бактериоскопии выявляется лишь 10-15% детей с вероятным диагнозом туберкулез, и 30-40% с помощью культурального метода [2]. В последнее время для повышения эффективности лабораторной диагностики туберкулеза разработан целый ряд новых микробиологических, иммунологических и молекулярно-генетических методов. К наиболее перспективным относятся в первую очередь подходы, основанные на использовании техники ПЦР.

Имеющиеся данные по применению ПЦР для диагностики туберкулеза у детей демонстрируют различные результаты проводимых исследований [1]. Некоторые исследователи отмечают низкую чувствительность ПЦР-тестов у детей, что не позволяет исключить диагноз туберкулез в случае отрицательного анализа. Проблема недостаточной специфичности ПЦР проявляет себя в тех регионах, где ТБ – эндемическое заболевание и латентная инфекция *M.tuberculosis* (МБТ) является обычной [2]. Тем не менее, ряд подходов с использованием ПЦР, демонстрируют хорошие результаты, которые позволяют более эффективно использовать ПЦР процедуру для диагностики ТБ у детей [3, 4]. Методы на основе ПЦР являются незаменимыми для быстрого выявления микобактерий туберкулеза их идентификации на уровне вида и штамма, изучения эпидемиологических путей распространения инфекции с помощью генотипирования микобактерий, определения мутаций, ответственных за лекарственную устойчивость к противотуберкулезным препаратам (АМБП). Применение новых микрочип-технологий для решения данных задач