

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ РЯДА МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ*

М.И. ЧУРНОСОВ¹
Е.В. НЕКИПЕЛОВА²
Т.С. ТЕКУНОВА¹, О.А. КОНЕВА¹
Е.А. РЕШЕТНИКОВ¹
Л.Ю. АКУЛОВА¹
И.С. ДОБРДОМОВА¹
О.Б. АЛТУХОВА¹, С.С. ДЕМИН¹

¹Белгородский государственный
университет

e-mail: churnosov@mail.ru

² Белгородская областная клиниче-
ская больница
Святителя Иосафа

e-mail: efimka_i@mail.ru

В работе исследована популяционно-генетическая структура населения Центральной России по данным о полиморфизме двух STR локусов Y-хромосомы (DYS393 и DYS388) и распространенность генов-кандидатов ряда мультифакториальных заболеваний: гена фактора некроза опухоли α (TNF α -308), трансформирующего фактора роста β 1 (TGF β 1-869), интерлейкина IL-1B, ангиотензин-превращающего фермента (ACE) и синтазы окиси азота eNOS (NOS3).

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, гены-кандидаты, мультифакториальные заболевания, популяционно-генетическая структура населения, генотипирование.

Изучение генетической природы мультифакториальных заболеваний (МФЗ) продолжает оставаться одной из самых сложных проблем в медицинской генетике. Успешная реализация международной программы «Геном человека», завершившейся построением подробной генетической карты человека, открыла новые возможности в изучении генетики мультифакториальных заболеваний [1, 2]. Широкое использование в исследованиях генетических основ МФЗ получили открытые в последние десятилетия методы анализа ДНК-полиморфизма: полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование, полиморфизм длин рестриционных фрагментов (ПДРФ), полиморфизм микросателлитных (STR) и минисателлитных (VNTR) нуклеотидных повторов. В настоящее время наиболее перспективными для расшифровки генетической природы широко распространенных заболеваний человека имеют открытые сравнительно недавно однонуклеотидные полиморфные маркеры [4, 5, 8]. Однонуклеотидные полиморфизмы, имея высокую частоту (1 на 100-300 нуклеотидов), значительно распространены в геноме, что позволяет проводить с их использованием широкомасштабные исследования.

Для картирования генов МФЗ у человека с использованием ДНК-маркеров применяется несколько подходов. При кандидатном картировании для исследования отбираются гены, биохимические продукты которых влияют на возникновение или течение заболевания (гены-кандидаты). Выявление ассоциаций полиморфизмов генов-кандидатов с рассматриваемым МФЗ или с его патогенетически значимыми признаками (симптомами или синдромами) позволяет в конечном результате «картировать» заболевание [10, 11, 12]. Следует отметить, что для кандидатного картирования используются только уже известные гены.

При идентификации генов наследственной предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям одним из традиционных методов является анализ сцепления ДНК – маркеров с заболеванием в семьях больных. Данный метод основан на прослеживании косегрегации генов при передаче от родителей к потомкам в ряду поколений. ДНК – маркеры, близкорасположенные к генам, ответственным за развитие заболевания, с большей вероятностью будут переданы от родителей к детям совместно [3, 8, 9].

В настоящее время для выявления генов МФЗ все более широко применяется

* Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ и РГНФ.



анализ ассоциаций, при котором, в отличие от анализа сцепления, осуществляется тестирование ассоциации между генотипом и патологическим фенотипом на выборках неродственных индивидов [1, 12]. Для этого важное значение имеют популяционные данные о распространенности среди населения исследуемых генетических маркеров.

Целью работы явилось изучение популяционно-генетической структуры населения Центральной России по данным о полиморфизме двух STR локусов Y-хромосомы (DYS393 и DYS388) и распространенности генов-кандидатов ряда мультифакториальных заболеваний: гена фактора некроза опухоли α (TNF α -308), трансформирующего фактора роста β 1 (TGF β 1-869), интерлейкина IL-1B, ангиотензин-превращающего фермента (ACE) и синтазы окиси азота eNOS (NOS3).

Материалом для исследования полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента (ACE) [7] и гена синтазы окиси азота eNOS (NOS3) [8] послужила ДНК 282 коренных жителей Белгородской области: Прохоровского (n = 137) и Красненского (n = 145) районов, полученная при экспедиционном обследовании населения этих районов.

Выборка индивидуумов для тестирования генов-кандидатов ряда мультифакториальных заболеваний формировалась на базе нефрологического отделения Областной клинической больницы (n = 241). В данной выборке проводилось генотипирование трех молекулярно-генетических маркеров: диаллельных локусов генов фактора некроза опухоли α (TNF α -308) [1], трансформирующего фактора роста β 1 (TGF β 1-869) и интерлейкина IL-1B [2, 3].

Микросателлитные локусы DYS393 и DYS388 [5, 6] Y-хромосомы изучены в популяциях Болховского района Орловской области (n = 75), Репьевского района Воронежской области (n = 89), Черемисиновского района Курской области (n = 59) и Боровского и Барятинского районов Калужской области (n = 117). Популяционная выборка формировалась при экспедиционном обследовании из лиц мужского пола, относящихся к коренному русскому населению Центральной России.

У обследованных индивидуумов осуществлялся забор венозной крови в объеме 8-9 мл из локтевой вены пробанда в пробирки с консервантом, содержащим 0,5М раствор ЭДТА (рН=8.0). Выделение геномной ДНК из периферической крови проведено методом фенольно-хлороформной экстракции.

Анализ всех локусов осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. ПЦР проводилась на амплификаторе «Терцик-МС4» производства компании «ДНК-технология» с использованием ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* производства фирмы «Силекс-М» и олигонуклеотидных праймеров, синтезированных фирмой «Синтол».

Генотипирование ДНК-маркеров производилось методом анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) продуктов ПЦР-амплификации специфических участков генома с использованием соответствующих ферментов рестрикции производства ООО "Сибэнзим" (Новосибирск) по стандартным методикам.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью общепринятых популяционно-генетических методов [4].

Исследование полиморфных маркеров генов фактора некроза опухоли α (TNF α -308), трансформирующего фактора роста β 1 (TGF β 1-869) и интерлейкина IL-1B проводили на выборке из 241 индивидуума. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Анализ частот генотипов изучаемых полиморфных маркеров генов показал, что для всех рассмотренных маркеров в выборке наблюдаемое распределение генотипов соответствует теоретически ожидаемому [9, 11].

Выявлено следующее распределение аллелей гена IL-1B: аллель Т с частотой 64,73%, аллель С – 35,27%. Самым частым генотипом является генотип СТ (53,94%), на втором месте по распространенности – генотип ТТ (37,76%), на третьем – генотип СС (8,30%). Наиболее распространенным аллелем гена фактора некроза опухоли α является аллель TNF*1 (88,36%), гена трансформирующего фактора роста β 1 – аллель Т (61,66%).



Таблица 1

Распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов фактора некроза опухоли α (TNF α -308), трансформирующего фактора роста β 1 (TGF β 1-869) и интерлейкина IL-1B среди населения Центрального Черноземья

Ген	Аллели, генотипы	Частоты (%) (n=241)
IL-1B-511 C	Аллель С	35,27
	Аллель Т	64,73
	Генотип СС	8,30
	Генотип СТ	53,94
	Генотип ТТ	37,76
TNF α -308	Аллель TNF*1	88,36
	Аллель TNF*2	11,64
	Генотип TNF1/TNF1	78,61 (125)
	Генотип TNF1/TNF2	19,50 (31)
	Генотип TNF2/TNF2	1,89 (3)
TGF β 1-869I	Аллель С	38,34
	Аллель Т	61,66
	Генотип СС	12,27 (20)
	Генотип СТ	52,15 (85)
	Генотип ТТ	35,58 (58)

При изучении гена ангиотензин-превращающего фермента (ACE) установлено, что частота аллеля ACE*I варьировала от 0,504 у жителей Прохоровского района до 0,538 у населения Красненского района (табл. 2). Аллель ACE*D встречался с частотой 0,462 и 0,496 – Красненский и Прохоровский районы соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Распределение генотипов, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, индекса фиксации полиморфных маркеров гена ангиотензин-превращающего фермента (ACE) и гена синтазы окиси азота eNOS (NOS₃) среди русского населения Белгородской области

Локусы	Прохоровский район Белгородской области	Красненский район Белгородской области
1	2	3
ACE		
ΣN	137	145
N_0		
II	32	51
ID	74	54
DD	31	40
II	34,75	41,96
ID	68,50	72,08
DD	33,75	30,96
ACE*I	0,504	0,538
ACE*D	0,496	0,462
eNOS		
N	136	148
N_0		
AA	8	5
AB	37	57
BB	91	86
N_E		



Окончание табл. 2

1	2	3
AA	5,61	7,58
AB	42,67	51,83
BB	88,16	88,58
eNOS*A	0,195	0,226
eNOS*B	0,805	0,774

При анализе аллельного полиморфизма локуса eNOS было идентифицировано 2 аллеля с числом повторов 4 (аллель А), 5 (аллель В). Максимальная частота аллеля eNOS* А была в Красненском районе и составила 0,226, в Прохоровском районе она составила 0,195. Аллель eNOS*B с максимальной частотой был выявлен в Прохоровском районе (0,805).

Исследование полиморфизма локусов DYS388 и DYS393 Y-хромосомы показало различия между частотами их аллелей в изученных популяциях Центральной России. Распределение частот аллелей в пяти популяциях Центральной России представлено в табл. 3.

Таблица 3

Частоты аллелей локусов DYS388 и DYS393 в популяциях русских Центральной России

Локус	Аллель	Орловская область Болховский район	Воронежская область Репьевский район	Курская область Черемисиновский район	Калужская область Боровский и Баятинский районы	В целом по Центральной России
DYS3	0	0,024	0,000	0,000	0,000	0,006
	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,085	0,041	0,051	0,072	0,066
	3	0,695	0,827	0,797	0,758	0,760
	4	0,195	0,122	0,136	0,156	0,162
DYS	5	0,000	0,010	0,017	0,014	0,006
	1	0,013	0,000	0,000	0,008	0,005
	2	0,720	0,723	0,814	0,752	0,753
	3	0,187	0,217	0,150	0,207	0,187
	4	0,080	0,048	0,034	0,018	0,048
	5	0,000	0,012	0,000	0,015	0,007

Самым частым в популяциях русских оказался аллель DYS393*13, частота которого во всей выборке составила 76%. С наибольшей частотой он встречается в Репьевском (82,7%) и Черемисиновском (79,7%) районах, а наименьшая распространенность этого аллеля наблюдается в Болховском районе – 69,5%. На втором месте по частоте находится аллель DYS393*14 (в общей выборке встречается с частотой 16,2%). С наибольшей частотой он выявлен в Болховском районе (19,5%), с наименьшей – в Репьевском районе (12,2%). На третьем месте по распространенности находится аллель DYS393*12. Частота его встречаемости варьирует в пределах 4,1% (Репьевский район) – 8,5% (Болховский район). В целом в Центральной России его распространенность составляет 6,6%. Редкие аллели DYS393*10, DYS393*15 встречаются среди населения Центральной России с частотой 0,6%. При этом они регистрируются не во всех популяциях. Так, аллель DYS393*10 выявлен только в Болховском районе (2,4%), аллель DYS393*15 – в Репьевском (1%), Боровском и Баятинском (1,4%) и Черемисиновском (1,7%) районах.

Самым распространенным по локусу DYS388 оказался аллель 12, частота которого во всей выборке – 75,3%. С наибольшей частотой он выявлен в Черемисиновском районе (81,4%), в Боровском и Баятинском районах его процентное содержание соста-



вило 75,2%, в Болховском и Репьевском районах он встречается с одинаковой частотой 72%. На втором месте по распространенности находится аллель DYS388*13 (в целом по данным районам Центральной России – 18,7%). С наибольшей частотой он встречается в Репьевском (21,7%) и Боровском и Барятинском (20,7%) районах, с наименьшей – в Черемисиновском районе (15%). Третьим по частоте является аллель DYS388*14 (4,8% во всей выборке), его распространенность варьирует в широких пределах – от 8% в Болховском до 1,8% в Боровском и Барятинском районах. Редкие аллели DYS388*11 и DYS388*15 встречаются среди населения Центральной России с частотой 0,5% и 0,7% соответственно.

Таким образом, нами изучено распределение частот аллелей и генотипов генов – кандидатов ряда мультифакториальных заболеваний: генов фактора некроза опухоли α (TNF α -308), трансформирующего фактора роста β 1 (TGF β 1-869), интерлейкина IL-1 β , генов ангиотензин-превращающего фермента (ACE) и изучен полиморфизм STR локусов DYS388 и DYS393 Y-хромосомы среди населения Центральной России. Выявлены популяционные особенности распространенности данных генетических маркеров. Полученные данные могут быть использованы для изучения ассоциаций рассмотренных генетических маркеров с мультифакториальными заболеваниями, при проведении судебно-медицинской экспертизы по идентификации личности и установлению предполагаемого отцовства, для рассмотрения вопросов антропогенеза населения юга Центральной России.

Литература

1. Картамышева Н.Н., Чумакова О.В., Кучеренко А.Г., Сергеева Т.В. Прогрессирование хронического гломерулонефрита: клинико-морфологические взаимосвязи // Нефрология и диализ. – 2003. – Т.5, №4. – С. 395-398
2. Камышова Е.С. Клиническое значение полиморфных маркеров гена ангиотензинпревращающего фермента, гена синтазы альдостерона и гена эндотелиальной синтазы оксида азота при хроническом гломерулонефрите. Автореферат дисс. к.м.н. – 2004. – 35 с.
3. Вашурин Т.В., Сергеева Т.В. Цитокины и адгезивные молекулы в патогенезе хронического гломерулонефрита // Нефрология и диализ. – 2002. – №4. – С.232-239.
4. Животовский Л.А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях. Итоги науки и техники. Общая генетика. – М., ВИНТИ. – 1983. – С. 76-104.
5. Кравченко С.А., Сломинская П.А. Л.А. Бец и др. Полиморфизм STR–локусов Y-хромосомы у восточных славян в трех популяциях из Белоруссии, России и Украины // Генетика, 2002. – Т.38, №1. – С.97-104.
6. Лимборская С.А., Хуснутдинова Э.К., Балановская Е.В. Этногеомика и геногеография народов Восточной Европы. – М.: Наука, 2002. – 261 с.
7. Милосердова О.В., Сломинский П.А., Тарская Л.А. и др. Полиморфные маркеры генов ангиотензиногена и ангиотензин-превращающего фермента у якутов. Отсутствие ассоциации с уровнем кровяного давления // Генетика. – 2001. – Т.37, №5. – С. 712-715.
8. Мустафина О.Е., Шагисултанова Е.И., Насибуллин Т.Р. и др. Полиморфизм минисателлита гена эндотелиальной синтазы окиси азота: исследование в популяциях Волго-Уральского региона и анализ ассоциации с инфарктом миокарда и эссенциальной гипертензией // Генетика. – 2001. – Т.37, №5. – С. 668-674.
9. Hulkkonen J. Inflammatory Cytokines and Cytokine Gene Polymorphisms in Chronic Lymphocytic Leukaemia, in Primary Sjogren's Syndrome and Healthy Subjects. – Tampere. – 2002. – 81 p.
10. Wufuer M., Fang M.W., Cheng Z.H., Qiu C.C. Polymorphism of angiotensin converting enzyme gene and natural longevity in the Xinjiang Uygur people: an association study// Zhonghua Yi Xue Za Zhi. – 2004. – V.84. – P.1603-1606.
11. Sugiura Y., Niimi T., et al. Transforming growth factor β 1 gene polymorphism in rheumatoid arthritis // Annals of the Rheumatic Diseases. – 2002. – V. 61. – P. 826-828.



POPULATION-GENETIC STRUCTURE AND THE ANALYSIS OF PREVALENCE OF GENES-CANDIDATES OF SOME MULTIFACTORIAL DISEASES AMONG THE POPULATION

M.I. CHURNOSOV¹
E.V. NEKIPELOVA²
T.S. TEKUNOVA¹
O.A. KONEVA¹, E.A. RESHETNIKOV¹
L.Yu. AKULOVA¹, I.S. DOBRODOMOVA¹
O.B. ALTUCHOVA¹, S.S. DEMIN¹

*¹Belgorod State University
e-mail: churnosov@mail.ru*

*²Belgorod Regional clinical
hospital St. Iosaf
e-mail: efimka_i@mail.ru*

At this work research the populjatsiono-genetic structure of the population of the Central Russia by data about polymorphism of two STR Y-chromosome loci (DYS393 and DYS388) and prevalence of genes-candidates of some multifactorial diseases is investigated: a factor gene некроза tumours α (TNF α -308), the transforming factor of growth β_1 (TGF β_1 -869), интерлейкина IL-1B, angiotensin-transforming of enzyme (ASYA) and синтазы окиси nitrogen eNOS (NOS3).

Key words: polimerase chain reaction, gey-candidates, multifactorial diseases, population-genetic structure of the population, genotyping.