

Анализ ассоциации делеционных полиморфизмов генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1* с предрасположенностью к бронхиальной астме и особенностями ее клинических проявлений в курской популяции. Человек и его здоровье. 2005; (3):49-55.

5. Zhao M, Lewis R, Gustafson DR et al. No apparent association of *GSTP1* A313G polymorphism with breast cancer risk among postmenopausal Iowa women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2001; 10(12):1301-1302.

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПАЦИЕНТОВ С НАСЛЕДСТВЕННЫМИ СПАСТИЧЕСКИМИ ПАРАПЛЕГИЯМИ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН

Ахметгалева А.Ф.¹, Хидиятова И.М.^{1,3}, Сайфуллина Е.В.², Магжанов Р.В.², Идрисова Р.Ф.², Шавалиева В.В.³, Гаймалова А.З.³, Хуснутдинова Э.К.^{1,3}

¹ФГБУН «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия

³ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», Уфа, Россия

Введение. Наследственные спастические параплегии (НСП) – группа клинически и генетически гетерогенных нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся прогрессирующей спастичностью и гиперрефлексией нижних конечностей. В зависимости от того, является ли основной симптом единственным или сочетается с различными другими симптомами, выделяют неосложненные («чистые») или осложненные формы заболевания (Fink, 2013). Распространённость НСП варьирует в разных популяциях от 0,5 до 12 на 100000 населения (<http://www.hspersunite.org.au>), в Республике Башкортостан она составляет 3,5 на 100000 (Магжанов и др., 2013). В настоящее время известно более 70 генетических локусов (59 идентифицированных генов) (<http://neuromuscular.wustl.edu>), связанных с аутосомно-доминантными (АД), аутосомно-рецессивными (АР) и X-сцепленными типами НСП. Значительная генетическая гетерогенность НСП сочетается с популяционной неоднородностью как по распространённости заболевания, так и по спектру и частоте мутаций в ответственных генах.

Цель и задачи. Целью исследования является изучение молекулярно-генетических основ наследственных спастических параплегий у больных из РБ, направленное на оптимизацию подходов ДНК-диагностики данной группы заболеваний в исследуемом регионе. В задачи данного исследования входил анализ генов спастина (*SPAST*), атластина (*ATL1*), и белка REEP1 (*REEP1*) у пациентов из РБ и определение особенностей клинической картины заболевания у пациентов с идентифицированными мутациями.

Материал и методы. Были проанализированы ДНК 56 неродственных пациентов с диагнозом наследственная спастическая параплегия и членов их семей. Контрольная выборка составила ДНК 150 здоровых индивидов. Поиск мутаций был осуществлен методами SSCP-анализа с последующим секвенированием образцов с измененной электрофоретической подвижностью, прямое секвенирование ряда экзонов гена *SPAST*, MLPA – анализ генов *SPAST* и *ATL1*.

Основные результаты

В гене *SPAST* в результате MLPA-анализа было идентифицировано два типа мутаций: делеция 1-го экзона (del 1 ex) и дупликация 1-го экзона (dup 1 ex). Делеция первого

экзона гена *SPAST* – известная мутация, описанная ранее рядом авторов (Beetz et al., 2006; Sulek et al., 2013). В исследованной нами выборке она была выявлена в гетерозиготном состоянии в 4-х неродственных семьях пациентов татарской этнической принадлежности с аутосомно-доминантной формой НСП. Дупликация 1-го экзона идентифицирована у одного пациента, единственного больного в своей семье. Согласно опубликованным данным, дупликации являются более редкими изменениями нуклеотидной последовательности гена *SPAST*, по сравнению с делециями, но также выявляются в различных популяциях (Sulek et al., 2013). Методами секвенирования в гене *SPAST* были идентифицированы три новые, ранее неописанные мутации: две микроделеции – с.322del29 (p.Val108SerfsX18) и с.885del10 (p.Thr295ThrfsX16), и миссенс-мутация с.1114A>G (p.Arg372Gly). Микроделеции выявлены, соответственно, в семьях татарской и башкирской этнической принадлежности, в которых НСП имеет аутосомно-доминантный тип наследования. Миссенс-мутация обнаружена у пробанда марийской этнической принадлежности, спастическая параплегия у которого носит спорадический характер. Мутации обнаружены у больных НСП в гетерозиготном состоянии; они не выявлены у здоровых членов семей пациентов и в контрольных популяционных выборках, и их функциональная значимость подтверждена рядом компьютерных предсказательных программ. Общий вклад формы SPG4, обусловленной мутациями в гене *SPAST*, в общую структуру НСП в РБ составил 14,3%.

В гене *ATL1*, мутации в котором ответственны за развитие НСП формы SPG3, методом MLPA была идентифицирована дупликация третьего экзона (dup 3 ex) в гетерозиготном состоянии у пробанда из русской семьи с АД НСП. Вклад генетической формы SPG3 в структуру НСП в РБ составил 1,8%.

В гене *REEP1*, мутации в котором приводят к развитию НСП формы SPG31, было обнаружено два изменения нуклеотидной последовательности. Ранее неописанная нонсенс-мутация с.225G>A (p.Trp75*) идентифицирована в гетерозиготном состоянии у пациента русской этнической принадлежности со спорадической НСП, а известная мутация с.606+43G>T в 3'-НТО (Zuchner et al., 2006), также в гетерозиготном состоянии, была выявлена в семье башкирской этнической принадлежности с АД НСП.

Вклад генетической формы НСП SPG31 в общую структуру заболевания в РБ составил 3,6%.

При всех выявленных нами мутациях в исследованных генах клиническая картина заболевания, в целом, соответствовала неосложненной форме наследственной спастической параплегии, но характеризовалась существенной меж- и внутрисемейной вариабельностью по возрасту манифестации и проявлению основных клинических признаков. В частности, у пациента с мутацией в гене *ATL1* заболевание манифестировало в возрасте 40 лет, что не является типичным для формы заболевания SPG3, для которой характерен значительно более ранний возраст начала болезни (первое десятилетие жизни) (Durr et al., 2013).

Заключение. Таким образом, в результате анализа кодирующих последовательностей генов *SPAST*, *ATL1* и *REEP1* у пациентов с наследственной спастической параплегией из Республики Башкортостан мутации, обуславливающие развитие заболевания, были выявлены в 11 из 56 неродственных семей, что составляет 19,5%. В гене *спастина* идентифицированы три новые мутации. Полученные данные вносят вклад в познание патогенеза НСП, их географии и являются основой для разработки оптимальных для населения РБ подходов ДНК-диагностики

данной группы нейродегенеративных заболеваний.

Список используемой литературы

1. Магжанов Р.В., Сайфуллина Е.В., Идрисова Р.Ф. и др. Эпидемиологическая характеристика наследственных спастических параплегий в Республике Башкортостан. Медицинская Генетика. 2013;(7):12-16.
2. Beetz C, Nygren AOH, Schickel J et al. High frequency of partial SPAST deletions in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neurology*. 2006;67(11):1926-1930.
3. Dürr A, Camuzat A, Colin E et al. *Atlastin1* mutations are frequent in young-onset autosomal dominant spastic paraplegia. *Archives of neurology*. 2004;61(12):1867-1872
4. Fink JK Hereditary spastic paraplegia: clinicopathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta neuropathologica*. 2013;126(3):307-328.
5. Sulek A, Elert E, Rajkiewicz M et al. Screening for the hereditary spastic paraplaegias SPG4 and SPG3A with the multiplex ligation-dependent probe amplification technique in a large population of affected individuals. *Neurological Sciences*. 2013;34(2): 239-242.
6. Züchner S, Wang G, Tran-Viet K et al. Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31. *The American Journal of Human Genetics*. 2006;79(2):365-369.

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ микроРНК И НОСИТЕЛЬСТВО ИХ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ КАК БИОМАРКЕРЫ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Баулина Н.М., Башинская В.В., Киселев И.С., Попова Е.В., Бойко А.Н., Кулакова О.Г., Фаворова О.О.

ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

Введение

Рассеянный склероз (РС) - тяжелое мультифакторное хроническое воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), при котором развивается комплекс иммуноопосредованных патологических реакций, направленных на разрушение миелиновой оболочки нейронов, что впоследствии приводит к необратимой потере неврологических функций и тяжелой инвалидизации. Наиболее распространенной формой РС, существенно чаще встречающейся у женщин, является ремиттирующая форма (РРС). Течение РРС характеризуется чередованием периодов обострения с резким ухудшением симптоматики и ремиссии с полным или неполным восстановлением функций. Последнее время все большее внимание уделяется изучению роли микроРНК – коротких одноцепочечных некодирующих РНК – в регуляции развития аутоиммунного воспалительного процесса, характерного для развития и течения РРС.

Цель и задачи

Анализ экспрессии микроРНК, вовлеченных в развитие воспаления, у больных РРС в стадии ремиссии и обострения, а также анализ ассоциации аллельного полиморфизма генов микроРНК с тяжестью течения РРС с целью поиска потенциальных биомаркеров активности течения РС.

Материалы и методы

Для выявления спектра микроРНК, дифференциаль-

но экспрессирующихся у больных РРС на разных стадиях течения заболевания использовали коммерческий набор TaqMan miRNA assay (ThermoFisher Scientific). Были определены уровни экспрессии микроРНК miR-146b-5p, miR-155, miR-196a-5p, miR-21-5p, miR-223, miR-326 и miR-499a в мононуклеарных клетках (МНК) крови больных РРС в стадии ремиссии и обострения и в МНК здоровых индивидов контрольной группы с их последующим попарным сравнением. В каждую группу вошло по 12 человек. Экспрессию микроРНК анализировали у больных РРС на самой ранней стадии обострения, через 24-36 часов после его начала, до применения кортикостероидов. Больные в стадии ремиссии находились в ней не менее 6 месяцев. МНК крови выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколл-гепака. Для выделения РНК, содержащую фракцию микроРНК, использовали коммерческий набор miRNeasy Mini Kit (Qiagen), обратную транскрипцию проводили с помощью набора TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific), согласно протоколу производителя. Оценку уровней экспрессии микроРНК проводили методом количественной ПЦР в реальном времени с последующим расчетом относительной экспрессии микроРНК с использованием дельта-дельта *Ct* ($\Delta\Delta C_t$) метода. Для нормализации экспрессии микро-РНК использовали среднее значение *Ct* малой ядерной РНК RNU6-6P. Значимость различий в уровнях экспрессии ми-