

АЛЪМАНАХ

КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

— 47 (1) • 2019 —

Австрийский центр буллезного эпидермолиза
как модель организации помощи
при редком заболевании

Поиск идеального маркера для оценки
рецептивности эндометрия: от гистологии
до молекулярно-генетических подходов

Состояние репродуктивной системы
и алгоритм решения вопроса деторождения
у мужчин с муковисцидозом

Ассоциация генетических маркеров
целиакии с репродуктивными
нарушениями

Алгоритм молекулярно-генетического
обследования для выявления наследственного
BRCA-ассоциированного рака молочной железы

Исследование модифицирующей роли
полиморфизма митохондриальной ДНК
в манифестации синдрома Бругада

Гиперметилирование генов микроРНК *miR-124*,
miR-125b, *miR-127* и *miR-129* в карциноме
яичников вовлечено в подавление их
экспрессии и ассоциировано как с развитием,
так и с прогрессией рака яичников

Трудности дифференциальной
диагностики подтипов пограничного типа
буллезного эпидермолиза: описание двух
клинических случаев

ТЕМА НОМЕРА:

КЛИНИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА. ОРФАННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

АЛБМАНАХ

КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научно-практический журнал

Издается с 1998 г.

Периодичность – 8 выпусков в год

Учредитель – ГБУЗ МО «Московский
областной научно-исследовательский
клинический институт
им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ)

Том 47 • № 1 • 2019

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Палеев Филипп Николаевич, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., заместитель генерального директора ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России по научно-аналитической работе (Москва, Россия)

Заместитель главного редактора

Молочков Антон Владимирович, д-р мед. наук, проф., заместитель директора ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского по науке и международным связям (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Баркан Ариель, д-р мед. наук, проф., медицинский факультет, отдел метаболизма, эндокринологии и диабета отделения нейрохирургии Мичиганского университета, содиректор Центра нейроэндокринологии и заболеваний гипофиза Мичиганского университета (Энн-Арбор, США)

Белюсова Елена Александровна, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения гастроэнтерологии и гепатологии, зав. кафедрой гастроэнтерологии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Богачев-Прокофьев Александр Владимирович, д-р мед. наук, руководитель Центра новых хирургических технологий ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск, Россия)

Брагин Анатолий Григорьевич, д-р биол. наук, научный сотрудник Центра по эпилепсии, отделение неврологии Калифорнийского университета (Лос-Анджелес, США)

Васюк Юрий Александрович, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой клинической функциональной диагностики ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России (Москва, Россия)

Голухова Елена Зеликовна, академик РАН, д-р мед. наук, проф., руководитель отделения неинвазивной аритмологии ФГБУ «ННПЦССХ им. А.Н. Бакулева» Минздрава России (Москва, Россия)

Давыдов Михаил Михайлович, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, зав. хирургическим торакальным отделением НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Добрынина Лариса Анатольевна, д-р мед. наук, руководитель 3-го неврологического отделения ФГБНУ НЦН (Москва, Россия)

Драпкина Оксана Михайловна, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., директор ФГБУ «ГНИЦПМ» Минздрава России (Москва, Россия)

Киров Михаил Юрьевич, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой анестезиологии и реаниматологии ФГБОУ ВО СГМУ (г. Архангельск) Минздрава России (Архангельск, Россия)

Мельниченко Галина Афанасьевна, академик РАН, д-р мед. наук, проф., директор Института клинической эндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Нероев Владимир Владимирович, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., директор ФГБУ «ГНИЦПМ» Минздрава России (Москва, Россия)

Овезов Алексей Мурадович, д-р мед. наук, зав. отделением анестезиологии, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Пономаренко Геннадий Николаевич, д-р мед. наук, профессор, генеральный директор ФГБУ ФНЦРИ им. Г.А. Альбрехта Минтруда России (Санкт-Петербург, Россия)

Романко Юрий Сергеевич, д-р мед. наук, руководитель научно-организационного отдела Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России (Обнинск, Калужская область, Россия)

Редактор-составитель выпуска

Асанов Алий Юрьевич, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской генетики ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Москва, Россия)

Научные редакторы выпуска

Коталевская Юлия Юрьевна, канд. мед. наук, зав. консультативным отделением медико-генетического центра ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Опарина Наталья Вячеславовна, врач-лабораторный генетик медико-генетической лаборатории ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Ответственный редактор

Парпара Олеся Анатольевна (Москва, Россия)

Шахова Наталия Михайловна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биофотоники, отдел радиофизических методов в медицине, отделение нелинейной динамики и оптики, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр ИФФ РАН» (Нижний Новгород, Россия)

Шишацкая Екатерина Игоревна, профессор РАН, д-р биол. наук, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Председатель: **Палеев Николай Романович**, академик РАН, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой терапии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Бухфельдер Михаэль, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения нейрохирургии Университетской клиники г. Эрланген (Эрланген, Германия)

Вольфенбюттель Брюс, д-р мед. наук, профессор, руководитель Департамента эндокринологии Университетского медицинского центра Гронингена (Гронинген, Нидерланды)

Густина Андреа, д-р мед. наук, президент Европейского общества эндокринологов, профессор кафедры эндокринологии, Университет Вита Салюте Сан-Рафаэле (Милан, Италия)

Де Херт Стефан, д-р мед. наук, председатель научного комплекса Европейского общества анестезиологии, профессор кафедры анестезиологии и периперативной медицины Гентского университета (Гент, Бельгия)

Кушлинский Николай Евгеньевич, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией клинической биохимии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Литвинов Рустем Игоревич, д-р мед. наук, профессор, старший исследователь отдела клеточной биологии и биологии развития медицинского факультета Пенсильванского университета (Филадельфия, США)

Лобзин Юрий Владимирович, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, директор ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия)

Майр Йоханнес, д-р мед. наук, профессор, консультант по детской хирургии отделения детской хирургии Педиатрической клиники Университета Базеля (Базель, Швейцария)

Мурешану Дафин Ф., д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой и клиникой неврологии медицинского факультета Медико-фармацевтического университета г. Клуж-Напока (Клуж-Напока, Румыния)

Наймарк Олег Борисович, д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. лабораторией физических основ прочности ИМСС УрО РАН – филиал ПОИЦ УрО РАН (Пермь, Россия)

Райниш Уолтер, д-р мед. наук, профессор кафедры гастроэнтерологии медицинского факультета Университета МакМастер (Гамильтон, Канада)

Ян Чи, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения челюстно-лицевой хирургии Шанхайского 9-го народного госпиталя, Шанхайский университет Цзяо Тун (Шанхай, Китай)

ТЕМА НОМЕРА:
КЛИНИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА.
ОРФАННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Альманах клинической медицины.
2019; 47 (1)

Содержание

Приглашенная статья

Продингер К.М., Лаймер М., Бауэр Й., Хинтнер Х.

Австрийский центр буллезного эпидермолиза (Epidermolysis bullosa House Austria) как модель организации помощи при редком заболевании 2

Обзор

Кибанов М.В., Махмудова Г.М., Гохберг Я.А.

Поиск идеального маркера для оценки рецептивности эндометрия: от гистологии до современных молекулярно-генетических подходов 12

Оригинальные статьи

Репина С.А., Красовский С.А., Шмарина Г.В., Штаут М.И., Жекайте Е.К., Воронкова А.Ю., Шерман В.Д., Кондратьева Е.И., Черных В.Б.

Состояние репродуктивной системы и алгоритм решения вопроса деторождения у мужчин с муковисцидозом 26

Петрова Н.В., Марахонов А.Ю., Васильева Т.А., Каширская Н.Ю., Кондратьева Е.И., Жекайте Е.К., Воронкова А.Ю., Шерман В.Д., Галкина В.А., Гинтер Е.К., Куцев С.И., Зинченко Р.А.

Особенности спектра мутаций, выявленных при комплексном исследовании гена CFTR у российских больных муковисцидозом 38

Брага Э.А., Пронина И.В., Уткин Д.О., Филиппова Е.А., Бурденный А.М., Логинов В.И., Фридман М.В., Казубская Т.П., Кушлинский Н.Е.

Гиперметилирование генов микроРНК miR-124, miR-125b, miR-127 и miR-129 в карциноме яичников вовлечено в подавление их экспрессии и ассоциировано как с развитием, так и с прогрессией рака яичников 47

Снигирева Г.П., Румянцева В.А., Новикова Е.И., Новицкая Н.Н., Телышева Е.Н., Хазинс Е.Д., Шайхаев Е.Г.

Алгоритм молекулярно-генетического обследования для выявления наследственного BRCA-ассоциированного рака молочной железы 54

Голубенко М.В., Михайлов В.С., Заклязьминская Е.В.

Исследование модифицирующей роли полиморфизма митохондриальной ДНК в манифестации синдрома Бругада 66

Минайчева Л.И., Брагина Е.Ю., Жалсанова И.Ж., Чеснокова Н.А., Марусин А.В.

Ассоциация генетических маркеров целиакии с репродуктивными нарушениями 72

Клинические наблюдения

Коталевская Ю.Ю., Марычева Н.М.

Трудности дифференциальной диагностики подтипов пограничного типа буллезного эпидермолиза: описание двух клинических случаев 83

Подписной индекс 81988
Объединенный каталог «Пресса России»

Журнал индексируется в системе
Российского индекса научного цитирования
(РИНЦ): www.elibrary.ru

© 2019 ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского
www.monikiweb.ru

ISSN 2072-0505 (print)
ISSN 2587-9294 (online)

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе
по надзору в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций.
Свидетельство ПИ № ФС77-34730 от 23.12.2008.

«Альманах клинической медицины» входит
в перечень рецензируемых научных изданий,
в которых должны быть опубликованы основные
научные результаты диссертаций на соискание
ученой степени кандидата наук, на соискание
ученой степени доктора наук (Перечень ВАК).
Шифр группы научных специальностей:
14.01.00 – клиническая медицина

Редакция не несет ответственности за содержа-
ние рекламных публикаций.

Полная или частичная перепечатка или размно-
жение каким-либо способом статей и иллюстра-
ций допускается только с письменного разреше-
ния редакции.

Адрес редакции:
129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2, корп. 8
Тел.: +7 (495) 688 32 41
E-mail: o_papara@monikiweb.ru
www.almclinmed.ru, www.monikiweb.ru/node/15

ALMANAC OF CLINICAL MEDICINE

The scientific and practical journal

Published since 1998

Founded and published by Moscow Regional
Research and Clinical Institute (MONIKI),
Moscow, Russian Federation

Publication frequency: 8 issues per year

Volume 47 • Number 1 • 2019

EDITOR-IN-CHIEF

Filipp N. Paleev, Corr. member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Prof., Deputy General Director on Scientific and Analytical Work, Federal State Budget Organization National Medical Research Center of Cardiology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Deputy Chief Editor

Anton V. Molochkov, MD, PhD, Prof., Deputy Director on Science and International Communications, MONIKI (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Ariel L. Barkan, MD, Professor of Medicine, Professor of Neurosurgery, Department of Medicine, Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes, Department of Neurosurgery, Co-director of Pituitary and Neurosurgery Center, University of Michigan (Ann Arbor, USA)

Elena A. Belousova, MD, PhD, Professor, Head of Department of Gastroenterology and Hepatology, Head of Chair of Gastroenterology, Postgraduate Training Faculty, MONIKI (Moscow, Russia)

Alexandr V. Bogachev-Prokophiev, MD, PhD, Head of Center of the New Surgical Technologies of NMRC named after E.N. Meshalkin (Novosibirsk, Russia)

Anatol J. Bragin, PhD, Epilepsy Center, Department of Neurology, University of California (Los Angeles, USA)

Yury A. Vasyuk, MD, PhD, Professor, Head of Chair of Clinical Functional Diagnostics, MSUMD (Moscow, Russia)

Elena Z. Golukhova, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Head of Department of Non-Invasive Arrhythmology, BSCCS (Moscow, Russia)

Mikhail M. Davydov, Corr. member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Head of Department of Thoracic Surgery, Research Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin RCRC (Moscow, Russia)

Larisa A. Dobrynina, MD, PhD, Head of the 3rd Department of Neurology, Research Center of Neurology (Moscow, Russia)

Oksana M. Drapkina, Corr. member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Director of NMRCPM (Moscow, Russia)

Mikhail Yu. Kirov, MD, PhD, Professor, Head of Chair of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, Northern State Medical University (Arkhangelsk, Russia)

Galina A. Mel'nichenko, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Director of Institut of Clinical Endocrinology, Endocrinology Research Center (Moscow, Russia)

Vladimir V. Neroev, Corr. member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Director of Helmholtz Research Institute of Eye Diseases (Moscow, Russia)

Alexey M. Ovezov, MD, PhD, Head of Department of Anaesthesiology, Head of Chair of Anaesthesiology and Reanimatology, Postgraduate Training Faculty, MONIKI (Moscow, Russia)

Gennadiy N. Ponomarenko, MD, PhD, Professor, General Director of Federal Research Center of Prosthetics and Rehabilitation of the Disabled named after G.A. Albrecht, Ministry of Labour and Social Protection (Saint Petersburg, Russia)

Yury S. Romanko, MD, PhD, Head of Scientific and Organizational Department of A. Tsyb Medical Radiological Research Centre (Obninsk, Kaluga Region, Russia)

Natalia M. Shakhova, MD, PhD, Leading Research Fellow, Biophotonics Laboratory, IAP RAS (Nizhny Novgorod, Russia)

Compiling Editor

Aliy Yu. Asanov, MD, PhD, Professor, Head of Chair of Medical Genetics, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Science Editor

Yuliya Yu. Kotalevskaya, MD, PhD, Head of the Consultative Department, Center for Medical Genetics, MONIKI (Moscow, Russia)

Natal'ya V. Oparina, Geneticist, Laboratory of Medical Genetics, MONIKI (Moscow, Russia)

Managing Editor

Olesya A. Parpara (Moscow, Russia)

Ekaterina I. Shishatskaya, Professor of Russ. Acad. Sci., ScD in Biology, PhD, Leading Research Fellow, Laboratory of Chemoautotrophic Biosynthesis, Biophysics Institute of the Siberian Branch of the RAS (Krasnoyarsk, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

Chair: **Nikolay R. Paleev**, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Prof., Head of Chair of Therapy, Postgraduate Training Faculty, MONIKI (Moscow, Russia)

Michael Buchfelder, MD, PhD, Professor, Head of Department of Neurosurgery, University Hospital Erlangen (Erlangen, Germany)

Bruce H.R. Wolffenbuttel, MD, PhD, Professor of Endocrinology and Metabolism, Head of Department of Endocrinology, University Medical Center Groningen (Groningen, Netherlands)

Andrea Giustina, MD, President of European Society of Endocrinology, Professor of Endocrinology, Vita-Salute San Raffaele University (Milan, Italy)

Stefan De Hert, MD, PhD, Chair of ESA Scientific Committee, Professor of Department of Anaesthesiology and Perioperative Medicine, Ghent University (Gent, Belgium)

Nikolay E. Kushlinskii, Corr. member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Head of Clinical Biochemistry Laboratory, N.N. Blokhin RCRC (Moscow, Russia)

Rustem I. Litvinov, MD, PhD, Professor, Senior Research Investigator, Department of Cell and Developmental Biology, School of Medicine, University of Pennsylvania (Philadelphia, USA)

Yurii V. Lobzin, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Director of Scientific and Clinical Center of Children's Infections (Saint Petersburg, Russia)

Johannes Mayr, MD, Professor of Pediatric Surgery, Department of Pediatric Surgery, University Children's Hospital Basel (Basel, Switzerland)

Dafin F. Muresanu, MD, PhD, MBA, FANA, Professor, Chairman of the Neurosciences Department, Faculty of Medicine, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca (Cluj-Napoca, Romania)

Oleg B. Naimark, ScD in Phys.-Math., Professor, Head of Laboratory of Physical Foundation of Strength, Institute of Continuous Media Mechanics of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Perm, Russia)

Walter W. Reinisch, MD, Professor, Division of Gastroenterology, Department of Medicine, MacMaster University (Hamilton, Canada)

Chi Yang, DDS, PhD, Professor, Head of Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University (Shanghai, PRC)

TOPIC OF THE ISSUE:
CLINICAL GENETICS.
ORPHAN DISEASES

Almanac of Clinical Medicine.
2019; 47 (1)

Content

Invited Article

C.M. Proding, M. Laimer, J. Bauer, H. Hintner

**Epidermolysis bullosa House Austria as a role model
for the care of a rare disease** 2

Review Article

M.V. Kibanov, G.M. Makhmudova, Ya.A. Gokhberg

**In search for an ideal marker of endometrial receptivity:
from histology to comprehensive molecular
genetics-based approaches** 12

Articles

*S.A. Repina, S.A. Krasovskiy, G.V. Shmarina, M.I. Shtaut,
E.K. Zhekayte, A.Yu. Voronkova, V.D. Sherman,
E.I. Kondratyeva, V.B. Chernykh*

**Reproductive system status and the algorithm to solve
fertility issues in men with cystic fibrosis** 26

*N.V. Petrova, A.Yu. Marakhonov, T.A. Vasilyeva,
N.Yu. Kashirskaya, E.I. Kondratyeva, E.K. Zhekayte,
A.Yu. Voronkova, V.D. Sherman, V.A. Galkina, E.K. Ginter,
S.I. Kutsev, R.A. Zinchenko*

**Characteristics of the mutation spectrum identified by
comprehensive investigation of the CFTR gene in the
Russian patients** 38

*E.A. Braga, I.V. Pronina, D.O. Utkin, E.A. Filippova,
A.M. Burdennyy, V.I. Loginov, M.V. Fridman,
T.P. Kazubskaya, N.E. Kushlinskii*

**Hypermethylation of the microRNA miR-124,
miR-125b, miR-127, and miR-129 in ovarian
carcinoma is involved in suppression of their
expression and associated with both the development
and progression of ovarian cancer** 47

*G.P. Snigireva, V.A. Rumyantseva, E.I. Novikova,
N.N. Novitskaya, E.N. Telysheva, E.D. Khazins,
E.G. Shaikhaev*

**Algorithm of molecular genetic investigation to identify
hereditary BRCA-associated breast cancer** 54

M.V. Golubenko, V.S. Mikhaylov, E.V. Zaklyazminskaya

**The study on the modifying role of mitochondrial
DNA polymorphism in the Brugada syndrome
manifestation** 66

*L.I. Minaycheva, E.Yu. Bragina, I.Zh. Zhalsanova,
N.A. Chesnokova, A.V. Marusin*

**Association of celiac disease genetic markers with
reproduction disorders** 72

Clinical Cases

Yu.Yu. Kotalevskaya, N.M. Marycheva

**Challenges of the differential diagnosis between the
subtypes of the junctional epidermolysis bullosa:
presentation of two clinical cases** 83

Subscription index 81988
in the united Pressa Rossii catalogue

The journal is indexed by Russian Index of Scientific
Citation (RISC): www.elibrary.ru

© 2019 MONIKI
www.monikiweb.ru

ISSN 2072-0505 (print)
ISSN 2587-9294 (online)

The journal is registered by Federal Service for
Supervision in the Sphere of Telecom, Information
Technologies and Mass Communications. Registra-
tion certificate ПИ № ФС77-34730 was issued on
December 23, 2008.

Since 2001 the Almanac of Clinical Medicine is
included in the List of leading referred journals, re-
commended by VAK (Higher Attestation Committee)
for publication of scientific results of dissertations for
the degrees of doctors and candidates of sciences.

Editorial board and the editors are not responsible
for claims made in the advertisements published in
the journal.

All articles published in this journal are protected by
copyright, which covers the exclusive rights to repro-
duce and distribute the article. No material published
in this journal may be reproduced photographically
or stored on microfilm, in electronic data base, on
video discs, etc., without first obtaining written
permission from the publisher (respective of the
copyright owner if other than MONIKI).

Editorial Office
Almanac of Clinical Medicine, MONIKI,
61/2-8 Shchepkina ul., Moscow, 129110,
Russian Federation. Tel.: +7 (495) 688 32 41
E-mail: o_parpara@monikiweb.ru
www.almclinmed.ru



Online first: электронная версия раньше печатной

Журнал «Альманах клинической медицины» теперь публикует препринты статей

✓ быстрая публикация

Редакция журнала «Альманах клинической медицины» рада сообщить о том, что теперь мы публикуем электронные версии статей, принятых к печати, до выхода печатной версии номера.

✓ можно цитировать

Статью, публикуемую в разделе «Принято в печать», следует цитировать с использованием уникального номера статьи – DOI, единого для электронной и печатной версий.

✓ полноценная публикация

Все статьи, размещаемые в электронном виде в разделе «Принято в печать», прошли полноформатную процедуру рецензирования, отбора, редакционной обработки. Версию, размещаемую в разделе «Принято в печать», следует считать окончательным вариантом статьи, на нее можно ссылаться как на состоявшуюся публикацию.

✓ препринт → печатная версия

После формирования выпуска статьи перемещаются из раздела «Принято в печать» в раздел «Последний выпуск» и публикуются в печатной версии журнала «Альманах клинической медицины».



Приглашенная статья

Австрийский центр буллезного эпидермолиза (Epidermolysis bullosa House Austria) как модель организации помощи при редком заболевании

Продингер К.М.¹ • Лаймер М.¹ • Бауэр Й.¹ • Хинтнер Х.¹

Австрийский центр буллезного эпидермолиза (EB House Austria) в Зальцбурге с самого своего основания в 2005 г. представляет собой исключительный пример организации оптимизированной медицинской помощи группе больных, которым до этого не уделялось должного внимания, – пациентам, страдающим буллезным эпидермолизом, редким и очень тяжелым заболеванием кожи. Пациенты с этим наследственным механобуллезным кожным заболеванием, характеризующимся гетерогенностью клинического течения, мультиорганными проявлениями, большим числом осложнений и высокой смертностью, получают в Австрийском центре буллезного эпидермолиза мультидисциплинарную медицинскую, психосоциальную, ориентированную на семью поддержку, наилучшим образом адаптированную именно к этому заболеванию и индивидуально подобранную для каждого больного. Центр состоит из четырех подразделений: амбулаторного звена, научно-исследовательской лаборатории,

академии и отдела научно-клинических исследований и клинических испытаний. Уникальная структура центра заложила основу для наилучшей медицинской практики и оказания медицинской помощи на самом современном уровне, а также для проведения качественных, ориентированных на больного научных исследований и развития трансляционной медицины. Австрийский центр буллезного эпидермолиза был создан при участии благотворительной пациентской организации «DEBRA Австрия», поддерживающей медицинские исследования, с целью оказания всесторонней помощи больным буллезным эпидермолизом и их близким в Австрии и сопредельных государствах. Получено официальное признание сначала на национальном уровне – в 2017 г. учреждению присвоен статус Национального экспертного центра по генодерматозам с фокусом внимания на буллезном эпидермолизе, а вскоре и на европейском – в сентябре 2018 г. центр был включен в Европейскую

референсную сеть (ERN) по редким заболеваниям кожи. Представленный в статье опыт Австрийского центра буллезного эпидермолиза может послужить примером успешной модели при организации помощи пациентам с другими полисистемными заболеваниями.

Ключевые слова: буллезный эпидермолиз, редкие заболевания, генодерматозы, DEBRA, междисциплинарный подход

Для цитирования: Продингер КМ, Лаймер М, Бауэр Й, Хинтнер Х. Австрийский центр буллезного эпидермолиза (Epidermolysis bullosa House Austria) как модель организации помощи при редком заболевании. Альманах клинической медицины. 2019;47(1):2–11. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-008.

Получена 30.01.2019; принята к публикации 04.02.2019; опубликована 22.02.2019

Буллезный эпидермолиз (БЭ) – группа редких наследственных механобуллезных заболеваний, для которых характерна повышенная ранимость кожи и слизистых оболочек с образованием пузырей при минимальном механическом повреждении. Многообразие клинических, генетических характеристик БЭ и его внекожных проявлений позволяет отнести БЭ к полисистемным заболеваниям с большим числом осложнений и высокой смертностью [1].

Генетическая гетерогенность БЭ обусловлена мутациями в 20 разных генах, кодирующих белки, отвечающие за поддержание целостности эпидермиса и обеспечивающие связь между эпидермисом и дермой. В зависимости от глубины поражения выделяют следующие основные типы БЭ: простой БЭ (пузыри расположены внутриэпидермально), пограничный БЭ (пузыри образуются в светлой пластинке зоны базальной мембраны),

дистрофический БЭ (пузыри локализуются под плотной пластинкой базальной мембраны), синдром Киндлера (смешанное поражение на разных уровнях кожи). В зависимости от генетических и фенотипических особенностей эти основные формы подразделяются на 30 подтипов (рис. 1) [2].

Симптомы болезни и их выраженность сильно варьируют. У некоторых пациентов заболевание дебютирует в подростковом возрасте, когда на часто травмируемых участках кожи (стопы, кисти) появляются и самостоятельно разрешаются единичные пузыри. У других больных пузыри образуются на коже и слизистых оболочках спонтанно уже при рождении, при этом поражение носит обширный, генерализованный характер и может довольно быстро привести к летальному исходу. Часто, особенно при дерматолитических подтипах, развиваются такие вторичные осложнения, как хроническое изъязвление, воспаление, рубцевание

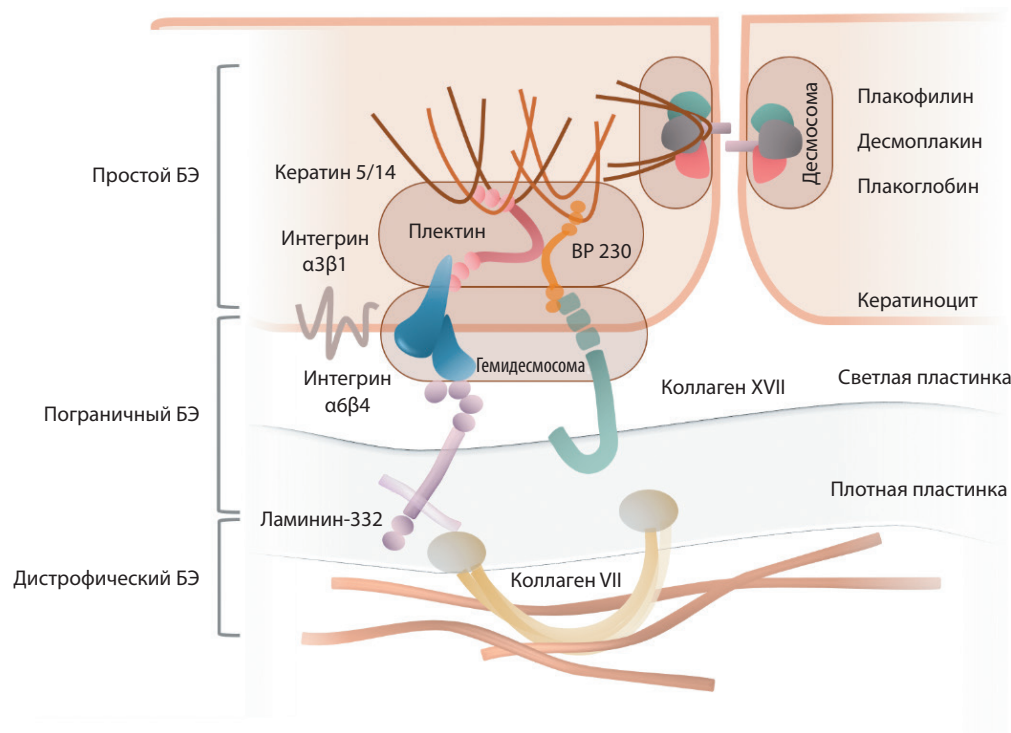


Рис. 1. Схема зоны дермоэпидермального соединения. В основе буллезного эпидермолиза (БЭ) лежат мутации генов структурных компонентов, в частности гемидесмосом, десмосом, промежуточных филаментов, актиновых микрофиламентов, фокальных контактов и транспорта внутриклеточных пузырьков

и фиброз кожи. А серьезные внекожные осложнения – стриктуры, стенозы и псевдосиндактилии – резко ухудшают качество жизни пациентов. При тяжелых формах БЭ (тяжелый генерализованный пограничный БЭ, рецессивный дистрофический БЭ) крайне высок риск (раннего) летального исхода вследствие недостаточности питания, отсутствия прибавки веса, инфекций, органной недостаточности, а позднее – агрессивно протекающего плоскоклеточного рака кожи (рис. 2) [3–5].

Характерными симптомами, обнаруживаемыми у некоторых больных с БЭ разных типов, бывают так называемые буллезноэпидермолизные невусы, которые обычно имеют клинические (быстрый рост, неровные границы, разноцветное окрашивание) и дерматоскопические признаки атипичной или злокачественной меланоцитарной пролиферации. Они часто появляются на месте бывших пузырей. Хотя эти элементы состоят исключительно из меланоцитов и редко ассоциируются с развитием меланомы, клиническое динамическое наблюдение и гистологическое исследование наиболее подозрительных очагов являются обязательными (рис. 3) [2, 6, 7].

Специфического лечения БЭ не существует. В настоящее время терапия носит в основном

поддерживающий характер: это симптоматические мероприятия (лечение раневых поверхностей), контроль инфицирования ран, нутритивная поддержка, а также профилактика и лечение вторичных осложнений [3, 8]. Терапевтические



Рис. 2. Осложнения у больных с рецессивным типом дистрофического буллезного эпидермолиза: **А** – агрессивно протекающий плоскоклеточный рак кожи грудной клетки; **Б** – псевдосиндактилия; **В** – множественный кариес зубов, эрозии полости рта; **Г** – хронические раны и эрозии

Продингер Кристина Мария – д-р медицины, отделение дерматологии¹
✉ Отделение дерматологии, Земельные клиники Зальцбурга (SALK), Университетская клиника Медицинского университета им. Парацельса 48 Muellner Hauptstrasse, Salzburg 5020, Austria. Тел.: +43 (572) 552 46 01. E-mail: ch.prodinge@salz.at

Лаймер Мартин – д-р медицины, адъюнкт-профессор, отделение дерматологии¹

Бауэр Йоханн – д-р медицины, мастер делового администрирования, профессор, отделение дерматологии¹

Хинтнер Хельмут – д-р медицины, профессор, отделение дерматологии¹

¹ Университетская клиника Медицинского университета имени Парацельса в Зальцбурге; 5020, Зальцбург, Мюллер Хауптштрассе, 48, Австрия

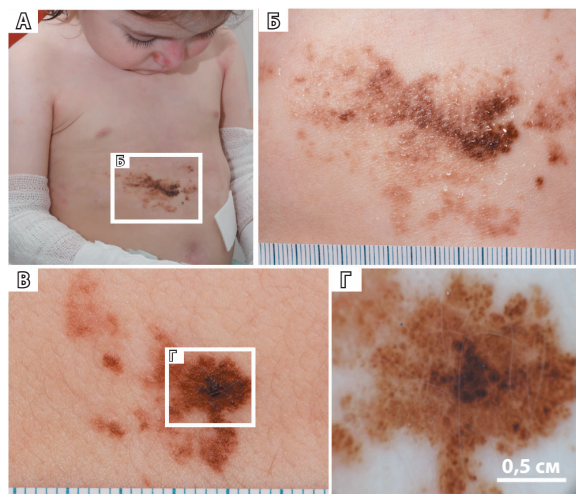


Рис. 3. Буллезноэпидермолизные (БЭ) невусы: **А** – БЭ невус у трехлетнего ребенка с дистрофическим БЭ; **Б** – увеличенный вид невуса с рисунка (А); **В** – БЭ невус у пациента с пограничным типом БЭ; **Г** – дерматоскопическое фото (В)

мероприятия и уход за пациентами с БЭ и другими редкими болезнями должны подбираться индивидуально, с учетом многочисленных факторов: возраста, степени тяжести заболевания, осложнений, проблем и предпочтений пациента.

Диагностика

В случае образования пузырей на коже новорожденных и детей более старшего возраста дифференциальный диагноз проводится с длинным перечнем заболеваний инфекционного, травматического, аутоиммунного и гематологического генеза [9]. После их исключения в качестве первого этапа диагностики при клиническом подозрении на БЭ у новорожденного необходимо установить уровень расслоения кожи. Обычно это возможно с помощью биопсии свежего пузыря (как правило, он возникает уже вследствие травмы кожи при биопсии) с последующим рутинным патогистологическим исследованием (внутриэпидермальное или субэпидермальное расслоение), иммунофлюоресцентным антигенным картированием и/или трансмиссионной электронной микроскопией (в настоящее время она в большинстве случаев оказывается излишней) [10]. Иммунофлюоресцентное картирование антигенных детерминант в области дермоэпидермального соединения было внедрено в практику в 1980-х гг. в дерматологическом отделении г. Инсбрука. Эта новая методика пришла на смену электронной микроскопии, так как позволила быстро и просто ставить точный диагноз механобуллезных заболеваний. С ее помощью можно

определить уровень расслоения кожи и проводить дифференциальный диагноз между четырьмя главными типами БЭ [11, 12].

Относительное наличие белка затем можно визуализировать с помощью иммунофлюоресцентного окрашивания набором специфических (в большинстве своем моноклональных) антител к структурным белкам эпидермиса или к компонентам дермоэпидермального соединения. Кроме того, для выявления причинной мутации следует по возможности выполнить молекулярный анализ с анализом кандидатных генов, определенных при иммунофлюоресцентном картировании. Наконец, семейный анамнез пациента может указывать на тип наследования, что имеет значение для последующей пренатальной и преимплантационной диагностики [5, 9, 13, 14].

«DEBRA Австрия»

В 1992 г. профессор Хельмут Хинтнер, накопивший за время работы в Инсбруке и за рубежом значительный опыт изучения кожных буллезных заболеваний и ведения пациентов с аутоиммунными и наследственными буллезными болезнями, был назначен руководителем отделения дерматологии больницы общего профиля в Зальцбурге. Вместе с биологом Габриэлой Пола-Губо он создал в Зальцбурге научную лабораторию, главным образом специализирующуюся в области иммунологии и буллезных заболеваний кожи.

Таким образом, с начала 1990-х гг. в Зальцбурге все большему количеству пациентов после нескольких лет диагностической неопределенности (это общее свойство редких болезней) стали устанавливать диагноз БЭ. В ходе регулярного динамического наблюдения таких пациентов вскоре стала очевидной необходимость организации их ведения и адекватной помощи. Тогда же в Зальцбурге родилась идея создать пациентскую группу по образцу «родительской ассоциации» DEBRA в Великобритании, функционирующей с 1978 г. В 1995 г. группа больных и членов их семей совместно с врачами и персоналом, осуществляющим уход за больными, основала благотворительную пациентскую организацию с целью обеспечения научно-медицинских исследований в области БЭ «DEBRA Австрия». Эта организация полностью посвятила себя всесторонней поддержке пациентов с БЭ и их родственников в Австрии и соседних странах. Назовем лишь некоторые виды деятельности: организация предоставляет площадку для обмена опытом, безвозмездно помогает решать юридические вопросы и бесплатно предоставляет перевязочный



материал, способствует оказанию более совершенной и эффективной медицинской помощи, создавая сеть соответствующих специалистов и участвуя в образовательных мероприятиях.

«DEBRA Австрия» известна своими многочисленными инициативами, привлечением денежных средств и информационными кампаниями. Со своей стороны опытные врачи, ученые и средний/младший медицинский персонал отделения дерматологии Зальцбурга сформировали мультидисциплинарную команду, основной задачей которой стала централизация и индивидуализация весьма непростого процесса лечения больных БЭ. Как только удалось собрать достаточно средств (при финансовой поддержке частных благотворителей, отчасти – из общедоступных источников), была создана первая в мире специализированная клиника БЭ. К огромной радости пациентов, родственников и специалистов по уходу за больными она открылась в 2005 г. на базе больницы общего профиля в г. Зальцбурге и представляет собой мультидисциплинарное клиническое отделение, занимающееся диагностикой, оказанием медицинской помощи, научными исследованиями и образовательными вопросами, связанными с БЭ [15].

Некоммерческая организация «DEBRA Австрия» с первого дня своего существования поддерживала и продолжает финансировать научные исследования в области БЭ в Австрии исключительно из благотворительных пожертвований. Ряд таких фундаментальных исследований, посвященных методам лечения БЭ, уже достигли фазы клинических испытаний. Это колоссальный успех, поскольку переход от стадии разработки к практическому применению в качестве методики лечения – долгий, сложный и трудоемкий процесс. Он требует глубоких знаний (регистрация, патенты, определение в группу орфанных препаратов), тесного сотрудничества с учеными и фарминдустрией, объемного финансирования и организации проведения доклинических и клинических испытаний (www.debra-austria.org).

В настоящее время благодаря быстрому накоплению знаний в области биологии и генетики и новым технологическим возможностям научные исследования в области БЭ проводятся разными группами ученых и варьируют от белково-клеточной терапии до трансплантации костного мозга и генной терапии. Для координации и централизации большого массива новых данных, получаемых в ходе этой работы, на национальном и международном уровне «DEBRA Великобритания» и «DEBRA Интернейшнл» создан Научный медицинский консультативный

совет (MSAP), в состав которого входят эксперты по БЭ и биологическим исследованиям. Заявки на научно-исследовательские гранты проходят централизованную процедуру экспертного отбора и при одобрении получают финансирование [16].

Австрийский центр буллезного эпидермолиза

Австрийский центр БЭ – выдающийся пример экспертного центра Европейского союза (ЕС). Центр оказывает мультидисциплинарную поддержку больным БЭ и их семьям, соблюдая принципы качественной медицинской практики и придерживаясь современных подходов к предоставлению медицинской помощи (www.eb-haus.eu) [16]. На наш взгляд, история развития центра может послужить образцовой моделью организации помощи при других редких мультисистемных заболеваниях.

В последнее десятилетие ЕС уделяет большое внимание совместным действиям на национальных и международном уровнях по ведению пациентов с редкими болезнями. Как правило, организация помощи таким пациентам сопряжена со следующими проблемами: большая гетерогенность, ограниченное число пациентов, недостаточный уровень знаний и опыта, а также огромные затраты. Несмотря на редкость каждого из этих заболеваний в отдельности, суммарное число страдающих ими пациентов велико, о чем говорит наличие более 500 одних только редких кожных заболеваний [17]. В связи с этим Экспертный комитет ЕС по редким болезням (EU Committee of Experts on Rare Disease – EUCERD) принял общую для всего сообщества стратегию поддержки стран-членов по интеграции национальных мероприятий и инициатив во всеобъемлющие междисциплинарные национальные планы, например, посредством создания референсных центров (РЦ) или кластеров РЦ на национальном уровне, а также транснациональных европейских референсных сетей (ERN) по редким болезням. Поскольку считается, что РЦ являются экспертной структурой наивысшего качества, они должны обеспечить равный во всем ЕС доступ пациентов с редкими заболеваниями к эффективной профилактике, диагностике, лечению, уходу и участию в научных исследованиях [18–21].

Австрийский центр буллезного эпидермолиза стал РЦ по генодерматозам и особенно БЭ в рамках Австрийского национального плана мероприятий по редким болезням (NAP.se).



Рис. 4. Организационная структура Австрийского центра буллезного эпидермолиза включает четыре тесно сотрудничающих друг с другом подразделения. Для всех подразделений наиважнейшим является взаимодействие с пациентами

В сентябре 2018 г. он также вошел в состав ERN по редким кожным болезням. Центр, расположенный в самом центре Европы, придерживается принципов равенства, солидарности и универсальности. Это означает, что воспользоваться всем спектром его услуг могут пациенты из всех стран-членов ЕС (Директива по трансграничному оказанию медицинской помощи [22]) и всего мира. Базовые принципы работы центра включают консультации специалистов в соответствии с международными стандартами, соблюдение практических клинических рекомендаций, использование параметров, характеризующих исход, независимый контроль и аудит качества, а также мультидисциплинарный подход к оказанию помощи. Постоянный контроль качества работы обеспечивается, в частности, путем документирования знаний через клинические рекомендации, стандартные операционные процедуры, руководства и т.д., а также постановку целей и непрерывную оценку их достижения – все это позволяет добиваться устойчивого улучшения качества помощи [23].

Важнейшим компонентом успеха Австрийского центра буллезного эпидермолиза послужила его уникальная структура, включающая функционирование трех разных, но тесно взаимодействующих друг с другом подразделений. Четвертое подразделение – центр клинических научных исследований и клинических испытаний – добавился к ним в 2017 г. (рис. 4).

Амбулаторное подразделение буллезного эпидермолиза (руководитель – д-р мед. Аня Дайм) Самый современный уровень медицинской помощи в амбулаторном подразделении БЭ обеспечивает специально обученный и подготовленный медицинский персонал: два врача-специалиста по БЭ, две специализированные медицинские сестры и 15 экспертов в области БЭ практически всех медицинских специальностей (к ним обращаются главным образом по необходимости). Пациенты могут посещать центр планово, приходить по вызову и на консилиумы. Кроме того, круглосуточно доступны телемедицинская дерматологическая помощь, возможность вызова медицинского персонала и получения неотложной помощи. Наивысший приоритет имеет мультидисциплинарный подход к ведению пациентов в одном центре. Его осуществляют на основе внедрения рекомендаций и решений, принятых в ходе дискуссии экспертов за «круглым столом» (Совет по редким болезням), а также оказывая удобную индивидуализированную помощь амбулаторным больным. Все необходимые обследования выполняются за один день и без лишних временных затрат, при необходимости все хирургические вмешательства проводятся одномоментно. В качестве одного из основных принципов используется непрерывный внутренний аудит качества, дающий больным возможность участвовать в новейших клинических исследованиях орфанных препаратов. Накопленный специалистами опыт и знания постоянно подвергаются критическому анализу, обновляются и публикуются. Например, в 2009 г. Джо Дэвид Файн и Хельмут Хинтнер обобщили свой опыт, всю имеющуюся информацию и практические рекомендации по лечению данного заболевания в книге «Жизнь с буллезным эпидермолизом: этиология, диагностика, мультидисциплинарное ведение и лечение». Книга основана на доказательных данных, полученных на крупных когортах больных из Австрии, и данных Американского регистра БЭ [1]. Другой подробнейший обновленный обзор локального опыта ведения БЭ недавно был опубликован онлайн на нескольких языках в сотрудничестве с международными партнерами (www.eb-handbuch.org).

Научно-исследовательская лаборатория буллезного эпидермолиза (руководитель – д-р наук Юлия Райхельт)

Сегодня штат научно-исследовательской лаборатории БЭ насчитывает без малого



30 ученых-специалистов в области молекулярной биологии, иммунологии и биологии рака. В структуре лаборатории несколько тесно взаимодействующих научных групп, интересы которых сегодня сконцентрированы на вопросах молекулярной диагностики, фундаментальных исследованиях (например, канцерогенез при БЭ), разработке и усовершенствовании терапевтических подходов. Конечная цель усилий коллектива – разработка молекулярных методов радикального лечения БЭ. На научную атмосферу лаборатории особым образом влияет возможность контактировать с пациентами и взаимодействовать с медицинским персоналом, их наблюдающим в клинических подразделениях центра БЭ. Сотрудничество с несколькими международными лабораториями дополняет опыт специалистов, способствует обмену биотехнологическими «ноу-хау», общедоступности основных инфраструктурных подразделений, а также получению финансирования на конкурентной основе.

Среди наиболее важных партнеров центра следует назвать проф. Микеле Де Лука (Модена, Италия). В результате этого сотрудничества создана комбинированная *ex vivo* генная/клеточная терапия стволовыми клетками пограничного типа БЭ [24]. В частности, она была успешно применена у двух пациентов, страдающих пограничным БЭ и имеющих мутации в гене *LAMB3*. Им была проведена трансплантация графтов кожи, выращенных из генетически модифицированных (с использованием ретровирусного вектора) аутологичных культур эпидермиса, содержащих стволовые эпидермальные клетки. Тем самым ученым удалось показать, что локальная трансплантация трансгенных кожных графтов может способствовать образованию полностью дифференцированного функционирующего эпидермиса, длительно (динамическое наблюдение до 9 лет) сохраняющего механическую стабильность без образования пузырей у больных пограничным типом БЭ [25, 26].

В 2015 г. значение этого метода было продемонстрировано вновь: было выполнено несколько трансплантаций генетически модифицированных кожных графтов 7-летнему больному пограничным типом БЭ, который находился в ожоговом отделении г. Бохума (Германия). Пациенту удалось восстановить 80% эпидермиса, поражение которого поддерживалось тяжелой бактериальной инфекцией [27]. Через месяц после трансплантации у больного имелся устойчивый к механическому повреждению (стабильный

даже при сильном трении кожи) и гистологически полностью нормальный эпидермис. Последующий анализ *in vivo* (тип интеграции провируса, клональный трейсинг) подтвердил, что для полного восстановления и поддержания структурно и функционально нормального эпидермиса достаточно небольшого числа длительно живущих голоклонов (эпидермальных стволовых клеток), которые продуцируют полностью дифференцированные кератиноциты. До настоящего времени признаков отторжения трансплантата, образования антител, а также признаков канцерогенности или клоногенности у пациента не наблюдается.

Сейчас продолжают и другие проекты в рамках международного сотрудничества, например, исследования генной терапии рецессивно-дистрофического БЭ (HOLOGENE7, 2017) и пограничного БЭ (HOLOGENE17, 2018).

В качестве опыта плодотворного взаимодействия следует упомянуть работу с иммунологической группой факультета естественных наук Зальцбургского университета Париса Лодрона (руководитель группы – д-р наук Ирис Грац). В последние годы было установлено, что многие тяжелейшие симптомы БЭ обусловлены гиперреактивностью или нарушением регуляции иммунной системы, возникающими, вероятно, как результат хронического образования пузырей и состояния перманентного заживления ран. Целенаправленное воздействие на дисфункциональные звенья иммуногенеза и их регуляция ведут к клиническому улучшению, что было показано при нанесении крема Диацереин. Этот низкомолекулярный препарат, разработанный в Австрийском центре буллезного эпидермолиза, угнетает активность воспалительного интерлейкина-1 β , которая, как известно, существенно повышена в кератиноцитах пациентов с тяжелым генерализованным простым БЭ с аутосомно-доминантным типом наследования, вызванным мутациями генов *KRT5* или *KRT14*, кодирующих кератины [28]. Диацереин – препарат, который используется у больных артритом как противовоспалительное средство. Он стал примером известного лекарства, которое получило новое показание к применению и стало орфанным для БЭ. В исследованиях I/II фазы крем Диацереин улучшал заживление ран при простом типе БЭ, подавляя клеточный воспалительный каскад. В настоящее время препарат проходит клиническое исследование II/III фазы для международной регистрации (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03472287) [29, 30].

Академия буллезного эпидермолиза
(руководитель – д-р наук Габриэла Пола-Губо)
Главная задача академии БЭ – обеспечивать непрерывное мультидисциплинарное образование и обучение людей, не имеющих отношения к медицине, а также профессионалов-клиницистов и ученых из Австрии и других стран мира. Она тесно сотрудничает с национальными и международными организациями по редким болезням (например, EURODIS, ORPHANET, «Буллезный эпидермолиз без границ») в вопросах сбора и передачи информации и знаний в этой специфической области. Академия отвечает также за связи с общественностью, сотрудничая с печатными и электронными средствами массовой информации, проводит обучающие курсы, конгрессы, приглашает в Австрию консультантов-экспертов и организует поездки австрийских экспертов, координирует проект EB-CLINET (Clinical Network of EB Centres and Experts – Клиническая сеть центров и экспертов в области БЭ). Эта сеть, объединяющая более 50 стран, была образована в 2011 г. для преодоления неравенства в доступе к медицинской помощи и устранения различий между заметно улучшившейся помощью при БЭ в некоторых странах и ограниченным доступом к ней (например, связанным с финансовыми проблемами, языковыми барьерами, необходимостью дорогостоящих поездок) во многих других странах. Предполагается, что этого можно достичь, если делиться компетенциями и знаниями на международном уровне, продвигать клиническое сотрудничество и облегчать пациентам разных стран доступ к участию в клинических исследованиях. Данная инициатива позволила сделать шаг вперед – начать глобальный регистр БЭ, куда вносятся минимальное количество сведений (включая информированное согласие пациента, персональный идентификационный номер пациента, название клинического центра или имя лечащего врача, диагноз в соответствии с действующей классификацией) [31], опубликованы клинические рекомендации по стандартизации медицинской помощи, внедрены и опубликованы справочники по экспертным центрам БЭ, созданы биобанки, разработаны инициативы по образованию и подготовке профессионалов, регулярно организуются международные конгрессы (последний из них – 4-я конференция EB-CLINET в Зальцбурге в 2017 г.) (www.eb-clinet.org).

Глобальный регистр БЭ представляет собой ключевой инструмент для будущих научных исследований, а также усовершенствования диагностики и терапии. В нем обобщаются данные,

которые позволяют сформировать выборку пациентов, достаточную для эпидемиологических и/или клинических исследований. Он помогает лучше понять течение БЭ, корреляцию сложных генотипов с фенотипами, определить прогностические маркеры, идентифицировать и описать гены и молекулярно-биохимические цепочки, вызывающие заболевание. Кроме того, регистр является базой для дородовой и преимплантационной диагностики, тестирования носительства, классификации и генетического консультирования, в ходе которого можно прогнозировать диагноз, определять прогноз и вычислять риски повторных случаев в семье.

Подразделение научных клинических исследований и центр клинических испытаний
(руководитель – адъюнкт-профессор Мартин Лаймер)

В 2016 г. было создано четвертое звено Центра – подразделение научных клинических исследований и центр клинических испытаний. Его задача – обеспечить высокий уровень сбора качественных данных с соблюдением наивысших этических и профессиональных стандартов в соответствии с принципами качественной клинической практики. Главная цель – обеспечение, координация и регуляция научной клинической работы в Австрийском центре буллезного эпидермолиза, включая оценку безопасности и эффективности исследуемых медицинских препаратов, предназначенных для диагностики и лечения БЭ. Экспериментальные медицинские препараты представляют собой главным образом либо впервые разработанные лекарственные субстанции-кандидаты, появившиеся в результате (собственных) междисциплинарных научных исследований, либо уже существующие на рынке лекарства или методы, которые не прошли лицензирование. Портфолио разработок включает проведение фундаментальных исследований, в том числе финансируемых фармацевтическими компаниями, а также участие в совместных многоцентровых научно-исследовательских программах. Оценка качества исследуемых лекарственных препаратов в рамках клинических исследований проводится по утвержденному и заранее составленному протоколу с соблюдением принципов качественной клинической и научной практики.

Гарантом успешной работы Австрийского центра буллезного эпидермолиза, его прочного и стабильного положения в настоящем, основой для решения задач в будущем служит тесное взаимодействие всех подразделений и внимательное



Рис. 5. Коллаж из фото генодерматозов, отобранных из более чем 500 описанных редких кожных заболеваний

отношение к потребностям пациента – принципы, заложенные концептуально на этапе создания центра.

Генодерматозы

Помимо больных БЭ, экспертный центр в Зальцбурге принимает пациентов с другими редкими болезнями кожи (генодерматозами), которые встречаются реже, чем 1 случай на 2000 человек. Среди них назовем нейрофиброматоз, ихтиоз, туберозный склероз и наследственный ангионевротический отек (рис. 5). Эти хронические, нередко прогрессирующие дегенеративные заболевания приводят к инвалидизации и потенциально угрожают жизни. Страдающие ими больные сталкиваются с поздней и неверной диагностикой, им трудно получить надлежащую медицинскую помощь, найти знающих и опытных специалистов, что в результате приводит к значительным прямым и косвенным затратам. Диагностика и лечение генодерматозов очень трудны, поскольку клинические проявления этих патологий гетерогенны и перекрываются симптомами других заболеваний, а знаний и опыта нередко не хватает. Вот почему централизация и координация мультидисциплинарной помощи

на основе рекомендаций и решений, принятых экспертами, как это происходит в Австрийском центре буллезного эпидермолиза (Совет по редким заболеваниям собирается ежемесячно), эффективно улучшает ведение таких пациентов и качество медицинской помощи, оказываемой больным, страдающим одним из более чем 500 редких кожных заболеваний.

Перспективы

История Австрийского центра буллезного эпидермолиза служит примером исключительного опыта создания оптимальной системы медицинской помощи (включая содействие в решении социальных и экономических вопросов) группе пациентов, которая ранее оставалась без должного внимания, а сейчас представляет собой влиятельную пациентскую организацию. Система помощи выстроена на взаимодействии между пациентской организацией и медицинским сообществом и базируется на тесном междисциплинарном и межпрофессиональном сотрудничестве. Выдающиеся результаты деятельности Австрийского центра буллезного эпидермолиза, о которых убедительно свидетельствует удовлетворенность пациентов и их окружения,



а также плоды ее научной работы, благодаря которым появились перспективные подходы к лечению, подтверждают, что ориентированность на потребности пациента – обязательное условие успеха. Подлинное вовлечение в эту деятельность больных крайне важно на каждом этапе

улучшения медицинской помощи при редких заболеваниях – начиная от научных исследований по разработке новых орфанных препаратов и их клинических испытаний и заканчивая постановкой диагноза и обеспечением лояльности пациентов. ☺

Дополнительная информация

Информированное согласие

Все пациенты или их законные представители дали письменное информированное согласие на опубликование фотографий.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Все авторы внесли равный вклад в работу над статьей, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Литература / References

1. Fine JD. Epidemiology of inherited epidermolysis bullosa. In: Fine JD, Hintner H, editors. *Life with Epidermolysis Bullosa (EB): Etiology, diagnosis, multidisciplinary care and therapy*. Wien, New York: Springer; 2008. p. 24–9.
2. Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Has C, Heagerty A, Hintner H, Hovnanian A, Jonkman MF, Leigh I, Marinkovich MP, Martinez AE, McGrath JA, Mellerio JE, Moss C, Murrell DF, Shimizu H, Uitto J, Woodley D, Zambruno G. Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(6):1103–26. doi: 10.1016/j.jaad.2014.01.903.
3. Fine JD, Mellerio JE. Extracutaneous manifestations and complications of inherited epidermolysis bullosa: part I. Epithelial associated tissues. *J Am Acad Dermatol*. 2009;61(3):367–84. doi: 10.1016/j.jaad.2009.03.052.
4. Fine JD, Mellerio JE. Extracutaneous manifestations and complications of inherited epidermolysis bullosa: part II. Other organs. *J Am Acad Dermatol*. 2009;61(3):387–402. doi: 10.1016/j.jaad.2009.03.053.
5. Murrell DA, editor. *Epidermolysis Bullosa: Part I – Pathogenesis and Clinical Features*. *Dermatol Clin*. 2010;28(1):1–196.
6. Lanschuetzer CM, Laimer M, Nischler E, Hintner H. Epidermolysis bullosa nevi. *Dermatol Clin*. 2010;28(1):179–83. doi: 10.1016/j.det.2009.10.024.
7. Bauer JW, Schaeppi H, Kaserer C, Hantich B, Hintner H. Large melanocytic nevi in hereditary epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44(4):577–84. doi: 10.1067/mjd.2001.112217.
8. Laimer M, Proding C, Bauer JW. Hereditary epidermolysis bullosa. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2015;13(11):1125–33. doi: 10.1111/ddg.12774.
9. Nischler E, Klaussegger A, Hüttner C, Pohla-Gubo G, Diem A, Bauer JW, Hintner H. Diagnostic pitfalls in newborns and babies with blisters and erosions. *Dermatol Res Pract*. 2009;2009:320403. doi: 10.1155/2009/320403.
10. Yiasemides E, Walton J, Marr P, Villanueva EV, Murrell DF. A comparative study between transmission electron microscopy and immunofluorescence mapping in the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Am J Dermatopathol*. 2006;28(5):387–94. doi: 10.1097/01.dad.0000211510.44865.6d.
11. Hintner H, Stingl G, Schuler G, Fritsch P, Stanley J, Katz S, Wolff K. Immunofluorescence mapping of antigenic determinants within the dermal-epidermal junction in the mechanobullous diseases. *J Invest Dermatol*. 1981;76(2):113–8. doi: 10.1111/1523-1747.ep12525447.
12. Hintner H, Wolff K. Generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol*. 1982;118(6):375–84. doi: 10.1001/archderm.1982.01650180009008.
13. Pohla-Gubo G, Kraus L, Hintner H. Role of immunofluorescence microscopy in dermatology. *G Ital Dermatol Venereol*. 2011;146(2):127–42.
14. Pohla-Gubo G, Cepeda-Valdes R, Hintner H. Immunofluorescence mapping for the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin*. 2010;28(2):201–10. vii. doi: 10.1016/j.det.2009.12.005.
15. Pohla-Gubo G, Hintner H. Epidermolysis bullosa care in Austria and the Epidermolysis Bullosa House Austria. *Dermatol Clin*. 2010;28(2):415–20. xv. doi: 10.1016/j.det.2010.02.008.
16. Laimer M, Pohla-Gubo G, Diem A, Proding C, Bauer JW, Hintner H. Epidermolysis bullosa House Austria and Epidermolysis bullosa clinical network: Example of a centre of expertise implemented in a European reference network to face the burden of a rare disease. *Wien Klin Wochenschr*. 2017;129(1–2):1–7. doi: 10.1007/s00508-016-1133-3.
17. Feramisco JD, Sadreyev RI, Murray ML, Grishin NV, Tsao H. Phenotypic and genotypic analyses of genetic skin disease through the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database. *J Invest Dermatol*. 2009;129(11):2628–36. doi: 10.1038/jid.2009.108.
18. EUCERD Recommendations on Quality Criteria for Centres of Expertise for Rare Diseases in Member States. October, 2011 [Accessed on 07/01/2019]. Available from: www.eucerd.eu.
19. EUCERD Recommendations on Rare Disease European Reference Networks (RD ERNs). January, 2013 [Accessed on 07/01/2019]. Available from: www.eucerd.eu.
20. EUCERD Recommendations on Core Indicators for Rare Disease National Plans/Strategies. June, 2013 [Accessed on 07/01/2019]. Available from: www.eucerd.eu.
21. EUROPLAN Recommendations for the Development of National Plans for Rare Diseases. Guidance Document [Accessed on 07/01/2019]. Available from: www.europlan-project.eu.
22. Directive on the application of patients' rights in cross-border healthcare (2011/24/EU) March 9, 2011 [Accessed on 19/01/2019]. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:088:0045:0065:EN:PDF>.
23. Laimer M, Proding C, Ahlgrimm-Siess V, Hintner H, Bauer JW. Austrian and European initiatives in the field of rare diseases perspectives for a "marginal group" of many millions of patients. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2015;13(3):261–4. doi: 10.1111/ddg.12604.
24. Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S, Di Nunzio F, Dilorio E, Recchia A, Maruggi G, Ferrari G, Provasi E, Bonini C, Capurro S, Conti A, Magnoni C, Giannetti A, De Luca M. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med*. 2006;12(12):1397–402. doi: 10.1038/nm1504.
25. Bauer JW, Koller J, Muraier EM, De Rosa L, Enzo E, Carulli S, Bondanza S, Recchia A, Muss W, Diem A, Mayr E, Schlager P, Gratz IK, Pellegrini G, De Luca M. Closure of a large chronic wound through transplantation of gene-corrected epidermal stem cells. *J Invest Dermatol*. 2017;137(3):778–81. doi: 10.1016/j.jid.2016.10.038.
26. Siprashvili Z, Nguyen NT, Gorell ES, Loutit K, Khuu P, Furukawa LK, Lorenz HP, Leung TH, Keene DR, Rieger KE, Khavari P, Lane AT,



- Tang JY, Marinkovich MP. Safety and wound outcomes following genetically corrected autologous epidermal grafts in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *JAMA*. 2016;316(17):1808–17. doi: 10.1001/jama.2016.15588.
27. Hirsch T, Rothoef T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, Scaglione D, Reichelt J, Klausegger A, Kneisz D, Romano O, Secone Seconetti A, Contin R, Enzo E, Jurman I, Carulli S, Jacobsen F, Luecke T, Lehnhardt M, Fischer M, Kueckelhaus M, Quaglino D, Morgante M, Bicciato S, Bondanza S, De Luca M. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature*. 2017;551(7680):327–32. doi: 10.1038/nature24487.
28. Wally V, Lettner T, Peking P, Peckl-Schmid D, Muraier EM, Hainzl S, Hintner H, Bauer JW. The pathogenetic role of IL-1 β in severe epidermolysis bullosa simplex. *J Invest Dermatol*. 2013;133(7):1901–3. doi: 10.1038/jid.2013.31.
29. Wally V, Kitzmueller S, Lagler F, Moder A, Hitzl W, Wolkersdorfer M, Hofbauer P, Felder TK, Dornauer M, Diem A, Eiler N, Bauer JW. Topical diacerein for epidermolysis bullosa: a randomized controlled pilot study. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:69. doi: 10.1186/1750-1172-8-69.
30. Wally V, Hovnanian A, Ly J, Buckova H, Brunner V, Lettner T, Ablinger M, Felder TK, Hofbauer P, Wolkersdorfer M, Lagler FB, Hitzl W, Laimmer M, Kitzmüller S, Diem A, Bauer JW. Diacerein orphan drug development for epidermolysis bullosa simplex: A phase 2/3 randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78(5):892–901.e7. doi: 10.1016/j.jaad.2018.01.019.
31. EUCERD Working document: Minimal Data Set for Rare Diseases Registries. January, 2015 [Accessed on 07/01/2019]. Available from: http://www.eucerd.eu/wp-content/uploads/2015/03/WP8_Registries_MDS.pdf.

Epidermolysis bullosa House Austria as a role model for the care of a rare disease

C.M. Proding¹ • M. Laimer¹ • J. Bauer¹ • H. Hintner¹

The evolution of the Epidermolysis bullosa (EB) House Austria in Salzburg has demonstrated from its beginning in 2005 in an exceptional way the establishment of an optimized health care for a hitherto neglected group of patients, suffering from a rare but devastating skin disease: Epidermolysis bullosa. Patients with this hereditary mechanobullos skin disease, characterized by a heterogenous clinical course, multisystemic manifestations and increased morbidity and mortality, find in the EB House Austria a multidisciplinary, medical and psychosocial, family-centered support, optimally customized to this condition and individualized to each patient. Its unique structure of four divisions (Outpatient Unit, Research Laboratory, Academy, Clinical Research and Study Center) has set the basis for the delivery of best medical practice and state-of-the-art care as well as the establishment/performance of high quality and patient centered research and translational medicine. Initially the (ongoing) close collaboration with the powerful patient group and medical research charity "DEBRA Austria" that is dedicated to a multidimensional support of EB patients and their relatives

living in Austria and neighboring countries, has enabled the construction of the EB House Austria. The acknowledgement of this institution as a successful model has been officially obtained in 2017 by its designation as a national Center of Expertise for Genodermatoses with special focus on EB and its inclusion into the European Reference Network (ERN) for Rare Skin Disorders in September 2018. Therefore, the history of the EB house is worth reviewing since it can be regarded as a role model for the care of other rare and multisystemic diseases.

Key words: epidermolysis bullosa, rare disease, genodermatoses, DEBRA, multidisciplinary support

For citation: Proding CM, Laimer M, Bauer J, Hintner H. Epidermolysis bullosa House Austria as a role model for the care of a rare disease. *Almanac of Clinical Medicine*. 2019;47(1):2–11. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-008.

Received 30 January 2019; accepted 4 February 2019; published 22 February 2019

Christine Maria Proding – MD, Department of Dermatology¹

✉ Department of Dermatology, Salzburger Landeskliniken (SALK), University Hospital of the Paracelsus Medical University; 48 Muellner Hauptstrasse, Salzburg 5020, Austria. Tel.: +43 (572) 552 46 01. E-mail: ch.proding@salk.at

Martin Laimer – MD, Associate Professor, Department of Dermatology¹

Johann Bauer – MD, MBA, Professor, Department of Dermatology¹

Helmut Hintner – MD, Professor, Department of Dermatology¹

Informed consent statement

All patients have given informed, written consent for publication of images.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author contributions

All authors have contributed equally to the paper. All authors have read and approved the final manuscript.

¹ University Hospital of the Paracelsus Medical University of Salzburg; 48 Muellner Hauptstrasse, Salzburg, 5020, Austria



Обзор

Поиск идеального маркера для оценки рецептивности эндометрия: от гистологии до современных молекулярно-генетических подходов

Кибанов М.В.¹ • Махмудова Г.М.¹ • Гохберг Я.А.¹

Актуальность. Несмотря на значительный рост эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), наблюдаемый за последние 10 лет, доля безрезультатных циклов по-прежнему остается существенной и может достигать 40%. Нарушение имплантации эмбриона рассматривается как одна из возможных причин, ограничивающих результативность программ ВРТ. Отсутствие имплантации может быть связано со смещением периода «имплантационного окна» – времени, когда эндометрий обладает максимальной рецептивностью и готов к интеграции эмбриона. Для определения рецептивности эндометрия разработаны и используются различные методы. Однако точность и эффективность существующих подходов существенно разнятся. **Цель** – обзор методов, используемых для исследования рецептивности эндометрия и определения периода «имплантационного окна», а также оценка их эффективности. **Методы.** Проведен поиск источников (сентябрь 2018 г.) в базах

данных PubMed и E-library по ключевым словам: “endometrial receptivity” / «рецептивность эндометрия», “endometrial receptivity evaluation” / «определение рецептивности эндометрия», “implantation window” / «имплантационное окно», “window of implantation” / «окно имплантации», “pinopodes” / «пиноподии». Для анализа отобраны 134 публикации, в том числе 101 оригинальная исследовательская работа и 33 обзора литературы. **Результаты.** Рассмотрены методы классического гистологического анализа, сканирующей электронной микроскопии, иммуногистохимии, а также подходы, основанные на определении уровня простагландин в эндометриальной жидкости и анализе профиля матричных РНК в образце ткани эндометрия, с целью определения рецептивности эндометрия. Обсужден вопрос поиска идеального маркера для оценки рецептивного статуса эндометрия. **Заключение.** Сегодня наиболее эффективными и точными методами диагностики периода «имплантационного окна» представляются

подходы, основанные на изучении транскрипционного профиля образца ткани эндометрия. Анализ представленности матричных РНК позволяет не только точно диагностировать уровень рецептивности эндометрия на момент биопсии, но и достоверно предсказать возможное смещение периода «имплантационного окна» на более ранний или более поздний сроки.

Ключевые слова: рецептивность эндометрия, имплантационное окно, окно имплантации, пиноподии

Для цитирования: Кибанов МВ, Махмудова ГМ, Гохберг ЯА. Поиск идеального маркера для оценки рецептивности эндометрия: от гистологии до современных молекулярно-генетических подходов. Альманах клинической медицины. 2019;47(1):12–25. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-005.

Поступила 30.10.2018; принята к публикации 22.01.2019; опубликована 07.02.2019

Человек отличается крайне низкой эффективностью процессов и механизмов, ведущих к установлению прогрессирующей беременности. Частота безрезультативных циклов по причине нарушения имплантации, ранних потерь, невынашивания или самопроизвольных аборт существенно превышает количество успешных беременностей [1]. Возможные причины включают, но не ограничены таковыми, генетические дефекты в клетках развивающегося эмбриона, врожденные пороки развития матки, внутриматочные спайки, полипы, подслизистые фибромы, воспалительные процессы в эндометрии [2, 3]. Современные стандарты лечения пациенток с бесплодием с помощью вспомогательных репродуктивных технологий

(ВРТ) предполагают проведение преимплантационного генетического тестирования эмбрионов на наличие хромосомных нарушений. С внедрением генетического скрининга эффективность программ ВРТ выросла до 60–70% [4–6], однако до сих пор доля циклов, в которых перенос эуплоидных эмбрионов не приводит к имплантации, остается значительной и может достигать 40% [7]. Нарушение механизмов имплантации в результате смещения периода «имплантационного окна» – времени, когда эндометрий максимально готов к интеграции эмбриона, – считается одной из наиболее вероятных причин.

Для успешной имплантации необходимо совпадение двух факторов: готовый к имплантации эмбрион и рецептивный эндометрий. Как



показали B.S. Shapiro и соавт., более низкая эффективность программ ВРТ при переносе эмбрионов в цикле стимуляции на 6-й день развития по сравнению с переносом на 5-й день, скорее, является результатом несоответствующего состояния эндометрия, нежели обусловлена особенностями со стороны эмбриона [8]. Более низкая результативность программ ВРТ при переносе эмбрионов с задержкой бластуляции также, по всей видимости, следствие десинхронизации развития эмбриона и эндометрия и не связана с качеством переносимого эмбриона [9]. Синхронизировать эти два параметра в рамках программ ВРТ позволяет витрификация эмбрионов и последующий перенос с учетом времени наступления периода «имплантационного окна» [10]. Время имплантации влияет и на вероятность последующего выкидыша/самопроизвольного аборта: установлена положительная корреляция между поздней имплантацией и возможностью выкидыша [11, 12]. Более высокая частота встречаемости случаев десинхронизации развития эмбриона и эндометрия показана с увеличением возраста матери при пороговом возрасте в 35 лет [13]. Все эти факты, наряду со снижением качества яйцеклеток и повышенной вероятностью хромосомных нарушений у эмбрионов женщин старшего репродуктивного возраста [14, 15], подчеркивают важность точного и достоверного определения периода «имплантационного окна» для успешного завершения программ ВРТ.

Целью настоящей работы был обзор научных публикаций по заявленной тематике с последующим сравнением эффективности методов, используемых для определения периода «имплантационного окна».

Методы

Проведен поиск источников (сентябрь 2018 г.), опубликованных в базах данных PubMed и E-library, по ключевым словам: “endometrial receptivity”/ «рецептивность эндометрия», “endometrial receptivity evaluation”/ «определение рецептивности эндометрия», “implantation window”/ «имплантационное окно», “window of implantation”/ «окно имплантации», “pinopodes”/ «пиноподии». Для обзора отбирались оригинальные исследовательские статьи, в которых использовался хотя бы один из описываемых методов (гистологический, иммуногистохимический, сканирующая электронная микроскопия, масс-спектрометрия и/или широкомасштабное профилирование матричных РНК (мРНК)) для анализа рецептивности эндометрия в группах здоровых фертильных женщин и/или пациенток с бесплодием без отягощенного

акушерско-гинекологического анамнеза (наличие воспалительных и прочих заболеваний эндометрия, оперативных вмешательств) и/или сопутствующих хронических системных заболеваний. Не рассматривались работы, в которых проводилось исследование влияния гормональных или других лекарственных препаратов на рецептивность эндометрия. По отдельным вопросам, которые выходят за рамки данной работы, приведены ссылки на соответствующие обзорные публикации. По заданным критериям поиска для обзора отобраны 134 публикации, из них 101 оригинальная исследовательская работа и 33 обзора литературы.

Обзор методов исследования рецептивности эндометрия

Процесс имплантации эмбриона – один из наиболее важных этапов в последовательности событий, ведущих к беременности. В результате имплантации устанавливается тесная связь между бластоцистой и эндометрием, что в конечном итоге приводит к формированию плаценты – структуры, за счет которой осуществляется метаболизм будущего плода [16]. В течение менструального цикла под влиянием стероидных гормонов эндометрий матки претерпевает циклические изменения, подвергаясь регенеративным, пролиферативным, секреторным и деструктивным (во время менструации) процессам. Созревание эндометрия достигает пика в середине лютеиновой фазы, на 6–10-й дни после овуляции. На этом этапе эндометрий характеризуется максимальной рецептивностью и готов к имплантации эмбриона. К этому моменту эндометрий претерпевает существенные изменения. На уровне морфологии клеток происходит образование пиноподий – куполообразных выпячиваний апикального конца цитоплазматической мембраны [17, 18]. Трансформация наблюдается и на молекулярном уровне. Меняется экспрессия различных регуляторных и структурных белков клеточной мембраны эпителиальных клеток эндометрия, растворимых регуляторных факторов, таких как простагландины и цитокины, транскрипционных факторов, факторов роста и др. [19–24]. На выявлении и сопоставлении картины происходящих изменений и основаны различные подходы дифференциальной диагностики состояния эндометрия. Выбор метода зависит от исследуемого параметра. Однако информативность и точность используемых подходов существенно разнятся.

В настоящее время существует пять основных методов, которые могут использоваться для оценки рецептивности эндометрия: гистологический,

Кибанов Михаил Викторович – канд. биол. наук, биолог, лаборатория репродуктивной генетики¹
✉ 111033, г. Москва, Волочаевская ул., 15/1, Российская Федерация.
Тел.: +7 (495) 234 42 42.
E-mail: mkibanov@gmail.com

Махмудова Гульнора Маратовна – д-р мед. наук, профессор, главный врач, заведующая Центром материнства и репродуктивных технологий¹

Гохберг Яэль Александровна – ординатор¹

¹ Клинический госпиталь на Яузе; 111033, г. Москва, Волочаевская ул., 15/1, Российская Федерация

электронная микроскопия, иммуногистохимическое окрашивание образцов, исследование простагландинов в эндометриальной жидкости с помощью масс-спектрометрии и изучение профиля мРНК в образце эндометрия.

Гистологический метод

В течение многих лет оценку состояния эндометрия и подбор терапии осуществляли на основании гистологического изучения образцов эндометрия пациенток с бесплодием. Еще в 1949 г. G.E. Jones выявила связь между бесплодием и измененной морфологической картиной препаратов образцов эндометрия [25]. Было замечено, что эндометрий пациенток с бесплодием отличается задержкой развития и/или недостаточной трансформацией функционального слоя. Авторы впервые предложили термин «недостаточность лютеиновой фазы» (НЛФ). С тех пор в течение долгого времени изучение гистологических образцов эндометрия оставалось золотым стандартом при обследовании пациенток с бесплодием и определении НЛФ [26–29]. Согласно принятым критериям, диагноз НЛФ ставится, если гистологическая картина образца не соответствует дню цикла, в который была проведена биопсия, и разница или задержка развития эндометрия составляют 2 дня и более. При этом в качестве стандартной точки отсчета обычно используется ожидаемый день начала менструации или момент овуляции, определяемый с помощью ультразвукового исследования или по пику лютеинизирующего гормона в плазме либо моче [29–31].

В годы активного использования гистологических исследований общепринятой была точка зрения, согласно которой, какой бы ни была природа недостаточной трансформации эндометрия – низкий уровень секреции прогестерона или патология на уровне эндометрия как такового – диагноз НЛФ является достаточным критерием для определения смещенного периода «имплантационного окна». Однако исследование гистологических препаратов с помощью светового микроскопа не отражает всей сложности и многообразия процессов, которые могут приводить к нарушению рецептивности эндометрия. Без внимания остаются возможные нарушения на молекулярном уровне: патология со стороны стероидных рецепторов, структурных белков, факторов роста, цитокинов, простагландинов и т.д. [20, 22, 32]. Клинические исследования показали, что результаты гистологического анализа не могут быть критерием для корректной оценки рецептивности эндометрия и определения смещения «имплантационного

окна». Несоответствие гистологической картины дню биопсии в диапазоне от 5 до 50% было обнаружено у здоровых, фертильных, с регулярным циклом женщин. Кроме того, была установлена плохая сходимость результатов для конкретной пациентки между циклами и наблюдался высокий уровень вариации оценки гистологической картины при изучении образцов различными исследователями [30, 33, 34]. В работе С. Coutifaris и соавт. частота встречаемости НЛФ была выше в группе фертильных женщин (49%) по сравнению с группой пациенток с бесплодием (43%) [31]. Смещение времени биопсии на позднюю лютеиновую фазу также не позволяло достоверно дискриминировать между здоровыми женщинами и пациентками с бесплодием.

Таким образом, гистологическое изучение образцов эндометрия не обладает необходимым уровнем специфичности и достоверности результатов для определения возможного смещения «имплантационного окна» или принятия решения о назначении терапии пациенткам с бесплодием. В настоящее время Американское общество репродуктивной медицины (American Society for Reproductive Medicine – ASRM) рекомендует не рассматривать НЛФ как самостоятельную нозологию, выступающую в качестве причины бесплодия. Считается, что НЛФ – следствие или один из симптомов патологических состояний, связанных с низким уровнем образования прогестерона (сбой работы гипоталамо-гипофизарной системы, нарушенная функция щитовидной железы, гиперпролактинемия и др.) [35]. Необходимо отметить, что описаны примеры нормально развитого эндометрия согласно результатам гистологии, но в сочетании с дефектом молекулярных маркеров [36–38].

Электронная микроскопия

В отличие от микроскопии в проходящем свете сканирующая электронная микроскопия позволяет детально исследовать особенности изменения морфологической организации клеток эндометрия в течение цикла. Наиболее выразительный феномен, детектируемый в середине лютеиновой (секреторной) фазы цикла, – образование пиноподий. Пиноподии представляют собой грибовидные или куполовидные выпячивания цитоплазматической мембраны апикального конца секреторных клеток поверхностного эпителия эндометрия [17, 39–41]. Размер пиноподий может достигать 6 мкм в диаметре [18, 42–45]. Они обнаружены у крысы, мыши и человека, однако между пиноподиями человека и грызунов существуют



значительные различия в плане размера, морфологии и внутренней организации [43]. Так, пиноподии крысы и мыши больше напоминают грибоподобные структуры, вынесенные над поверхностью клеток эндометрия за счет цитоплазматической «ножки». Они не содержат органелл и заполнены одной или двумя крупными вакуолями [44, 46–50]. Пиноподии человека, напротив, богаты различными органеллами, в том числе содержат митохондрии, аппарат Гольджи, шероховатый эндоплазматический ретикулум и различные секреторные гранулы. По морфологии пиноподии человека более напоминают куполообразные выпячивания, образующиеся за счет всей площади апикальной поверхности клетки [51–53]. Динамика появления пиноподий человека и их морфология зависят от стадии лютеиновой фазы менструального цикла. Выделяют «развивающиеся», «зрелые» и «регрессирующие» пиноподии. У развивающихся пиноподий (начало лютеиновой фазы) куполообразное выпячивание только начинает образовываться, и на их поверхности еще сохраняются небольшие микроворсинки, характерные для секреторных клеток. Поверхность зрелых пиноподий (середина лютеиновой фазы) гладкая, а выпячивание апикальной мембраны достигает максимума. Объем регрессирующих пиноподий (поздняя лютеиновая фаза) начинает снижаться, на поверхности появляются складки из цитоплазматической мембраны и вновь становятся заметными микроворсинки [17, 54, 55]. Различают несколько степеней относительного количества пиноподий в зависимости от доли трансформированных секреторных клеток в образце: «0» – полное отсутствие; «1» – незначительное количество (пиноподии покрывают менее 25% площади поверхности); «2» – умеренное количество (пиноподии занимают 25–50% площади поверхности); «3» – множество (более 50% площади поверхности образца занято пиноподиями) [56].

Функциональная роль пиноподий до конца не известна. Предполагают, что бластоциста связывается с пиноподиями во время имплантации, а выпуклая поверхность эпителиальных клеток без микроворсинок увеличивает площадь взаимодействия, повышая эффективность процесса [52]. Образцы эндометрия здоровых фертильных женщин, полученные в середине лютеиновой фазы, характеризуются наличием множества зрелых пиноподий [57, 58]. В исследованиях *in vitro* было показано, что бластоцисты человека взаимодействуют с участками эпителия эндометрия, покрытыми пиноподиями [52], а зрелость и количество пиноподий коррелируют с успешной имплантацией

эмбрионов [54, 59–61]. В то же время установлена возможность прикрепления бластоцист к участкам эндометрия без пиноподий или участкам с их незначительным количеством (< 25%) [62], что ставит под сомнение необходимость наличия пиноподий для имплантации.

Другой возможной функцией пиноподий у грызунов считается «поглощение» эндометриальной жидкости за счет пиноцитоза [44, 49, 63]. Активный пиноцитоз приводит к удалению жидкости из просвета матки и «схлопыванию» ее стенок, что способствует удержанию бластоцисты в месте имплантации [64]. Крупные вакуоли, характерные для пиноподий грызунов, принимают непосредственное участие в пиноцитозе [44, 49]. Но у человека участие пиноподий в поглощении эндометриальной жидкости не установлено [65]. По этой причине С.Р. Murphy предложил для обозначения пиноподий человека использовать термин «утеродомы» (англ. *uterodomes*) [51, 65].

У крыс появление пиноподий четко коррелирует с «созреванием» эндометрия и возможностью имплантации: пиноподии начинают образовываться на 4-й день после спаривания (преимплантационный период), их количество достигает максимума на 5-й день (время возможной имплантации) и стремительно снижается на 6-й день (постимплантационный период) [39, 48]. Однако для человека вопрос возможности использования пиноподий в качестве маркера уровня рецептивности эндометрия до сих пор остается дискуссионным ввиду противоречивых результатов проведенных исследований. В работах группы G. Nikas было показано, что пиноподии образуются в середине лютеиновой (секреторной) фазы менструального цикла, существуют менее 48 часов в период «имплантационного окна» и, таким образом, могут быть маркерами рецептивного эндометрия [17, 18, 54, 66]. Согласно результатам других исследований, пиноподии могут существовать в течение большей части лютеиновой фазы, без связи с периодом «имплантационного окна». При этом количество пиноподий и степень их зрелости могут сильно варьировать [40, 43, 45, 58, 67]. Например, в работе M. Creus и соавт. с целью изучения длительности существования пиноподий биопсия ткани эндометрия проводилась в различные периоды лютеиновой фазы: первая биопсия – на 7–8-й дни после овуляции (LN+7–LN+8, предполагаемый период «имплантационного окна»), вторая – спустя 11–12 дней после овуляции (LN+11–LN+12). В 73% биопсий, проведенных на 7–8-й дни, и 56% биопсий, проведенных на 11–12-й дни, были обнаружены пиноподии, то

есть более чем в 50% случаев пиноподии существовали по крайней мере в течение 4 дней, LH+8–LH+11 [57]. В другом исследовании были получены схожие результаты: пиноподии появлялись на 20–21-й дни цикла и могли быть обнаружены до 28-го дня [45]. Пиноподии находили и на более ранних сроках: по крайней мере в одном исследовании в 50% образцов пиноподии были обнаружены на 3-й день после овуляции и в 70–90% образцов – на 4–9-й дни [68]. Более того, в работе по изучению образцов эндометрия после прерывания беременности в первом триместре или неразвивающейся беременности было показано наличие пиноподий в структуре клеток эндометрия [40]. Следует отметить, что изучение количества и морфологии пиноподий представляет собой непростую задачу, и результаты сильно зависят от исследованных участков образца. Так, продемонстрировано существование в одном образце пиноподий на различных стадиях развития [40, 43]. К тому же оценка степени зрелости и количества пиноподий сильно зависит от опыта и квалификации специалиста.

Нарушение рецептивности эндометрия рассматривают как одну из возможных причин бесплодия при эндометриозе [69, 70]. В связи с этим в ряде работ была исследована динамика появления и морфологии пиноподий как возможного маркера рецептивности эндометрия в группах фертильных здоровых женщин и пациенток с эндометриозом. Было установлено отсутствие значимой разницы по обоим параметрам между группами [41, 71, 72]. Результаты свидетельствуют: бесплодие женщин с эндометриозом не связано с изменениями в морфологии или количестве пиноподий, а является следствием нарушений на другом уровне.

Роль пиноподий в качестве показателя уровня рецептивности эндометрия предполагает, что они образуются примерно в одно и то же время каждый овуляторный цикл. Изучение образцов эндометрия на 7-й день после овуляции в течение трех последовательных циклов показало плохую сходимость результатов в случае конкретной пациентки. При этом никакой закономерности, определяющей время образования пиноподий в следующем цикле, выявлено не было [73].

Иммуногистохимические исследования

Описано множество соединений, влияющих прямо или опосредованно на взаимодействие между клетками трофобласта эмбриона и эндометрием на молекулярном уровне. Это белки клеточной адгезии, цитокины, факторы роста и другие

регуляторные и структурные молекулы [20, 22–24, 32]. Их изучение в образцах эндометрия преимущественно основано на использовании иммуногистохимических методов и в некоторых случаях, когда необходимо исследовать экспрессию белка на уровне мРНК, флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [74–76]. Наиболее изученным белком, экспрессию которого связывают с установлением периода «имплантационного окна», является интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$ [77–79]. Интегрины относятся к группе белков клеточной адгезии, которые отвечают за взаимодействие клеток друг с другом и с компонентами межклеточного матрикса. Установлено отсутствие или низкий уровень экспрессии интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$ в различных воспалительных процессах, приводящих к нарушению имплантации: эндометриоз, эндометрит, гидросальпинкс [37, 38]. Сниженный уровень экспрессии интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$ также связывают с идиопатическим бесплодием в рамках программ ВРТ [80, 81]. В исследованиях на мышах было показано, что интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$ появляется в эндометрии в период «имплантационного окна», а также присутствует на поверхности клеток трофобласта эмбриона. Нарушение функции белка приводило к снижению количества сайтов имплантации [82]. Прогностический потенциал интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$ в качестве маркера рецептивного эндометрия был реализован при создании коммерческих тестов компаниями “Cytoc Diagnostic Services Laboratory” и “Innovative Reproductive Solutions” (Etegrity Plus test), США. Тесты были основаны на иммуногистохимическом определении уровня экспрессии белка, однако широкого клинического применения данные исследования не получили. В группе белков клеточной адгезии есть и другие молекулы, кроме интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$, которые рассматривают в качестве способных влиять на рецептивность эндометрия: CD44, trophinin, cadherin-11 [83–85]. Другие возможные маркеры, определяющие рецептивное состояние эндометрия, включают: цитокин LIF (leukemia inhibitory factor – ингибирующий фактор лейкемии), факторы роста HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor-like factor – гепаринсвязывающий EGF-подобный фактор роста) и IGF-II (insulin-like growth factor-II – инсулиноподобный фактор роста-II) [20, 23, 32, 86], кальцитонин [74, 75], транскрипционные факторы HOXA10 и HOXA11 [76, 87–89], L-селектин и лиганд L-селектина [90].

Определение уровня простагландинов PGE₂ и PGF_{2α}

Изучение концентрации биологических молекул в различных жидкостях организма признано



эффективной альтернативой гистологическим методам диагностики, основанным на проведении инвазивных манипуляций. Клетки эндометрия активно выделяют эндометриальную жидкость, образец которой может быть использован для анализа [91]. При этом процедуру забора образца можно проводить в цикле переноса без негативного влияния на возможность последующей имплантации эмбриона [92]. F. Vilella и соавт. с целью диагностики периода «имплантационного окна» изучали уровень простагландинов PGE_2 и $PGF_{2\alpha}$ в эндометриальной жидкости [19].

Простагландины представляют собой физиологически активные молекулы, образующиеся из фосфолипидов клеточной мембраны в результате последовательного действия цитозольной фосфолипазы A_2 (cytosolic phospholipase A_2 – cPLA $_2$), циклооксигеназ (cyclooxygenases: COX-1, COX-2, COX-3) и простагландинсинтаз (prostaglandin synthases – PGS) [93, 94]. Семейство простагландинов включает четыре вида молекул: PGD $_2$, PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ и PGI $_2$ (простациклин). Простагландины принимают участие в регуляции ангиогенеза, межклеточного взаимодействия, инвазивных и метастатических процессов, влияют на морфологию и подвижность клеток [95]. Исследования на мышах показали важность cPLA $_2$ и COX-2 для успешной имплантации: отсутствие ферментов приводило к нарушению процессов овуляции, оплодотворения и имплантации [96, 97]. Введение экзогенного простагландина PGE_2 нивелировало эти эффекты [96]. У человека экспрессия ферментов, отвечающих за биосинтез простагландинов, так же как образование самих простагландинов, происходит на протяжении всего менструального цикла. Например, PGE_2 -синтаза (PGES) и простагландин PGE_2 были обнаружены в эндометрии на всех стадиях цикла с очевидным снижением уровня экспрессии/синтеза в период поздней лютеиновой фазы [98]. Простагландины $PGF_{2\alpha}$ и PGI $_2$ играют важную роль во время пролиферативной и менструальной фаз цикла соответственно [99, 100]. Сниженный уровень образования простагландинов рассматривают как одну из возможных причин систематического нарушения имплантации эмбрионов в рамках программ BPT [101].

С помощью масс-спектрометрии F. Vilella и соавт. установили, что из всех липидных соединений эндометриальной жидкости на 19–23-й дни естественного менструального цикла статистически достоверно увеличивается концентрация только двух простагландинов – PGE_2 и $PGF_{2\alpha}$ [19]. Эта закономерность сохраняется и в циклах с заместительной гормональной терапией, и в циклах

с контролируемой стимуляцией яичников. Использование маточной спирали, напротив, приводит к резкому снижению количества простагландинов. Авторы провели анализ концентрации данных простагландинов в образцах эндометриальной жидкости, взятых за 24 часа до переноса эмбрионов на 3-й или 5-й дни развития. В образцах пациенток, у которых перенос привел к имплантации и началу беременности, средний уровень концентрации простагландинов был существенно выше. В случае переноса на 3-й день чувствительность и специфичность исследования для PGE_2 составили 80 и 86,7% соответственно, для $PGF_{2\alpha}$ – 100 и 93,3%. При переносе на 5-й день чувствительность и специфичность для PGE_2 были 75 и 77,8% соответственно, для $PGF_{2\alpha}$ – 37,5 и 100% [19]. Авторы предположили, что исследование эндометриальной жидкости на предмет концентрации простагландинов PGE_2 и $PGF_{2\alpha}$ за 24 часа до планируемого переноса эмбрионов может служить маркером успешной имплантации, однако для точного ответа на этот вопрос необходимо проведение более масштабных исследований.

Молекулярно-генетические методы исследования

Образование пиноподий, изменение их морфологии, появление структурных белков на апикальной поверхности эпителиальных клеток, секреция растворимых регуляторных факторов и экспрессия других молекулярных маркеров рецептивного эндометрия – все эти процессы возникают вследствие изменения транскрипционной активности генов под влиянием стероидных гормонов. Транскрипционную активность генов определяют по количеству соответствующих мРНК. Представленность единичных молекул мРНК обычно изучают с помощью нозерн-блот анализа (англ. Northern blot) или обратной транскрипции с количественной полимеразной цепной реакцией. Для анализа всего пула молекул мРНК в клетке используют микроматричный анализ или высокопроизводительное секвенирование (next generation sequencing – NGS) – современные генетические технологии, которые в рамках одного эксперимента позволяют исследовать экспрессию сотен и тысячи генов. Так, во многих работах наряду с иммуногистохимическим окрашиванием проводили исследование количества и распределения соответствующих мРНК, например, фактора LIF [36, 102, 103], интегрин $\alpha v \beta 3$ [32, 104], кальцитонина [74] и других. В частности, было показано, что мРНК фактора LIF может быть обнаружена в клетках эндометрия на протяжении 18–28 дней

цикла, при этом пик экспрессии приходится на 20-й день [102, 103]. Однако исследования единичных молекул мРНК, так же как и отдельных гистохимических маркеров рецептивности эндометрия, не отражают всей сложности процессов, происходящих в эндометрии в период «имплантационного окна», тогда как современные технологии для полногеномного профилирования мРНК дают более точную и полную картину. Полногеномный анализ мРНК уже широко применяется в онкологии для диагностики и классификации типа опухоли и подбора лекарственной терапии [105–108]. С помощью микроматричного анализа была установлена специфическая картина экспрессии мРНК (транскрипционный профиль), характерная для эндометрия здоровых фертильных женщин [109, 110] и эндометрия на фоне различных гинекологических заболеваний [111–114], показана возможность достоверной классификации образцов эндометрия согласно этапам лютеиновой фазы цикла по профилю мРНК в клетках образца [115–117].

Возможность использования транскрипционного профиля образца эндометрия для определения уровня рецептивности и периода «имплантационного окна» была реализована при создании теста ERA (Endometrium Receptivity Assay) [115]. В рамках теста проводится анализ мРНК 238 генов, показавших статистически достоверное различие уровня экспрессии при анализе образцов пререцептивного, рецептивного и пострецептивного эндометрия. Для проведения исследования пул мРНК, выделенный из клеток образца, анализируют с помощью технологий микроматричного анализа или высокопроизводительного секвенирования (NGS). Последующая математическая обработка результатов позволяет оценить представленность различных мРНК и определить состояние эндометрия в зависимости от транскрипционного профиля образца. Для исследования необходимо проведение Пайпель-биопсии в цикле заместительной гормональной терапии или естественном цикле. Тест не был валидирован для программ с контролируемой гормональной стимуляцией овуляции. Согласно рекомендациям лаборатории, биопсия эндометрия в цикле гормонзаместительной терапии проводится спустя 5 полных дней (примерно 120 часов) с момента назначения препаратов прогестерона. Биопсия эндометрия в естественном менструальном цикле проводится спустя 7 полных дней (примерно 168 часов) с момента появления пика лютеинизирующего гормона (LH+0), определяемого по содержанию гормона в моче или сыворотке крови. Если для контроля

овуляции используется ультразвуковое исследование (Ov+0), биопсия проводится спустя 6 полных дней (Ov+6), что соответствует примерно 144 часам. В случае естественного менструального цикла с использованием хорионического гонадотропина (hCG) биопсия эндометрия проводится спустя 7 полных дней (hCG+7) с момента назначения препаратов гормона (hCG+0) [118].

Результат теста показывает состояние эндометрия на день проведения биопсии строго в рамках выбранного типа цикла. «Рецептивный» статус эндометрия означает, что период «имплантационного окна» для конкретного типа цикла приходится на момент биопсии и данный промежуток времени является наиболее благоприятным для имплантации развивающегося эмбриона. При наличии витрифицированных эмбрионов перенос может быть осуществлен при следующем повторении выбранного для исследования рецептивности варианта цикла, при этом перенос бластоцисты происходит в тот же день цикла, когда проводилась биопсия эндометрия, тогда как в случае трехдневных эмбрионов перенос осуществляется на 2 дня раньше. «Нерецептивный» статус эндометрия свидетельствует о смещении периода «имплантационного окна». При этом анализ транскрипционного профиля образца дает возможность предсказать, в какую именно сторону относительно дня биопсии в рамках выбранного варианта цикла произошло смещение ($\pm 1, 2$ или 3 дня). Последующая подготовка к переносу эмбрионов должна осуществляться с учетом информации о смещении «имплантационного окна» в индивидуальном порядке. Примерно у 30% женщин, сталкивающихся с проблемой нарушения имплантации эмбрионов в рамках программ ВРТ, исследования показывают смещение периода «имплантационного окна» [119]. Решение о переносе эмбрионов принимается в индивидуальном порядке с учетом знания о состоянии зрелости эндометрия (personalised embryo transfer – pET). Благодаря витрификации эмбрионов стало возможным синхронизировать развитие эмбриона и время переноса, если диагностировано смещение «имплантационного окна». Исследования показали хорошую воспроизводимость результатов теста ERA: отклонений от первоначального диагноза не было обнаружено на протяжении 29–40 месяцев проведения повторных биопсий [120]. Стабильность результатов позволяет провести исследование в рамках одного цикла, а перенос – в рамках последующего цикла с учетом результатов анализа.

Несмотря на то что с помощью микроматриц или NGS стало возможным провести



одновременный анализ сразу большого количества транскриптов, не было выявлено одного или нескольких ключевых генов, способных влиять на рецептивность эндометрия. Одна из причин заключается в том, что для исследования мРНК выделяют из всех клеток образца эндометрия. Функционально активные клетки, экспрессирующие необходимые для установления максимальной рецептивности факторы, составляют меньшую долю по сравнению со всем пулом клеток. Таким образом, даже если отдельные гены претерпевают значительные колебания уровня активности в период «имплантационного окна», эти изменения не будут обнаружены, а результаты анализа отражают среднюю картину уровня экспрессии мРНК во всех клетках образца. При этом верно и обратное утверждение: гены, показывающие существенное увеличение или снижение активности по результатам полногеномного анализа, не обязательно ключевые для успешной имплантации. Именно поэтому результаты полногеномных исследований не всегда совпадают с результатами анализа единичных транскриптов [121]. Еще одна гипотеза связана с тем, что рецептивный статус эндометрия является результатом координированной экспрессии сразу большого количества генов, без доминирующей роли какого-то одного или нескольких факторов. Тем не менее в отдельных работах встречается информация о существовании «избранного» пула генов. Так, J.A. Nogajadas и соавт. предложили список из 25 генов, определяющих рецептивность эндометрия [122]. Для определения этих генов были проанализированы результаты полногеномных исследований в трех категориях образцов, полученных в рамках естественного цикла, после контролируемой стимуляции яичников или в условиях рефрактерного эндометрия (использование маточной спирали). В рамках естественного цикла были определены 1399 генов, активность которых меняется в течение предполагаемого периода «имплантационного окна», LH+7 [117, 121, 123]. Из них транскрипционная активность 342 генов изменяется на фоне контролируемой стимуляции яичников [109, 123] и 52 генов – в условиях рефрактерного эндометрия [124]. После сравнения результатов всех трех исследований была выделена группа из 25 генов, общих для каждого случая. Список включает гены, изменение активности которых было показано ранее при изучении единичных транскриптов, например, фактора LIF, и гены, активность которых изменяется в условиях эндометриоза [125] или рака эндометрия [126]. Недавно M. Enciso и соавт. предложили скрининговый тест уровня рецептивности эндометрия на

основе анализа экспрессии 40 генов с помощью обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции [127]. Были отобраны гены, активность которых изменяется при наступлении средней лютеиновой фазы и о продуктах которых известно, что они функционально вовлечены в различные процессы, протекающие в эндометрии в период «имплантационного окна» и на этапе подготовки к нему. Предложенная выборка генов позволяет, как и в случае теста ERA, дифференцировать статус образцов эндометрия как «рецептивный», «пре-» или «пострецептивный». Сравнивая результаты анализа с помощью обоих методов, авторы получили совпадение результатов в 97,59% тестовых образцов и в 91,67% экспериментальных образцов. Интересно, что только семь генов совпадают между этими двумя вариантами анализа. Возможно, разница в выборке генов и стала причиной неточного совпадения результатов тестов.

Обсуждение

Осознание важности проблемы успешной имплантации эмбриона для лечения бесплодия и повышения результативности программ ВРТ привело к тому, что усилия многих лабораторий по всему миру направлены на поиски специфичного маркера, который мог бы служить для выявления патологии на уровне рецептивности эндометрия. Уникальный маркер должен появляться в период «имплантационного окна» в группе здоровых фертильных женщин и присутствовать в достоверно меньшем количестве или исчезать в группе пациенток с бесплодием, а также в случае пациенток с патологией со стороны эндометрия. Уровень экспрессии такого маркера должен положительно коррелировать с вероятностью успешной имплантации. Немаловажным также представляется способ забора биологического образца для проведения исследования: чем менее инвазивной будет процедура, тем лучше. Поиски такого маркера на уровне морфологии эндометрия, биохимическом и молекулярном уровнях привели к пониманию того, что рецептивный статус эндометрия зависит скорее от взаимодействия большого количества факторов, нежели от какого-то одного параметра. При этом сложность происходящих структурных и функциональных изменений, свидетельствующих об установлении рецептивного эндометрия, лучше всего отражает изучение активности генов в масштабах всего генома. Изучение какого-то одного или нескольких параметров не отражает всех происходящих событий, кроме того, в результате такого подхода могут быть упущены важные

процессы или взаимодействия. Анализ количества мРНК является одним из подходов, который используется для изучения активности генов, а такие современные технологии, как микроматричный анализ или высокопроизводительное секвенирование (NGS), делают возможным анализ всех транскриптов в рамках одного эксперимента. Принцип одновременного анализа большого количества мРНК был реализован при создании теста ERA, при проведении которого исследуется уровень экспрессии 238 генов, влияющих на рецептивность эндометрия [115]. Тест позволяет не только дифференцировать «рецептивное», «пре-» или «пострецептивное» состояния эндометрия, но в отличие от других методов, основанных на изучении уровня простагландинов в эндометриальной жидкости, иммуногистохимическом исследовании образца ткани эндометрия или анализе пиноподий с помощью электронной микроскопии, позволяет достоверно предсказать смещение периода «имплантационного окна» на более раннее или более позднее время. В основе точности и высокой клинической эффективности теста ERA лежат статистические данные, полученные в результате анализа большой выборки образцов эндометрия на этапе разработки теста. После коммерциализации и внедрения теста в клиническую практику по всему миру ежегодно проводятся тысячи исследований, результаты которых подтверждают точность и достоверность используемого алгоритма обработки данных.

Исследование уровня рецептивности эндометрия рекомендуется проводить после нескольких неудачных программ ВРТ, в том числе по причине нарушения имплантации эмбрионов, а также в случаях привычного невынашивания и ранних потерь. Перенос эмбрионов после преимплантационного генетического скрининга/диагностики позволяет снизить вероятность неудачи программы в результате хромосомных нарушений со стороны эмбриона. При этом факт неоднократных переносов генетически полноценного эмбриона (как минимум трех попыток в случае женщин моложе 37 лет и двух попыток для женщин старшего репродуктивного возраста) при условии нормально развитой матки и эндометрия толщиной ≥ 6 мм, закончившихся неудачей, позволяет предположить наличие патологии со стороны эндометрия. Смещение периода «имплантационного окна» установлено примерно у 30% женщин, попадающих в данную категорию пациентов [119].

Следует отметить, что экспрессия генов на уровне мРНК специфически регулируется с помощью микроРНК, которые обеспечивают более

тонкую настройку уровня экспрессии. МикроРНК представляют собой короткие, от 20 до 24 п.о., двухцепочечные молекулы РНК, способные приводить к деградации регулируемой мРНК или блоку ее трансляции [128, 129]. МикроРНК участвуют в регуляции многих биологических процессов, включая процессы роста и развития, дифференцировки, формирования органов и тканей, поддержания плюрипотентности и пролиферативной способности клеток, апоптоза [130, 131], – событий, аналогичных тем, которые в рамках менструального цикла происходят в том числе и с эндометрием матки. Таким образом, микроРНК могут принимать активное участие в регуляции установления рецептивного статуса эндометрия. Создание генетической панели, позволяющей определять профиль микроРНК в клетках эндометрия, может стать новым, более чувствительным в отношении различных вариантов патологических состояний, инструментом для изучения рецептивности эндометрия. Так, изменения профиля микроРНК уже много лет используются в онкологии для классификации опухолей, установления стадии развития, определения природы метастазов, подбора и прогноза эффективности химиотерапии, прогноза продолжительности жизни пациентов [132–134].

Заключение

В последние годы с целью повышения результативности программ ВРТ акцент в репродуктивной медицине был сделан на преимплантационный генетический скрининг хромосомных нарушений и определение рецептивности эндометрия. Сегодня наиболее эффективными и точными методами диагностики периода «имплантационного окна», когда эндометрий достигает максимальной рецептивности, представляются подходы, основанные на изучении транскрипционного профиля образца ткани эндометрия. Анализ представленности мРНК позволяет не только точно диагностировать уровень рецептивности эндометрия на момент биопсии, но и достоверно предсказать возможное смещение периода «имплантационного окна» на более ранний или более поздний сроки. Несмотря на все достижения, большая часть программ ВРТ по-прежнему заканчиваются неудачно. Отсутствием имплантации может закончиться и перенос эмбриона после преимплантационного генетического скрининга/диагностики в период установленного «имплантационного окна». Возможная причина неудачи отчасти связана с ограничениями существующих методов



определения анеуплоидии в эмбрионах 5–6 дней развития. Однако причина может также скрываться в системных факторах, влияющих на здоровье матери и возможность имплантации эмбриона. К таким системным факторам относятся нарушения функции щитовидной железы, дефицит витамина D, уровень пролактина, ожирение,

воспалительные заболевания кишечника, ауто-иммунные процессы, курение [22]. И хотя каждый из этих факторов в отдельности вряд ли выступает причиной бесплодия, в сочетании с другими обстоятельствами может приводить к снижению шансов на успешное завершение программы ВРТ. ☺

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

М.В. Кибанов – поиск и анализ литературы, обработка исходного материала, написание текста; Г.М. Махмудова – редактирование и финальное утверждение рукописи; Я.А. Гохберг – поиск и анализ литературы, обработка исходного материала, написание текста. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Литература / References

1. Macklon NS, Geraedts JP, Fauser BC. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update*. 2002;8(4):333–43. doi: 10.1093/humupd/8.4.333.
2. Laverigne N, Aristizabal J, Zarka V, Erny R, Hedon B. Uterine anomalies and in vitro fertilization: what are the results? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1996;68(1–2):29–34. doi: 10.1016/0301-2115(96)02459-1.
3. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demiral A, Gurgan T, Cutting R, Ong K, Sallam H, Li TC. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(1):14–38. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.08.011.
4. Fiorentino F, Bono S, Biricik A, Nuccitelli A, Cotroneo E, Cottone G, Kokocinski F, Michel CE, Minasi MG, Greco E. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod*. 2014;29(12):2802–13. doi: 10.1093/humrep/deu277.
5. Yang Z, Lin J, Zhang J, Fong W, Li P, Zhao R, Liu X, Podevin W, Kuang Y, Liu J. Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: a pilot study. *BMC Med Genomics*. 2015;8:30. doi: 10.1186/s12920-015-0110-4.
6. Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, Peck AC, Sills ES, Salem RD. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet*. 2012;5(1):24. doi: 10.1186/1755-8166-5-24.
7. Harton GL, Munné S, Surrey M, Grifo J, Kaplan B, McCulloh DH, Griffin DK, Wells D; PGD Practitioners Group. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertil Steril*. 2013;100(6):1695–703. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.2002.
8. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Ross R. Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony. *Fertil Steril*. 2008;89(1):20–6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.08.092.
9. Franasiak J, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Scott RT Jr. Investigating the impact of the timing of blastulation on implantation: active management of embryo-endometrial synchrony increases implantation rates. *Fertil Steril*. 2013;100(3 Suppl):S97. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1710.
10. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Freeze-all can be a superior therapy to another fresh cycle in patients with prior fresh blastocyst implantation failure. *Reprod Biomed Online*. 2014;29(3):286–90. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.04.009.
11. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med*. 1999;340(23):1796–9. doi: 10.1056/NEJM199906103402304.
12. Vanrell JA, Balasch J. Luteal phase defects in repeated abortion. *Int J Gynaecol Obstet*. 1986;24(2):111–5. doi: 10.1016/0020-7292(86)90004-4.
13. Shapiro BS, Daneshmand ST, Desai J, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. The risk of embryo-endometrium asynchrony increases with maternal age after ovarian stimulation and IVF. *Reprod Biomed Online*. 2016;33(1):50–5. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.04.008.
14. Faragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, Wells D. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet*. 2013;132(9):1001–13. doi: 10.1007/s00439-013-1309-0.
15. Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT Jr. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoblast biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril*. 2014;101(3):656–63.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.11.004.
16. Denker HW. Implantation: a cell biological paradox. *J Exp Zool*. 1993;266(6):541–58. doi: 10.1002/jez.1402660606.
17. Nikas G. Endometrial receptivity: changes in cell-surface morphology. *Semin Reprod Med*. 2000;18(3):229–35. doi: 10.1055/s-2000-12561.
18. Nikas G, Makrigiannakis A, Hovatta O, Jones HW Jr. Surface morphology of the human endometrium. Basic and clinical aspects. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;900:316–24. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06244.x.
19. Vilella F, Ramirez L, Berlanga O, Martínez S, Alamá P, Meseguer M, Pellicer A, Simón C. PGE2 and PGF2α concentrations in human endometrial fluid as biomarkers for embryonic implantation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(10):4123–32. doi: 10.1210/jc.2013-2205.
20. Aplin JD, Ruane PT. Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance. *J Cell Sci*. 2017;130(1):15–22. doi: 10.1242/jcs.175943.
21. Aplin JD, Kimber SJ. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:48. doi: 10.1186/1477-7827-2-48.
22. Fox C, Morin S, Jeong JW, Scott RT Jr, Lessey BA. Local and systemic factors and implantation: what is the evidence? *Fertil Steril*. 2016;105(4):873–84. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.02.018.
23. Крылова ЮС, Кветной ИМ, Айламазян ЭК. Рецептивность эндометрия: молекулярные механизмы регуляции имплантации. Журнал акушерства и женских болезней. 2013;62(2):



- 63–74. doi: 10.17816/JOWD62263-74. [Krylova YS, Kvetnoy IM, Aylamazyan EK. Endometrial receptivity: the molecular mechanisms regulation of implantation. *Journal Of Obstetrics And Women's Diseases*. 2013;62(2):63–74. Russian. doi: 10.17816/JOWD62263-74].
24. Аганезов СС, Аганезова НВ, Мороцкая АВ, Пономаренко КЮ. Рецептивность эндометрия у женщин с нарушениями репродуктивной функции. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2017;66(3): 135–42. doi: 10.17816/JOWD663135-142. [Aganezov SS, Aganezova NV, Morotskaya AV, Ponomarenko KY. Endometrial receptivity in women with disorders in reproductive system. *Journal Of Obstetrics And Women's Diseases*. 2017;66(3):135–42. Russian. doi: 10.17816/JOWD663135-142].
25. Jones GE. Some newer aspects of the management of infertility. *J Am Med Assoc*. 1949;141(16):1123–9. doi: 10.1001/jama.1949.02910160013004.
26. Balasch J, Creus M, Márquez M, Burzaco I, Vanrell JA. The significance of luteal phase deficiency on fertility: a diagnostic and therapeutic approach. *Hum Reprod*. 1986;1(3):145–7. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136370.
27. McNeely MJ, Soules MR. The diagnosis of luteal phase deficiency: a critical review. *Fertil Steril*. 1988;50(1):1–15. doi: 10.1016/S0015-0282(16)59999-3.
28. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril*. 1950;1(1):3–25. doi: 10.1016/S0015-0282(16)30062-0.
29. Wentz AC. Endometrial biopsy in the evaluation of infertility. *Fertil Steril*. 1980;33(2):121–4. doi: 10.1016/S0015-0282(16)44530-9.
30. Davis OK, Berkeley AS, Naus GJ, Cholist IN, Freedman KS. The incidence of luteal phase defect in normal, fertile women, determined by serial endometrial biopsies. *Fertil Steril*. 1989;51(4):582–6. doi: 10.1016/S0015-0282(16)60603-9.
31. Coutifaris C, Myers ER, Guzick DS, Diamond MP, Carson SA, Legro RS, McGovern PG, Schlaff WL, Carr BR, Steinkampf MP, Silva S, Vogel LD, Leppert PC; NICHD National Cooperative Reproductive Medicine Network. Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril*. 2004;82(5):1264–72. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.03.069.
32. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*. 2006;12(6): 731–46. doi: 10.1093/humupd/dml004.
33. Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, Lessey BA, Novotny DB, Ireland K, Zeng D, Fritz MA. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril*. 2004;81(5):1333–43. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.11.030.
34. Myers ER, Silva S, Barnhart K, Groben PA, Richardson MS, Robboy SJ, Leppert P, Coutifaris C; NICHD National Cooperative Reproductive Medicine Network. Interobserver and intraobserver variability in the histological dating of the endometrium in fertile and infertile women. *Fertil Steril*. 2004;82(5):1278–82. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.04.058.
35. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Current clinical irrelevance of luteal phase deficiency: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2015;103(4):e27–32. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.12.128.
36. Franasia JM, Holoch KJ, Yuan L, Schammel DP, Young SL, Lessey BA. Prospective assessment of midsecretory endometrial leukemia inhibitor factor expression versus $\alpha\beta 3$ testing in women with unexplained infertility. *Fertil Steril*. 2014;101(6):1724–31. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.02.027.
37. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R, Bilker W, Strom BL. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(2):643–9. doi: 10.1210/jcem.79.2.7519194.
38. Meyer WR, Castelbaum AJ, Somkuti S, Sogokin AW, Doyle M, Harris JE, Lessey BA. Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Hum Reprod*. 1997;12(7): 1393–8. doi: 10.1093/humrep/12.7.1393.
39. Psychoyos A, Mandon P. Study of the surface of the uterine epithelium by scanning electron microscope. Observations in the rat at the 4th and 5th day of pregnancy. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 1971;272(21):2723–5.
40. Quinn C, Ryan E, Claessens EA, Greenblatt E, Hawrylyshyn P, Cruickshank B, Hannam T, Dunk C, Casper RF. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window. *Fertil Steril*. 2007;87(5):1015–21. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.08.101.
41. Da Broi MG, Rocha CV Jr, Carvalho FM, Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA. Ultrastructural evaluation of eutopic endometrium of infertile women with and without endometriosis during the window of implantation: A pilot study. *Reprod Sci*. 2017;24(10):1469–75. doi: 10.1177/1933719117691142.
42. Quinn CE, Detmar J, Casper RF. Pinopodes are present in Lf null and Hoxa10 null mice. *Fertil Steril*. 2007;88(4 Suppl):1021–8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.11.157.
43. Quinn CE, Casper RF. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Hum Reprod Update*. 2009;15(2):229–36. doi: 10.1093/humupd/dmn052.
44. Enders AC, Nelson DM. Pinocytotic activity of the uterus of the rat. *Am J Anat*. 1973;138(3): 277–99. doi: 10.1002/aja.1001380302.
45. Acosta AA, Elberger L, Borghi M, Calamera JC, Chemes H, Doncel GF, Kliman H, Lema B, Lustig L, Papier S. Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. *Fertil Steril*. 2000;73(4): 788–98. doi: 10.1016/S0015-0282(99)00605-6.
46. Nilsson O. Ultrastructure of mouse uterine surface epithelium under different estrogenic influences. 1. Spayed animals and oestrous animals. *J Ultrastruct Res*. 1958;1(4):375–96. doi: 10.1016/S0022-5320(58)90009-1.
47. Johannisson E, Nilsson L. Scanning electron microscopic study of the human endometrium. *Fertil Steril*. 1972;23(9):613–25. doi: 10.1016/S0015-0282(16)39188-9.
48. Singh MM, Chauhan SC, Trivedi RN, Maitra SC, Kamboj VP. Correlation of pinopod development on uterine luminal epithelial surface with hormonal events and endometrial sensitivity in rat. *Eur J Endocrinol*. 1996;135(1): 107–17. doi: 10.1530/eje.0.1350107.
49. Parr MB, Parr EL. Uterine luminal epithelium: protrusions mediate endocytosis, not apocrine secretion, in the rat. *Biol Reprod*. 1974;11(2): 220–33. doi: 10.1095/biolreprod11.2.220.
50. Nilsson O. Ultrastructure of the process of secretion in the rat uterine epithelium at pre-implantation. *J Ultrastruct Res*. 1972;40(5–6): 572–80. doi: 10.1016/S0022-5320(72)80044-3.
51. Murphy CR. Understanding the apical surface markers of uterine receptivity: pinopods-or uterodomes? *Hum Reprod*. 2000;15(12):2451–4. doi: 10.1093/humrep/15.12.2451.
52. Bentin-Ley U, Sjögren A, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF, Horn T. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum Reprod*. 1999;14(2):515–20. doi: 10.1093/humrep/14.2.515.
53. Kabir-Salmani M, Nikzad H, Shiokawa S, Akimoto Y, Iwashita M. Secretory role for human uterodomes (pinopods): secretion of LIF. *Mol Hum Reprod*. 2005;11(8):553–9. doi: 10.1093/molehr/gah218.
54. Nikas G. Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. *Hum Reprod*. 1999;14 Suppl 2:99–106. doi: 10.1093/humrep/14.suppl_2.99.
55. Nikas G, Drakakis P, Loutradis D, Mara-Skoufari C, Koumantakis E, Michalas S, Psychoyos A. Uterine pinopodes as markers of the 'nidation window' in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Hum Reprod*. 1995;10(5):1208–13. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136120.
56. Chen C, Yan Q, Liu K, Zhou X, Xian Y, Liang D, Zhao X, Guo X, Quan S. Endometrial receptivity markers in mice stimulated with raloxifene versus clomiphene citrate and natural cycles. *Reprod Sci*. 2016;23(6):748–55. doi: 10.1177/1933719115616496.
57. Creus M, Ordi J, Fábregues F, Casamitjana R, Ferrer B, Coll E, Vanrell JA, Balasch J. $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin expression and pinopod formation in normal and out-of-phase endometria of fertile and infertile women. *Hum Reprod*. 2002;17(9):2279–86. doi: 10.1093/humrep/17.9.2279.
58. Usadi RS, Murray MJ, Bagnell RC, Fritz MA, Kowalik AI, Meyer WR, Lessey BA. Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. *Fertil Steril*. 2003;79(4): 970–4. doi: 10.1016/S0015-0282(02)04929-4.
59. Nikas G, Psychoyos A. Uterine pinopodes in peri-implantation human endometrium. Clinical relevance. *Ann N Y Acad Sci*.



- 1997;816:129–42. doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb52136.x.
60. Adams SM, Gayer N, Terry V, Murphy CR. Manipulation of the follicular phase: Uterodomes and pregnancy – is there a correlation? *BMC Pregnancy Childbirth*. 2001;1(1):2. doi: 10.1186/1471-2393-1-2.
61. Nikas G, Makrigiannakis A. Endometrial pinopodes and uterine receptivity. *Ann NY Acad Sci*. 2003;997:120–3. doi: 10.1196/annals.1290.042.
62. Petersen A, Bentin-Ley U, Ravn V, Qvortrup K, Sørensen S, Islin H, Sjögren A, Mosselmann S, Hamberger L. The antiprogesterone Org 31710 inhibits human blastocyst-endometrial interactions in vitro. *Fertil Steril*. 2005;83 Suppl 1:1255–63. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.08.040.
63. Parr MB, Parr EL. Endocytosis in the uterine epithelium of the mouse. *J Reprod Fertil*. 1977;50(1):151–3. doi: 10.1530/jrf.0.0500151.
64. Parr MB. Relationship of uterine closure to ovarian hormones and endocytosis in the rat. *J Reprod Fertil*. 1983;68(1):185–8. doi: 10.1530/jrf.0.0680185.
65. Adams SM, Gayer N, Hosie MJ, Murphy CR. Human uterodomes (pinopods) do not display pinocytotic function. *Hum Reprod*. 2002;17(8):1980–6. doi: 10.1093/humrep/17.8.1980.
66. Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Nikas Y, Hovatta O, Landgren BM. Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertil Steril*. 2003;79 Suppl 1:808–14. doi: 10.1016/S0015-0282(02)04830-6.
67. Xu B, Sun X, Li L, Wu L, Zhang A, Feng Y. Pinopodes, leukemia inhibitory factor, integrin- β 3, and mucin-1 expression in the peri-implantation endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2012;98(2):389–95. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.032.
68. Creus M, Ordi J, Fábregues F, Casamitjana R, Carmona F, Cardesa A, Vanrell JA, Balasch J. The effect of different hormone therapies on integrin expression and pinopode formation in the human endometrium: a controlled study. *Hum Reprod*. 2003;18(4):683–93. doi: 10.1093/humrep/deg177.
69. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Marshall LM, Hunter DJ. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *Am J Epidemiol*. 2004;160(8):784–96. doi: 10.1093/aje/kwh275.
70. Holoch KJ, Lessey BA. Endometriosis and infertility. *Clin Obstet Gynecol*. 2010;53(2):429–38. doi: 10.1097/GRF.0b013e3181db7d71.
71. Garcia-Velasco JA, Nikas G, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Endometrial receptivity in terms of pinopode expression is not impaired in women with endometriosis in artificially prepared cycles. *Fertil Steril*. 2001;75(6):1231–3. doi: 10.1016/S0015-0282(01)01774-5.
72. Ordi J, Creus M, Casamitjana R, Cardesa A, Vanrell JA, Balasch J. Endometrial pinopode and α v β 3 integrin expression is not impaired in infertile patients with endometriosis. *J Assist Reprod Genet*. 2003;20(11):465–73. doi: 10.1023/B:JARG.000006709.61216.6f.
73. Ordi J, Creus M, Quintó L, Casamitjana R, Cardesa A, Balasch J. Within-subject between-cycle variability of histological dating, α v β 3 integrin expression, and pinopod formation in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(5):2119–25. doi: 10.1210/jc.2002-021659.
74. Kumar S, Zhu LJ, Polihronis M, Cameron ST, Baird DT, Schatz F, Dua A, Ying YK, Bagchi MK, Bagchi IC. Progesterone induces calcitonin gene expression in human endometrium within the putative window of implantation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(12):4443–50. doi: 10.1210/jcem.83.12.5328.
75. Zhu LJ, Cullinan-Bove K, Polihronis M, Bagchi MK, Bagchi IC. Calcitonin is a progesterone-regulated marker that forecasts the receptive state of endometrium during implantation. *Endocrinology*. 1998;139(9):3923–34. doi: 10.1210/endo.139.9.6178.
76. Taylor HS, Arici A, Olive D, Igarashi P. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest*. 1998;101(7):1379–84. doi: 10.1172/JCI1057.
77. Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest*. 1992;90(1):188–95. doi: 10.1172/JCI115835.
78. Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW, Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril*. 1994;62(3):497–506. doi: 10.1016/S0015-0282(16)56937-4.
79. Thomas K, Thomson A, Wood S, Kingsland C, Vince G, Lewis-Jones I. Endometrial integrin expression in women undergoing in vitro fertilization and the association with subsequent treatment outcome. *Fertil Steril*. 2003;80(3):502–7. doi: 10.1016/S0015-0282(03)00792-1.
80. Tei C, Maruyama T, Kuji N, Miyazaki T, Mikami M, Yoshimura Y. Reduced expression of α v β 3 integrin in the endometrium of unexplained infertility patients with recurrent IVF-ET failures: improvement by danazol treatment. *J Assist Reprod Genet*. 2003;20(1):13–20. doi: 10.1023/A:1021254620888.
81. Miller PB, Parnell BA, Bushnell G, Tallman N, Forstein DA, Higdon HL 3rd, Kitawaki J, Lessey BA. Endometrial receptivity defects during IVF cycles with and without letrozole. *Hum Reprod*. 2012;27(3):881–8. doi: 10.1093/humrep/der452.
82. Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, Yuan L, Beyler SA, Lessey BA. Blockade of the α (v) β 3 integrin adversely affects implantation in the mouse. *Biol Reprod*. 2000;62(5):1285–90. doi: 10.1095/biolreprod62.5.1285.
83. Yaegashi N, Fujita N, Yajima A, Nakamura M. Menstrual cycle dependent expression of CD44 in normal human endometrium. *Hum Pathol*. 1995;26(8):862–5. doi: 10.1016/0046-8177(95)90008-X.
84. Fukuda MN, Sato T, Nakayama J, Klier G, Mikami M, Aoki D, Nozawa S. Trophinin and tascin, a novel cell adhesion molecule complex with potential involvement in embryo implantation. *Genes Dev*. 1995;9(10):1199–210. doi: 10.1101/gad.9.10.1199.
85. MacCalman CD, Furth EE, Omigbodun A, Bronner M, Coutifaris C, Strauss JF 3rd. Regulated expression of cadherin-11 in human epithelial cells: a role for cadherin-11 in trophoblast-endometrium interactions? *Dev Dyn*. 1996;206(2):201–11. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199606)206:2<201::AID-AJA9>3.0.CO;2-M.
86. Rarani FZ, Borhani F, Rashidi B. Endometrial pinopode biomarkers: Molecules and micro-RNAs. *J Cell Physiol*. 2018;233(12):9145–58. doi: 10.1002/jcp.26852.
87. Eun Kwon H, Taylor HS. The role of HOX genes in human implantation. *Ann NY Acad Sci*. 2004;1034:1–18. doi: 10.1196/annals.1335.001.
88. Vitiello D, Kodaman PH, Taylor HS. HOX genes in implantation. *Semin Reprod Med*. 2007;25(6):431–6. doi: 10.1055/s-2007-991040.
89. Князева ЕА, Калинина ЕА, Быстрицкий АА, Алиева КУ, Байрамова ГР. Роль HOX-генов при заболеваниях репродуктивной системы женщины, ассоциированных с бесплодием. *Акушерство и гинекология*. 2017;(11):16–22. doi: 10.18565/aig.2017.11.16-22. [Knyazeva EA, Kalinina EA, Bystritsky AA, Alieva KU, Bayramova GR. Role of HOX genes associated with infertility in female reproductive system diseases. *Obstetrics and Gynecology*. 2017;(11):16–22. Russian. doi: 10.18565/aig.2017.11.16-22].
90. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*. 2003;299(5605):405–8. doi: 10.1126/science.1079546.
91. Simón C, Gimeno MJ, Mercader A, O'Connor JE, Remohí J, Polan ML, Pellicer A. Embryonic regulation of integrins β 3, α 4, and α 1 in human endometrial epithelial cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(8):2607–16. doi: 10.1210/jcem.82.8.4153.
92. van der Gaast MH, Beier-Hellwig K, Fauser BC, Beier HM, Macklon NS. Endometrial secretion aspiration prior to embryo transfer does not reduce implantation rates. *Reprod Biomed Online*. 2003;7(1):105–9. doi: 10.1016/S1472-6483(10)61737-3.
93. Smith WL, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol*. 1996;62:167–215. doi: 10.1016/S0065-2776(08)60430-7.
94. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;38:97–120. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97.
95. Jabbour HN, Sales KJ. Prostaglandin receptor signalling and function in human endometrial pathology. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15(8):398–404. doi: 10.1016/j.tem.2004.08.006.



96. Song H, Lim H, Paria BC, Matsumoto H, Swift LL, Morrow J, Bonventre JV, Dey SK. Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial [correction of A2alpha deficiency is crucial] for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development. *Development*. 2002;129(12):2879–89.
97. Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*. 1997;91(2):197–208. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80402-X.
98. Milne SA, Perchick GB, Boddy SC, Jabbour HN. Expression, localization, and signaling of PGE(2) and EP2/EP4 receptors in human non-pregnant endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(9):4453–9. doi: 10.1210/jcem.86.9.7856.
99. Milne SA, Jabbour HN. Prostaglandin (PG) F(2alpha) receptor expression and signaling in human endometrium: role of PGF(2alpha) in epithelial cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(4):1825–32. doi: 10.1210/jc.2002-021368.
100. Battersby S, Critchley HO, de Brum-Fernandes AJ, Jabbour HN. Temporal expression and signalling of prostacyclin receptor in the human endometrium across the menstrual cycle. *Reproduction*. 2004;127(1):79–86. doi: 10.1530/rep.1.00038.
101. Achache H, Tsafir A, Prus D, Reich R, Revel A. Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010;94(4):1271–8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.07.1668.
102. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK. Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J Reprod Fertil*. 1994;101(2):421–6. doi: 10.1530/jrf.0.1010421.
103. Vogliagis D, Marsh MM, Fry RC, Salamonsen LA. Leukaemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Endocrinol*. 1996;148(1):95–102.
104. Apparao KB, Murray MJ, Fritz MA, Meyer WR, Chambers AF, Truong PR, Lessey BA. Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(10):4991–5000. doi: 10.1210/jcem.86.10.7906.
105. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286(5439):531–7. doi: 10.1126/science.286.5439.531.
106. Bloom G, Yang IV, Boulware D, Kwong KY, Coppola D, Eschrich S, Quackenbush J, Yeatman TJ. Multi-platform, multi-site, microarray-based human tumor classification. *Am J Pathol*. 2004;164(1):9–16. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63090-8.
107. Eschrich S, Yang I, Bloom G, Kwong KY, Boulware D, Cantor A, Coppola D, Kruhoffer M, Aaltonen L, Orntoft TF, Quackenbush J, Yeatman TJ. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3526–35. doi: 10.1200/JCO.2005.00.695.
108. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2463–72. doi: 10.1056/NEJMra042342.
109. Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, Giudice LC. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*. 2002;143(6):2119–38. doi: 10.1210/endo.143.6.8885.
110. Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, Nayak NR, Giudice LC. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology*. 2006;147(3):1097–121. doi: 10.1210/en.2005-1076.
111. Savaris RF, Groll JM, Young SL, DeMayo FJ, Jeong JW, Hamilton AE, Giudice LC, Lessey BA. Progesterone resistance in PCOS endometrium: a microarray analysis in clomiphene citrate-treated and artificial menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(6):1737–46. doi: 10.1210/jc.2010-2600.
112. Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Nyegaard M, Nezhat CR, Lessey BA, Giudice LC. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology*. 2007;148(8):3814–26. doi: 10.1210/en.2006-1692.
113. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA, Giudice LC. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology*. 2003;144(7):2870–81. doi: 10.1210/en.2003-0043.
114. Tamareis JS, Irwin JC, Goldfien GA, Rabban JT, Burney RO, Nezhat C, DePaolo LV, Giudice LC. Molecular classification of endometriosis and disease stage using high-dimensional genomic data. *Endocrinology*. 2014;155(12):4986–99. doi: 10.1210/en.2014-1490.
115. Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A, Simón C. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril*. 2011;95(1):50–60. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.063.
116. Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, Yuan L, Fritz MA, Lessey B. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(9):871–9. doi: 10.1093/molehr/8.9.871.
117. Riesewijk A, Martín J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosselman S, Simón C. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod*. 2003;9(5):253–64. doi: 10.1093/molehr/gag037.
118. Blesa D, Ruiz-Alonso M, Simón C. Clinical management of endometrial receptivity. *Semin Reprod Med*. 2014;32(5):410–3. doi: 10.1055/s-0034-1376360.
119. Ruiz-Alonso M, Galindo N, Pellicer A, Simón C. What a difference two days make: "personalized" embryo transfer (pET) paradigm: a case report and pilot study. *Hum Reprod*. 2014;29(6):1244–7. doi: 10.1093/humrep/deu070.
120. Díaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Bosch N, Martínez-Conejero JA, Alamá P, Garrido N, Pellicer A, Simón C. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. *Fertil Steril*. 2013;99(2):508–17. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.09.046.
121. Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, Bocca S, Oehninger S. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod*. 2005;20(8):2104–17. doi: 10.1093/humrep/dei051.
122. Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum Reprod Update*. 2007;13(1):77–86. doi: 10.1093/humupd/dml046.
123. Horcajadas JA, Riesewijk A, Polman J, van Os R, Pellicer A, Mosselman S, Simón C. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod*. 2005;11(3):195–205. doi: 10.1093/molehr/gah150.
124. Horcajadas JA, Sharkey AM, Catalano RD, Sherwin JR, Domínguez F, Burgos LA, Castro A, Peraza MR, Pellicer A, Simón C. Effect of an intra-uterine device on the gene expression profile of the endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):3199–207. doi: 10.1210/jc.2006-0430.
125. Arimoto T, Katagiri T, Oda K, Tsunoda T, Yasugi T, Osuga Y, Yoshikawa H, Nishii O, Yano T, Taketani Y, Nakamura Y. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis. *Int J Oncol*. 2003;22(3):551–60. doi: 10.3892/ijo.22.3.551.
126. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sarrió D, Sánchez C, Cassia R, Prat J, Herman JG, Esteller M, Matías-Guiu X, Palacios J. Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. *J Pathol*. 2003;199(4):471–8. doi: 10.1002/path.1310.
127. Enciso M, Carrascosa JP, Sarasa J, Martínez-Ortiz PA, Munné S, Horcajadas JA, Aizpurua J. Development of a new comprehensive and reliable endometrial receptivity map (ER Map/



- ER Grade) based on RT-qPCR gene expression analysis. *Hum Reprod.* 2018;33(2):220–8. doi: 10.1093/humrep/dex370.
128. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(2):215–33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
129. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet.* 2015;16(7):421–33. doi: 10.1038/nrg3965.
130. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004;431(7006):350–5. doi: 10.1038/nature02871.
131. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell.* 2018;173(1):20–51. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006.
132. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(9):2999–3004. doi: 10.1073/pnas.0307323101.
133. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(32):11755–60. doi: 10.1073/pnas.0404432101.
134. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834–8. doi: 10.1038/nature03702.

In search for an ideal marker of endometrial receptivity: from histology to comprehensive molecular genetics-based approaches

M.V. Kibanov¹ • G.M. Makhmudova¹ • Ya.A. Gokhberg¹

Background: Despite significant improvements in the efficiency of assisted reproductive technologies (ART) for the past 10 years, proportion of unsuccessful cycles still remains significant and can reach up to 40%. Impairment of embryonic implantation is considered as one of the possible causes for low ART efficiency. Implantation failure may be a consequence of a shift in the “window of implantation”, i.e. the period of a cycle when endometrium is most receptive and ready for embryo implantation. Several methods have been developed to evaluate endometrial receptivity, but their accuracy and efficiency are quite different. **Aim:** Review and efficiency evaluation of the methods used for endometrial receptivity assessment and the window of implantation determination. **Methods:** We performed a comprehensive literature search (September 2018) with the key words “endometrial receptivity”, “endometrial receptivity evaluation”, “implantation window”, “window of implantation”, “pinopodes” from PubMed and E-library (Russian) databases. One hundred and thirty four (134) publications were selected for the analysis, including 101 original papers and 33 literature reviews. **Results:** The methods of conventional histology, scanning electronic microscopy, immunohistochemistry, as well as techniques

based on the measurement of prostaglandin levels in endometrial fluid and mRNA profiling in an endometrium biopsy sample to assess endometrial receptivity are reviewed. The issue of a search for an ideal endometrial receptivity marker is discussed. **Conclusion:** At present, the most efficient and accurate methods to diagnose the window of implantation are those based on the mRNA profile assessment of an endometrial tissue sample. Analysis of mRNAs allows not only the accurate diagnosis of endometrial receptivity at the time of biopsy to be determined, but also the window of implantation shift to earlier or later periods to be reliably predicted.

Key words: endometrial receptivity, implantation window, window of implantation, pinopodes

For citation: Kibanov MV, Makhmudova GM, Gokhberg YaA. In search for an ideal marker of endometrial receptivity: from histology to comprehensive molecular genetics-based approaches. *Almanac of Clinical Medicine.* 2019;47(1):12–25. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-005.

Received 30 October 2018; accepted 22 January 2019; published 07 February 2019

Mikhail V. Kibanov – PhD (in Biol.), Biologist, Laboratory of Reproductive Genetics¹
✉ 15/1 Volochaevskaya ul., Moscow, 111033, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 234 42 42. E-mail: mkibanov@gmail.com

Gulnora M. Makhmudova – MD, PhD, Professor, Head Physician, Head of the Reproductive and Gynecology Department¹

Yael A. Gokhberg – Postgraduate Student¹

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

¹Yauza Medical Center; 15/1 Volochaevskaya ul., Moscow, 111033, Russian Federation



Оригинальная статья

Состояние репродуктивной системы и алгоритм решения вопроса деторождения у мужчин с муковисцидозом

Репина С.А.¹ • Красовский С.А.^{1,2} • Шмарина Г.В.¹ • Штаут М.И.¹ • Жекайте Е.К.^{1,3} •
Воронкова А.Ю.^{1,3} • Шерман В.Д.^{1,3} • Кондратьева Е.И.^{1,3} • Черных В.Б.^{1,4}

Репина Светлана Афанасьевна – врач-генетик, отдел организации медицинской помощи¹

✉ 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1, Российская Федерация. Тел.: +7 (499) 324 70 16.
E-mail: repina@med-gen.ru

Красовский Станислав Александрович – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., научно-клинический отдел муковисцидоза¹; лаборатория муковисцидоза²

Шмарина Галина Васильевна – канд. мед. наук, вед. науч. сотр., лаборатория молекулярной биологии¹

Штаут Мария Имреевна – науч. сотр., лаборатория генетики нарушений репродукции¹

Жекайте Елена Кястутисовна – науч. сотр., научно-клинический отдел муковисцидоза¹; врач-педиатр отделения муковисцидоза³

Воронкова Анна Юрьевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., научно-клинический отдел муковисцидоза¹; врач-педиатр отделения муковисцидоза³

Шерман Виктория Давидовна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., научно-клинический отдел муковисцидоза¹; врач-педиатр отделения муковисцидоза³

Кондратьева Елена Ивановна – д-р мед. наук, профессор, заведующая научно-клиническим отделом муковисцидоза¹; заведующая отделением муковисцидоза³

Черных Вячеслав Борисович – д-р мед. наук, руководитель лаборатории генетики нарушений репродукции¹; доцент кафедры молекулярной и клеточной генетики медико-биологического факультета⁴

Актуальность. Муковисцидоз (МВ) – частое наследственное заболевание, обусловленное мутациями в гене *CFTR*, характеризующееся прогрессирующим течением и мультисистемным поражением (в первую очередь пищеварительной и/или легочной систем). У большинства мужчин с МВ диагностируют бесплодие. С появлением новых возможностей терапии увеличилась продолжительность жизни при МВ, что актуализировало вопросы репродукции.

Цель – комплексная оценка состояния репродуктивной системы и фертильности у мужчин с муковисцидозом, а также совершенствование тактики решения вопросов репродукции.

Материал и методы. В когортное проспективное исследование в период с 2006 по 2018 г. включен 81 российский неродственный мужчина в возрасте от 15 до 69 лет (средний возраст $25,6 \pm 7,9$ года) с подтвержденным диагнозом МВ, из них 42 с легочной (Е84.0) и 39 со смешанной (Е84.8) формой МВ. Выполнено клиническое, андрологическое и лабораторно-инструментальное обследование (ультразвуковое исследование органов мошонки, стандартное и биохимическое спермиологическое исследование эякулята и гормональное исследование).

Результаты. Выявлена гетерогенность нарушений репродуктивной системы и сперматологических изменений при МВ: от сохранной фертильности до бесплодия. Отмечены следующие андрологические нарушения: позднее наступление пубертата (48%), урологическая патология (26%), одно-/двусторонняя гипоплазия яичек (42%), диффузные изменения и кисты придатка яичка (70%), диффузные изменения/кальцинаты предстательной железы (50%), сниженная концентрация тестостерона (24,2%). Азооспермия диагностирована у 87,5% пациентов. Умеренно тяжелые или «легкие» формы патозооспермии, представленные олиго-/астено-/тератозооспермией, регистрировали у 11,1%, нормозооспермию – у 1,4% пациентов. Между группами пациентов с легочной и смешанной формой МВ обнаружены статистически значимые отличия по объему эякулята ($1,4 \pm 1,5$ против $0,6 \pm 0,5$ мл; $p = 0,006$), pH эякулята ($6,7 \pm 0,7$ против $6,1 \pm 0,4$ ед.; $p < 0,0001$) и концентрации сперматозоидов ($19,6 \pm 56$ против

$0,001 \pm 0,008$ млн/мл; $p = 0,011$). Нормальный объем эякулята чаще отмечали (21,5 против 14,7%; $p > 0,05$) у пациентов в возрасте до 25 лет. У 71,4% пациентов, имеющих генетический вариант $3849+10\text{kbC} \rightarrow \text{T}$ (с.3718-2477C>T), выявлено сохранение проходимости семявыносящих путей. Обнаружено статистически значимое различие ($p < 0,00001$) по частоте генетического варианта $3849+10\text{kbC} \rightarrow \text{T}$ гена *CFTR* между мужчинами с обструкцией (9,5%) и без обструкции (93,8%) семявыносящих путей. Разработан алгоритм решения проблемы бесплодия (в том числе с помощью методов вспомогательных репродуктивных технологий) у мужчин с МВ в зависимости от статуса фертильности/наличия и формы патозооспермии и некоторых других факторов, влияющих на наступление беременности и риск МВ у потомства, а также предложены практические рекомендации по андрологическому обследованию и сохранению репродуктивного здоровья и планированию деторождения. **Заключение.** Пациенты мужского пола с МВ нуждаются в комплексном обследовании репродуктивной системы. Прогноз в отношении репродуктивной функции, тактика сохранения репродуктивного здоровья и решение вопроса о деторождении зависит от формы МВ, генотипа по гену *CFTR*, сперматологических нарушений и возраста пациента. Легочная форма, генетический вариант $3849+10\text{kbC} \rightarrow \text{T}$ (с.3718-2477C>T) гена *CFTR* и молодой возраст относятся к факторам возможного сохранения проходимости семявыносящих путей и фертильности у мужчин с МВ.

Ключевые слова: муковисцидоз, ген *CFTR*, мужское бесплодие, обструктивная азооспермия

Для цитирования: Репина СА, Красовский СА, Шмарина ГВ, Штаут МИ, Жекайте ЕК, Воронкова АЮ, Шерман ВД, Кондратьева ЕИ, Черных ВБ. Состояние репродуктивной системы и алгоритм решения вопроса деторождения у мужчин с муковисцидозом. Альманах клинической медицины. 2019;47(1):26–37. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-001.

Поступила 12.10.2018; принята к публикации 11.01.2019; опубликована 31.01.2019

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1, Российская Федерация

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства»; 105077, г. Москва, ул. 11-я Парковая, 32/4, Российская Федерация

³ ГБУЗ МО «Московский областной консультативно-диагностический центр для детей»; 141009, Московская область, г. Мытищи, ул. Коминтерна, 24а/1, Российская Федерация

⁴ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России; 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1, Российская Федерация



Муковисцидоз (МВ) – одно из наиболее частых моногенных заболеваний в европейских популяциях. В европейской части Российской Федерации его частота составляет около 1:10 000 [1]. Заболевание характеризуется прогрессирующим течением с поражением различных органов и систем, включая репродуктивную систему. Согласно современной классификации выделяют две его формы: легочную (МВ с сохранной функцией поджелудочной железы, E84.0) и смешанную (МВ с панкреатической недостаточностью с осложнениями и без них, E84.8) [1].

Причиной развития МВ выступают мутации гена *CFTR* (англ. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), кодирующего белок – муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости [2–6]. По тяжести клинических проявлений мутации в гене *CFTR* подразделяют на «тяжелые» (с нарушением внешнесекреторной функции поджелудочной железы) и «мягкие». Наиболее распространенным патогенным вариантом гена *CFTR* признан F508del (c.1521_1523delCTT), в России его частота варьирует в диапазоне 33,8–53,5% от общего числа аллелей мутантных хромосом [1, 3, 7, 8]. Генетический вариант 3849+10kbC->T (c.3718-2477C>T) относится к «мягким», его частота в России равняется 1,7–3,2% среди всех патогенных вариантов гена *CFTR* [7–9], у взрослых пациентов с МВ этот показатель достигает 5,33% и занимает третье место после F508del (c.1521_1523delCTT) и CFTRdele2,3 (c.54-5940_273+10250del21kb) [1]. У мужчин, являющихся компаунд-гетерозиготами по данному патогенному варианту в сочетании с мутацией гена *CFTR*, в том числе с «тяжелой», может быть сохранена проходимость семявыносящих путей и репродуктивная функция [9–14].

У большинства мужчин с МВ диагностируют бесплодие, что в первую очередь связано с двусторонним нарушением проходимости семявыносящих путей и, как следствие, обструктивной азооспермией. Помимо этого у пациентов с МВ нарушение фертильности может быть обусловлено различными факторами, имеющими широкий этиологический спектр [10, 15–17], как то: негативными эффектами, вызванными нарушением функции белка МВТР/мутациями гена *CFTR*, на репродуктивную систему; отрицательными воздействиями от поражения экстрагенитальных органов и систем; побочными эффектами от приема лекарственных препаратов (антибиотики, гормональные препараты и др.); этиопатогенетически несвязанными с МВ причинами

и факторами, влияющими на репродуктивную систему.

У мужчин с МВ отмечаются различные нарушения репродуктивной системы: задержка полового созревания, бесплодие, гипогонадизм и гипоплазия тестикул и семенных пузырьков, нарушение проходимости семявыносящих путей и функции придаточных половых желез [10, 18–20]. Основным показателем состояния репродуктивной системы – фертильности. Ее можно оценить по наличию беременности у супруги в анамнезе и/или по показателям спермограммы (отсутствию тяжелых форм патозооспермии, в частности азооспермии). В 97–98% случаев мужчины, страдающие МВ, бесплодны вследствие двустороннего отсутствия/аплазии семявыносящих протоков – vas deferens, семенных пузырьков, что проявляется обструктивной азооспермией [10, 16]. Синдром CBAVD (англ. congenital bilateral absence of the vas deferens – врожденное двустороннее отсутствие семявыносящего протока) может выступать как одно из проявлений классической или атипичных форм МВ, то есть встречается изолированно от других симптомов МВ («генитальная» форма МВ), или как самостоятельное заболевание [10, 21–22]. У мужчин мутации гена *CFTR* могут быть причиной снижения количества и качества мужских гамет [23–25].

В связи с недостаточной изученностью вопросов, касающихся нарушений фертильности и патологии органов репродуктивной системы у мужчин с МВ, актуальным представляется выявление клинических, генетических, спермиологических корреляций у пациентов с МВ. Алгоритмы, тактика ведения и решение проблем репродукции у таких пациентов нуждаются в разработке.

Цель настоящей работы – оценить состояние репродуктивной системы и фертильности у мужчин в зависимости от формы МВ, генотипа по гену *CFTR* и возраста пациентов, а также совершенствование тактики решения вопросов репродукции.

Материал и методы

В когортное проспективное исследование включали пациентов мужского пола в возрасте от 15 лет и старше с подтвержденным диагнозом МВ или подозрением на МВ, госпитализированные в период с 2006 по 2018 г. в ГБУЗ «ГКБ им. Д.Д. Плетнева ДЗМ» (ГКБ № 57 ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России) и направленные на обследование в ФГБНУ «МГНЦ». Критериями не включения были возраст пациента менее 15 лет, отсутствие возможности самостоятельно приехать в ФГБНУ «МГНЦ», неспособность сдать биоматериал для спермиологического исследования. Пациент

исключался из исследования, если в его ходе диагноз МВ не подтверждался.

Работа выполнена в период с 2015 по 2018 г. на кафедре молекулярной и клеточной генетики медико-биологического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России на базе ФГБНУ «МГНЦ». Проведение настоящего исследования одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол № 152 от 15 февраля 2016 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на проведение исследования (в случае несовершеннолетних информированное согласие получено у их родителей).

Всего обследован 81 российский неродственный мужчина в возрасте от 15 до 69 лет (средний возраст $25,6 \pm 7,9$ года) с подтвержденным диагнозом МВ, из них 42 пациента имели легочную форму МВ и 39 – смешанную. Всем пациентам проведено клиническое обследование, выполнено ультразвуковое исследование (УЗИ) органов мочеполовой системы, стандартное спермиологическое исследование и биохимический анализ эякулята, определение уровня гормонов в сыворотке крови.

Клинико-генеалогический метод. Клиническое обследование включало анамнестическое и генеалогическое исследование и осмотр. На каждого больного заполняли генетическую карту со специально разработанным для исследования опросным листом, состоявшим из 33 вопросов, касающихся анамнеза; выясняли наличие у пациентов вредных привычек, негативных факторов окружающей среды и профессиональных вредностей, а также андрологический статус. Пациентам проводили антропометрию с измерением роста и веса и последующим определением индекса массы тела (ИМТ) по формуле: вес (кг)/рост (м)². ИМТ в диапазоне от 18,5 до 24,99 принимали за норму. Степень зрелости полового развития оценивали согласно критериям, предложенным Таннером [26].

УЗИ органов мочеполовой системы. УЗИ яичек и их придатков выполняли при помощи ультразвукового аппарата Aloka ProSound SSD-α 10 (Hitachi Aloka, Япония) с использованием линейного датчика с частотой 10 МГц. Оценивали морфологическое состояние органов мошонки и визуализацию вен семенного канатика с измерением их диаметра, определяли размеры, объем, эхоструктуру яичка и придатка. За нормальный размер яичка принимали объем 12 см³ и более. Трансректальное ультразвуковое сканирование (ТРУЗИ) предстательной железы и семенных пузырьков выполняли при помощи аппарата Medison SA 9900 (Южная Корея) с использованием линейного датчика Prime

5–12 МГц. При ультразвуковом сканировании определяли объем, структуру и симметричность долей, дифференцировку структурных элементов железы, состояние семенных пузырьков, внутритканевой кровотоков.

Спермиологическое исследование и биохимический анализ эякулята (фруктоза, лимонная кислота, α-гликозидаза) выполняли согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (2010) [27].

Определение уровня гормонов в сыворотке крови. Концентрацию тестостерона в плазме определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора Diagnostic Biochem Canada Inc. (Канада) согласно рекомендациям производителя. Гипогонадизм диагностировали при снижении уровня общего тестостерона крови менее 3 нг/мл.

Молекулярно-генетическое исследование гена CFTR выполняли на геномной ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови. На первом этапе анализировали частые мутации, в случае не обнаружения мутации проводили секвенирование ДНК по Сэнгеру или с использованием технологии массового параллельного секвенирования.

В качестве *основного показателя мужской фертильности при МВ* оценивали наличие/отсутствие сперматозоидов в эякуляте (наличие/отсутствие азооспермии), а также определяли такие спермиологические показатели, как объем эякулята, концентрация и общее количество сперматозоидов, уровень pH и фруктозы. Данный показатель оценки фертильности признан безопасным, эффективным и экономически приемлемым.

Дополнительными ожидаемыми результатами исследования были гетерогенность нарушения фертильности и поражения органов репродуктивной системы у мужчин с МВ, зависимость частоты и тяжести нарушений от формы МВ и генотипа по гену CFTR. Среди других показателей отметим изменения гормонального статуса (снижение тестостерона), морфологические и структурные изменения при УЗИ органов мошонки (кисты яичка и придатка).

Анализ в подгруппах. В зависимости от сохранности функции поджелудочной железы (формы МВ) обследованные пациенты разделены на две группы: с легочной (n=42) и смешанной (n=39) формами МВ. Для оценки влияния возрастного фактора проводили сравнительный анализ состояния репродуктивной системы и ее нарушений в возрастных группах «до 25 лет» и «25 лет и старше». При исследовании гено-фенотипических корреляций проведен сравнительный анализ



нарушений фертильности у пациентов с МВ с наличием генетического варианта 3849+10kbC>T и пациентов с МВ, не имеющих данной мутации в генотипе.

Статистический анализ результатов выполняли с использованием программы StatSoft Statistica 8 (StatSoft inc., США). Количественные показатели представлены в виде средних арифметических значений и стандартных отклонений ($M \pm SD$). Сравнение количественных данных в двух группах проводили с использованием U-критерия Манна – Уитни. Качественные показатели сравнивали с помощью точного критерия Фишера. Статистически значимым был принят уровень вероятности ошибки первого рода $p < 0,05$.

Результаты

Участники исследования

В группе пациентов с легочной формой МВ ($n=42$) средний возраст составил $27,1 \pm 9,8$ года, со смешанной формой – $24,1 \pm 4,7$. Статистически значимых различий по данному показателю между группами не выявлено ($p=0,352$, U-критерий Манна – Уитни).

На момент обследования в зарегистрированном или гражданском браке состояли 52% (39 из 75) взрослых пациентов. У супруг 8 пациентов беременность наступила самостоятельно, родились здоровые (без МВ) дети. У 4 пациентов (3 из них с легочной формой МВ), имевших азоосперию, проведена успешная тестикулярная биопсия, в результате программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО/ICSI) у их супруг наступила беременность и родились здоровые (без МВ) дети. Беременность наступила у супруги еще одного пациента со смешанной формой азооспермии после проведения процедуры ЭКО/ICSI.

Сперматологическое обследование

Стандартное сперматологическое исследование выполнено у 72 пациентов с МВ. Тяжелые формы патозооспермии, представленные азооспермией / криптозооспермией, обнаружены у 87,5% (63 из 72) обследованных мужчин с МВ. Нормозооспермия или «мягкие» / «умеренно тяжелые» формы патозооспермии, представленные олиго- / астено- / тератозооспермией, выявлены у 9 (12,5%) пациентов. Олигоспермия (объем эякулята менее 1,5 мл, то есть ниже нормативных показателей) диагностирована у 57 (80,3%) пациентов. Кислотность эякулята в 82,7% образцах составляла меньше нормы ($pH < 7,2$). Повышенная вязкость (от 30 мм и более) определена в 23% образцах семенной жидкости. Концентрация лейкоцитов в 79

(96,3%) образцах эякулята находилась в пределах нормативных значений.

Биохимическое исследование семенной жидкости выполнено у 27 пациентов, в том числе у 12 мужчин с легочной и у 15 со смешанной формой МВ. У остальных пациентов биохимическое исследование не проведено вследствие недоступности биологического материала или малого объема эякулята. Низкое количество фруктозы, α -глюкозидазы и лимонной кислоты обнаружено в 96, 73 и 50% образцов семенной жидкости соответственно.

Половой статус

У всех обследованных мужчин с МВ развитие половых органов соответствовало возрасту и мужскому полу. Признаков врожденных пороков развития наружных половых органов отмечено не было. Средний возраст наступления пубертата составил $15 \pm 1,5$ года, у 48% обследованных выявлено позднее начало полового созревания (14–16 лет). Задержку пубертата чаще регистрировали при смешанной (57%), чем при легочной (31%) форме МВ.

У 21 (25,6%) пациента в анамнезе были паховая грыжа ($n=6$), крипторхизм ($n=1$), крипторхизм и паховая грыжа ($n=1$), гидроцеле и паховая грыжа ($n=2$), выраженная гипоплазия яичек ($n=1$), перекут яичка ($n=1$), фимоз ($n=2$), гидроцеле ($n=3$), варикоцеле ($n=3$), фимоз и варикоцеле ($n=1$).

Молекулярно-генетическое исследование гена CFTR

Молекулярно-генетическое исследование выполнено у 81 пациента. Патогенные варианты гена CFTR обнаружены в 162 из 162 (100%) проанализированных аллелей. Выявлены следующие патогенные варианты гена CFTR: F508del (c.1521_1523delCTT; 48%), 3849+10kbC>T (c.3718-2477C>T; 3%), CFTRdele2,3 (c.54-5940_273+10250del21kb; 6,2%), E92K (c.274G>A; 4,9%), 2789+5G>A (c.2657+5G>A; 2,5%), L138ins (c.413_415dupTAC; 1,9%), N1303K (c.3909C>G; 1,9%), W1282X (c.3846G>A; 1,9%), 1677delTA (c.1545_1546delTA; 1,9%) и 3272-16T>A (c.3140-16T>A; 1,9%). Спектр и частота генетических вариантов исследованной выборки пациентов в целом соответствовали взрослым российским больным с МВ [1].

Изменения органов репродуктивной системы

Данные ультразвукового обследования органов мошонки, семенных пузырьков и предстательной железы. УЗИ органов мошонки



проведено у 43 пациентов, ТРУЗИ – у 2, абдоминальное УЗИ – у 8. Средний объем яичек составил $26,2 \pm 8,2$ см³. Одно- или двусторонняя гипоплазия яичек диагностирована у 18 (42%) пациентов. Морфологические изменения органов мошонки отмечены у 30 из 43 (70%) обследованных. По данным УЗИ органов мошонки выявлены диффузные изменения и кисты придатка яичка (53,5%), объемные образования яичка (9,3%), другая патология органов мошонки (варикоцеле, гидроцеле, выраженная гипоплазия яичка с нарушением его структуры) (7%). При ТРУЗИ и УЗИ предстательной железы у 5 из 10 обследованных обнаружены кальцинаты / петрификаты, у 3 из 10 – диффузные изменения простаты. У обоих мужчин, которым выполнено ТРУЗИ семенных пузырьков, наблюдалось уменьшение их размеров (гипоплазия) без изменения структуры.

Уровень общего тестостерона. Исследование уровня общего тестостерона в сыворотке крови выполнено у 62 пациентов, в том числе у 24 с легочной и 38 со смешанной формой МВ. Средний уровень тестостерона составил $4,6 \pm 1,9$ нг/мл (норма 3–12 нг/мл). Нормальный показатель общего тестостерона был у 47 (75,8%) пациентов, сниженный – у 15 (24,2%).

Состояние репродуктивной системы в зависимости от формы муковисцидоза, *CFTR*-генотипа и возраста

Обнаружено существенное различие по структуре сперматологических диагнозов между пациентами с разными формами МВ. Олигоспермия, низкие значения рН (менее 7,2), отсутствие сперматозоидов или их крайне низкая концентрация

(менее 0,5 млн/мл) в эякуляте статистически значимо ($p < 0,05$) чаще регистрировали в группе мужчин со смешанной формой МВ (табл. 1).

При сравнении показателей возраста наступления пубертата, ИМТ, биохимических маркеров семенной жидкости, объема тестикул, уровня тестостерона и частоты сниженного его уровня статистически значимых различий между группами пациентов с легочной и смешанной формой МВ не выявлено ($p > 0,05$). Изменения объема тестикул и структурные изменения органов мошонки обнаружены у 92,6% пациентов со смешанной формой МВ и 81,3% больных с легочной формой, однако различия не достигли уровня статистической значимости ($p = 0,82$).

В обследованной выборке 21 пациент был носителем генетического варианта $3849+10kbC>T$, характерного для легочной формы МВ. У 8 из 21 (38%) пациента с легочной формой МВ, являвшихся компаунд-гетерозиготами по патогенному варианту $3849+10kbC>T$, в анамнезе отмечено наступление беременности у партнерш, что свидетельствует о сохранной ранее фертильности. Таким образом, у 71,4% обследованных нами мужчин с МВ, имеющих генетический вариант $3849+10kbC>T$, зарегистрировано сохранение проходимости семявыносящих путей (беременности у партнерш в анамнезе, отсутствие азооспермии при сперматологическом обследовании). Выявлено статистически значимое различие ($p < 0,00001$) по частоте патогенного варианта $3849+10kbC>T$ между мужчинами с обструкцией семявыносящих путей (9,5%) и без обструкции (93,8%).

Для оценки влияния возрастного фактора на состояние репродуктивной системы исследованную выборку пациентов, обследованных сперматологически, разделили на две возрастные группы: «до 25 лет» ($n = 38$) и «25 лет и старше» ($n = 34$). У мужчин более старшего возраста наблюдалась тенденция к более выраженным сперматологическим нарушениям (нормальный объем эякулята выявлен у 8 (21,1%) и 5 (14,7%) пациентов 1-й и 2-й групп соответственно), однако межгрупповые различия не были статистически значимыми ($p > 0,05$).

Обсуждение

Выбор цели настоящего исследования обусловлен сохранностью фертильности у некоторых мужчин с МВ, а также отсутствием тактики репродуктологического обследования и решения проблем деторождения у мужчин с МВ в зависимости от формы заболевания, генотипа по гену *CFTR*, статуса фертильности и сперматологических

Таблица 1. Сперматологические показатели, по которым выявлены статистически значимые различия между группами пациентов с легочной и смешанной формой муковисцидоза

Параметр	Форма муковисцидоза		Значение p
	легочная ($n = 35$)	смешанная ($n = 37$)	
Частота азооспермии / криптозооспермии, %	76,5	100	0,0008*
Объем эякулята ($M \pm SD$), мл; $N \geq 1,5$ мл	$1,4 \pm 1,5$	$0,6 \pm 0,5$	0,0006**
Концентрация сперматозоидов ($M \pm SD$), млн/мл; $N \geq 15$ млн/мл	$19,6 \pm 56$	$0,001 \pm 0,008$	0,012**
рН эякулята ($M \pm SD$); $N = 7,2-7,8$	$6,7 \pm 0,7$	$6,1 \pm 0,4$	$< 0,0001$ **

N – норма

* Точный критерий Фишера

** U-критерий Манна – Уитни



изменений. В нашей работе мы впервые оценили состояние репродуктивной системы и фертильности у мужчин с МВ на крупной выборке ($n = 81$).

Мы выявили гетерогенность андрологических и сперматологических нарушений у больных МВ. Показано, что легочная форма МВ характеризуется различными формами патозооспермии (87,5% пациентов имели азооспермию, 13,5% – другие формы патозооспермии или нормозооспермию). У 100% мужчин со смешанной формой МВ диагностирована обструктивная азооспермия. Характерными сперматологическими признаками нарушения фертильности у мужчин с МВ были азооспермия, олигоспермия, низкие значения pH и фруктозы эякулята. Все пациенты с сохраненной проходимостью семявыносящих протоков имели в генотипе патогенный вариант $3849+10kbC>T$. В предыдущих исследованиях отмечено сохранение фертильности у некоторых пациентов с МВ, в частности, имеющих в генотипе данный патогенный вариант, однако нами впервые показано на большой выборке пациентов с комплексным обследованием репродуктивной системы, что у носителей патогенного варианта $3849+10kbC>T$ фертильность сохранена в 71,4%.

Среди ограничений настоящего исследования можно назвать относительно небольшую выборку пациентов при сравнении двух групп в зависимости от формы МВ: легочной ($n = 42$) и смешанной ($n = 39$). Не всем пациентам было проведено биохимическое исследование эякулята вследствие малого объема семенной жидкости. На выводы могло повлиять количество носителей патогенного варианта $3849+10kbC>T$ в исследованной выборке и в подгруппе с легочной формой МВ, однако частота данного варианта примерно соответствовала таковой среди взрослых российских пациентов, согласно Регистру больных МВ в Российской Федерации (2016) [1].

Полученные нами результаты и данные других исследований свидетельствуют о том, что у большинства мужчин с МВ нарушена фертильность вследствие азооспермии. Бесплодие у мужчин с МВ обычно вызвано обструкцией семявыносящих протоков и характеризуется азооспермией, олигоспермией (объем эякулята менее 1,5 мл), pH менее 7,0 и низким или неопределяемым значением фруктозы в эякуляте [16, 28–30]. Выявленное различие в частоте азооспермии у пациентов с МВ между обследованной нами выборкой (87,5%) и данными литературы (98%), возможно, обусловлено особенностями нашей выборки: молодым возрастом многих пациентов, относительно более частой представленностью патогенного варианта гена *CFTR*

$3849+10kbC>T$. Следует отметить, что бесплодие может быть и у мужчин с МВ без азооспермии/обструкции семявыносящих путей. Нарушение репродуктивной функции у них может быть следствием дефектов сперматогенеза, снижения количественных и/или качественных показателей сперматозоидов в семенной жидкости или других факторов, влияющих на мужскую фертильность.

Мы показали, что на сохранение проходимостью семявыносящих путей существенно влияет клиническая форма МВ. Так, пациенты со смешанной формой МВ (с поражением поджелудочной железы) имели азооспермию/криптозооспермию. Другие сперматологические заключения отмечены только у пациентов с легочной формой МВ. А наиболее «мягкие» формы патозооспермии или нормозооспермии наблюдались лишь у пациентов, имеющих генетический вариант $3849+10kbC>T$. Данный патогенный вариант характерен для легочной формы МВ, он редко встречается при синдроме двусторонней аплазии семявыносящих протоков (CBAVD), в большинстве случаев обусловлен мутациями гена *CFTR*. Наличие единичных сперматозоидов (криптозооспермия) у многих пациентов с МВ свидетельствует о том, что в патогенезе поражения семявыносящих протоков при МВ имеет место не агенезия, а аплазия семявыносящих протоков с потерей их проходимостью. В работах других авторов обнаружена сохранность семенных пузырьков у мальчиков с МВ, в то время как аплазия/гипоплазия семявыносящих протоков и их производных – семенных пузырьков – присутствует у 97–98% взрослых мужчин с МВ и у 80% пациентов с CBAVD [18, 31, 32]. Вместе с тем остается открытым вопрос о таких факторах, как механизм и динамика аплазии семявыносящих протоков и семенных пузырьков.

Отсутствие аномалий формирования пола у пациентов с МВ говорит о том, что мутации в гене *CFTR* не влияют на дифференцировку пола и морфогенез органов репродуктивной системы [10, 23]. Частыми изменениями при МВ являются одно-/двусторонняя гипоплазия яичек, морфологические изменения органов мошонки (диффузные изменения придатков и кисты придатков и/или яичек). В ряде публикаций [31] описаны изменения размеров и структуры органов мошонки у взрослых мужчин с МВ, однако другие авторы [28] регистрировали нормальный объем яичек. Одно из негативных воздействий МВ на половую систему у мальчиков-подростков – задержка полового созревания в среднем на 1–1,5 года [18]. В нашем исследовании задержка



Таблица 2. Методы исследования состояния репродуктивной системы у мужчин с муковисцидозом

Метод	Условия и периодичность обследования	Особые указания
Клиническое обследование		
Анамнестическое и генеалогическое исследование, осмотр	Подростки в возрасте от 14 лет (с пубертата)	Для несовершеннолетних – с письменного согласия родителя(ей)
Лабораторно-инструментальное обследование		
Ультразвуковое исследование органов мошонки	При признаках гипоплазии яичек, структурных изменений органов мошонки – контрольное ультразвуковое исследование в динамике, 1 раз в год	При наличии объемных образований в мошонке: магнитно-резонансная томография мошонки, онкомаркеры (альфа-фетопротеин, хорионический гонадотропин человека, лактатдегидрогеназа), консультация андролога-уролога
Стандартное и биохимическое спермиологическое исследование	Для несовершеннолетних – с письменного согласия родителя(ей). Рекомендованный срок для сдачи анализа – половое воздержание 3–5 дней	При сохранении проходимости семявыносящих протоков – контрольное исследование в динамике, 1 раз в год. В случае ухудшения показателей спермограммы – криоконсервация сперматозоидов
Исследование гормонов (тестостерон) в сыворотке крови	Утром натощак. Повторное исследование в динамике (по мере необходимости)	При гипогонадизме – консультация эндокринолога с решением вопроса о гормонзаместительной терапии

полового созревания наблюдалась не у всех пациентов, а ее встречаемость у мальчиков-подростков с МВ зависела от формы МВ, генотипа (поздний пубертат более характерен для пациентов со смешанной формой МВ), тяжести клинических проявлений МВ, в частности низкого ИМТ (при гипотрофии метаболизм стероидных гормонов замедляется) [10, 18]. Снижение уровня тестостерона отмечено у 28% взрослых мужчин с МВ, не обнаружено корреляции уровня гормонов с низкой массой тела [33]. Вопрос о гормонзаместительной терапии у пациентов с МВ остается открытым.

Очевидно, что возрастной фактор негативно влияет на состояние репродуктивной системы многих пациентов с нарушением фертильности, в том числе у мужчин с МВ. Так, у более молодых мужчин с МВ чаще наблюдали мягкие формы патозооспермии или нормозооспермию, а также нормальный объем эякулята, свидетельствующие о сохранной проходимости семявыносящих путей и секреторной функции половых желез, в частности семенных пузырьков. Негативные изменения в спермограмме в динамике также указывают на ухудшение ее показателей с возрастом [34]. Однако в нашем исследовании различия в объеме эякулята и частоте мягких форм патозооспермии в двух возрастных группах не достигли уровня статистической значимости.

Рекомендации по репродуктологическому обследованию мужчин и мальчиков-подростков с муковисцидозом

Основываясь на собственных данных и результатах исследований других авторов, мы разработали рекомендации по обследованию и клиническому ведению мужчин и мальчиков-подростков с МВ. Таким пациентам с целью оценки органов половой системы и фертильности рекомендуется проведение комплексного обследования состояния репродуктивной системы. Методы, условия и периодичность проведения данного обследования отражены в табл. 2.

Репродуктологическое обследование необходимо проводить у мальчиков-подростков в возрасте 15–18 лет и у молодых мужчин с МВ [21, 28, 30, 35].

Подходы к решению вопроса о репродукции у мужчин с муковисцидозом

Несмотря на высокую частоту нарушения репродуктивной системы и фертильности, многие пациенты с МВ, в том числе мужчины, могут иметь собственное потомство. Пациентам с МВ необходимо рекомендовать раннее решение вопроса репродукции, заблаговременное и по возможности раннее планирование беременности естественным путем или с помощью методов вспомогательных



репродуктивных технологий (при необходимости их применения).

При сохраненной фертильности, с целью профилактики передачи МВ потомству, необходимо рекомендовать использование контрацептивов, своевременное генетическое тестирование супругов на носительство патогенных вариантов гена *CFTR* и медико-генетическое консультирование при планировании беременности. В случае сохранной проходимости семявыносящих путей / отсутствия азооспермии у мужчин и мальчиков-подростков с МВ в репродуктивном плане актуальны криоконсервация и хранение сперматозоидов для последующего их использования в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО / ICSI). Это позволяет сохранить возможность репродукции у мужчин с МВ с помощью ЭКО / ICSI, не прибегая к тестикулярной биопсии.

Супруге больного с МВ при планировании беременности следует выполнить генетическое обследование на носительство патогенных вариантов гена *CFTR*. В случае обнаружения патогенных вариантов необходимо медико-генетическое консультирование и решение вопроса о проведении преимплантационной генетической диагностики МВ. У мужчин с МВ, имеющих нарушение проходимости семявыносящих путей и/или тяжелые формы патозооспермии, в частности азооспермию, решение проблемы деторождения возможно с помощью биопсии тестикул с последующим их использованием для искусственного оплодотворения методом ЭКО / ICSI.

На рисунке представлена схема обследования и тактика решения вопроса репродукции у мужчин с МВ в зависимости от сохранения фертильности и тяжести сперматологических изменений (форм патозооспермии).

Сперматологический анализ – одно из ключевых репродуктологических обследований у мужчин, включая больных МВ. Прогноз возможности деторождения и дальнейшая тактика решения вопроса репродукции могут быть определены уже на основании его результатов. Так, в зависимости от сперматологических изменений (форм патозооспермии или наличия нормозооспермии) пациенты могут быть условно разделены на три группы (см. рисунок). Пациентам, имеющим наиболее тяжелые формы патозооспермии (азооспермию или олигозооспермию тяжелой степени), с целью получения сперматозоидов может быть рекомендовано выполнение тестикулярной биопсии. При обнаружении сперматозоидов, пригодных для оплодотворения, показано их использование в программах ЭКО / ICSI. У пациентов, имеющих патозооспермию,

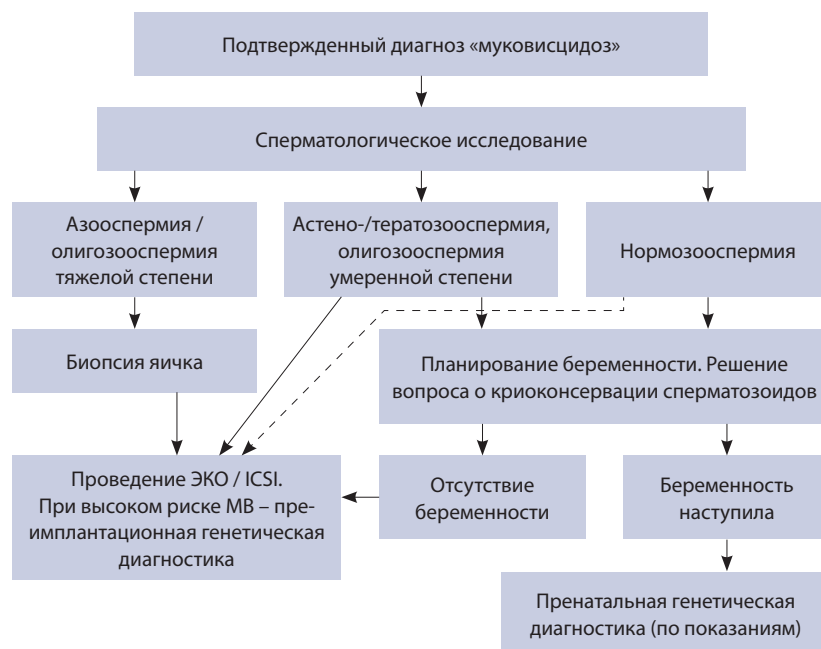


Схема решения вопроса репродукции (в том числе с помощью методов вспомогательных репродуктивных технологий) и планирования дородовой диагностики на муковисцидоз (МВ) у мужчин с МВ в зависимости от состояния фертильности / формы патозооспермии и ряда других факторов, влияющих на наступление беременности и риск МВ у потомства. Пунктирной линией указано проведение программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО / ICSI) у пациентов с нормозооспермией, супруги которых имеют нарушения фертильности и/или являются носителями мутации гена *CFTR* (высокий риск МВ). Преимплантационная и пренатальная диагностика показана при высоком риске МВ у потомства

не связанную с азооспермией / олигозооспермией тяжелой степени, выбор тактики планирования беременности и решения проблемы репродукции определяется исходя из выраженности нарушений репродуктивного здоровья у супругов и наличия показаний для преимплантационной генетической диагностики МВ. При высоком риске МВ у потомства, например, если супруга является носителем мутации гена *CFTR*, независимо от формы патозооспермии или наличия нормозооспермии, а также сохранной фертильности у пациента с МВ рекомендована соответствующая преимплантационная генетическая диагностика. В случае неудачи при получении пригодных гамет, низкого их качества следует рассмотреть вопрос об использовании донорских половых клеток.

Заключение

У большинства мужчин и мальчиков-подростков, страдающих МВ, встречаются различные нарушения органов репродуктивной системы. Основная причина мужского бесплодия при МВ – обструктивная форма азооспермии вследствие



двусторонней аплазии семявыносящих протоков и семенных пузырьков. Среди других андрологических факторов, нарушающих репродуктивное здоровье, следует отметить повышенную частоту гипоплазии и других изменений тестикул, придатков яичка, придаточных половых желез, склонность к развитию гипогонадизма. Ключевым нерешенным моментом следует признать гетерогенность поражения семявыносящих путей при различных генотипах по гену *CFTR*, в том числе при наличии «благоприятного» для сохранения фертильности генетического варианта 3849+10kbC>T, влияние модифицирующих факторов, а также возраста пациента.

Обследование состояния органов репродуктивной системы и оценка фертильности пациентов с МВ должны быть комплексными, а ведение пациентов – мультидисциплинарным (с участием врачей-андрологов/гинекологов, эндокринологов и генетиков). Тактика решения проблемы репродукции зависит от пола, состояния фертильности (обоих супругов), степени сперматологических

нарушений, возраста пациента и статуса носительства патогенных вариантов в гене *CFTR* у супруги. Использование пренатальной и преимплантационной диагностики позволяет осуществлять профилактику рождения больного ребенка у больных МВ и носителей. Мужчинам с МВ необходимо рекомендовать раннее решение вопроса о репродукции, а по возможности – криоконсервацию гамет, что позволяет избежать биопсии яичка и повышать результативность ЭКО.

Разработанные рекомендации по комплексному исследованию репродуктивной системы у мужчин с МВ и алгоритм решения вопроса деторождения внесены в «Национальный консенсус по муковисцидозу» и адресованы врачам разных специальностей, которые осуществляют медицинскую помощь пациентам с МВ, прежде всего генетикам, андрологам, гинекологам, репродуктологам, специалистам в области МВ и вспомогательных репродуктивных технологий. Полученные результаты внедрены в практику ФГБНУ «МГНЦ» и российских медицинских центров по МВ. ©

Дополнительная информация

Финансирование

Исследование выполнено в рамках проведения диссертационной работы, финансирование осуществлялось ФГБНУ «МГНЦ» за счет средств на утвержденную научно-исследовательскую работу.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

С.А. Репина – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, проведение комплексного обследования пациентов, анализ полученных данных, статистическая обработка данных, написание текста; С.А. Красовский – сбор и обработка материала, проведение комплексного обследования пациентов; Г.В. Шмарина – сбор и обработка материала, проведение лабораторного исследования, анализ полученных данных, статистическая обработка данных; М.И. Штаут – сбор и обработка материала, проведение лабораторного исследования; Е.К. Жекайте, В.Д. Шерман и А.Ю. Воронкова – проведение комплексного обследования пациентов; Е.И. Кондратьева – дизайн

исследования, проведение комплексного обследования пациентов, организация проведения обследования; В.Б. Черных – концепция и дизайн исследования, проведение комплексного обследования пациентов, анализ и интерпретация результатов, написание и редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность сотруднику ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» д-ру мед. наук Роману Викторовичу Роживанову (гл. науч. сотр. отделения андрологии и урологии) за проведение ультразвукового исследования, сотрудникам ФГБНУ «МГНЦ» д-ру биол. наук Нике Валентиновне Петровой (вед. науч. сотр. лаборатории генетической эпидемиологии), канд. мед. наук Тагити Аветиковне Адян (науч. сотр. лаборатории ДНК-диагностики) и д-ру биол. наук, профессору РАН Александру Владимировичу Полякову (руководитель лаборатории ДНК-диагностики) за проведение ДНК-диагностики мужчин с муковисцидозом.

Литература

1. Красовский СА, Черняк АВ, Воронкова АЮ, Амелина ЕЛ, Каширская НЮ, Кондратьева ЕИ, Гембицкая ТЕ, ред. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2016 год. М.: Медпрактика-М; 2018. 64 с.
2. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*. 1993;73(7):1251–4. doi: 10.1016/0092-8674(93)90353-R.
3. Капранов НИ, Каширская НЮ, ред. Муковисцидоз. М.: Медпрактика-М; 2014. 672 с.
4. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*. 2008;7(3):179–96. doi: 10.1016/j.jcf.2008.03.009.
5. Pettit RS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-modifying medications: the future of cystic fibrosis treatment. *Ann Pharmacother*. 2012;46(7–8):1065–75. doi: 10.1345/aph.1R076.
6. Michl RK, Tabori H, Hentschel J, Beck JF, Mainz JG. Clinical approach to the diagnosis and treatment of cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Expert Rev Respir Med*. 2016;12:1–10. doi: 10.1080/17476348.2016.1240032.
7. Петрова НВ, Тимковская ЕЕ, Зинченко РА, Гинтер ЕК. Анализ частоты некоторых мутаций в гене CFTR в разных популяциях России. *Медицинская генетика*. 2006;5(2): 28–31.



8. Степанова АА, Красовский СА, Поляков АВ. Информативность поиска 19 частых мутаций в гене CFTR у российских больных муковисцидозом и расчетная частота заболевания в Российской Федерации. *Генетика*. 2016;52(2):231–41.
9. Красовский СА, Петрова НВ, Степанова АА, Усачева МВ, Самойленко ВА, Амелина ЕЛ, Никонова ВС. Клиническое течение заболевания у взрослых больных муковисцидозом – носителей «мягких» мутаций. *Пульмонология*. 2012;(6):5–11. doi: 10.18093/0869-0189-2012-0-6-5-11.
10. Черных ВБ. Ген муковисцидоза и нарушение фертильности у мужчин. *Андрология и генитальная хирургия*. 2010;11(4):23–32.
11. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet*. 2003;67(Pt 5):471–85. doi: 10.1046/j.1469-1809.2003.00028.x.
12. Duguépéroux I, De Braekeleer M. The CFTR 3849+10kbC->T and 2789+5G->A alleles are associated with a mild CF phenotype. *Eur Respir J*. 2005;25(3):468–73. doi: 10.1183/09031936.05.10100004.
13. Feldmann D, Couderc R, Audrezet MP, Ferec C, Bienvenu T, Desgeorges M, Claustres M, Mittre H, Blayau M, Bozon D, Malinge MC, Monnier N, Bonnefont JP, Iron A, Bieth E, Dumur V, Clavel C, Cazeneuve C, Girodon E. CFTR genotypes in patients with normal or borderline sweat chloride levels. *Hum Mutat*. 2003;22(4):340. doi: 10.1002/humu.9183.
14. Mickle JE, Cutting GR. Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. *Med Clin North Am*. 2000;84(3):597–607. doi: 10.1016/S0025-7125(05)70243-1.
15. Черных ВБ, Степанова АА, Бескоровая-ная ТС, Сорокина ТМ, Шилейко ЛВ, Курило ЛФ, Поляков АВ. Частота и спектр мутаций и IVS8-T-полиморфизма гена CFTR среди российских мужчин с бесплодием. *Генетика*. 2010;46(6):844–52.
16. Claustres M. Molecular pathology of the CFTR locus in male infertility. *Reprod Biomed Online*. 2005;10(1):14–41. doi: 10.1016/S1472-6483(10)60801-2.
17. Chen H, Ruan YC, Xu WM, Chen J, Chan HC. Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2012;18(6):703–13. doi: 10.1093/humupd/dms027.
18. Blau H, Freud E, Mussaffi H, Werner M, Konen O, Rathaus V. Urogenital abnormalities in male children with cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 2002;87(2):135–8. doi: 10.1136/ad.87.2.135.
19. Radpour R, Gourabi H, Dizaj AV, Holzgreve W, Zhong XY. Genetic investigations of CFTR mutations in congenital absence of vas deferens, uterus, and vagina as a cause of infertility. *J Androl*. 2008;29(5):506–13. doi: 10.2164/jandrol.108.005074.
20. Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Claustres M, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med*. 1995;332(22):1475–80. doi: 10.1056/NEJM199506013322204.
21. Llabador MA, Pagin A, Lefebvre-Maunoury C, Marcelli F, Leroy-Martin B, Rigot JM, Mitchell V. Congenital bilateral absence of the vas deferens: the impact of spermatogenesis quality on intracytoplasmic sperm injection outcomes in 108 men. *Andrology*. 2015;3(3):473–80. doi: 10.1111/andr.12019.
22. Patat O, Pagin A, Siegfried A, Mitchell V, Chassaing N, Faguer S, Monteil L, Gaston V, Bujan L, Courtade-Saïdi M, Marcelli F, Lalau G, Rigot JM, Mieusset R, Bieth E. Truncating mutations in the adhesion G Protein-Coupled Receptor G2 Gene ADGRG2 Cause an X-linked congenital bilateral absence of vas deferens. *Am J Hum Genet*. 2016;99(2):437–42. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.06.012.
23. Marcorelles P, Gillet D, Friocourt G, Ledé F, Sammaison L, Huguen G, Ferec C. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression in the male excretory duct system during development. *Hum Pathol*. 2012;43(3):390–7. doi: 10.1016/j.humpath.2011.04.031.
24. Fok KL, Chen H, Ruan YC, Chan HC. Novel regulators of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;29:31–42. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.02.008.
25. Xu WM, Chen J, Chen H, Diao RY, Fok KL, Dong JD, Sun TT, Chen WY, Yu MK, Zhang XH, Tsang LL, Lau A, Shi QX, Shi QH, Huang PB, Chan HC. Defective CFTR-dependent CREB activation results in impaired spermatogenesis and azoospermia. *PLoS One*. 2011;6(5):e19120. doi: 10.1371/journal.pone.0019120.
26. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. *Arch Dis Child*. 1966;41(219):454–71.
27. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. 5-е изд., 2010 г. Пер. с англ. М.: Капитал Принт; 2012. 304 с.
28. Rathaus V, Werner M, Freud E, Mei-Zahav M, Mussaffi H, Blau H. Sonographic findings of the genital tract in boys with cystic fibrosis. *Pediatr Radiol*. 2006;36(2):162–6. doi: 10.1007/s00247-005-0055-4.
29. Hubert D, Patrat C, Guibert J, Thiounn N, Bienvenu T, Viot G, Jouannet P, Epelboin S. Results of assisted reproductive technique in men with cystic fibrosis. *Hum Reprod*. 2006;21(5):1232–6. doi: 10.1093/humrep/dei453.
30. Chiang HS, Lin YH, Wu YN, Wu CC, Liu MC, Lin CM. Advantages of magnetic resonance imaging (MRI) of the seminal vesicles and intra-abdominal vas deferens in patients with congenital absence of the vas deferens. *Urology*. 2013;82(2):345–51. doi: 10.1016/j.urolgy.2013.03.038.
31. von Eckardstein S, Cooper TG, Rutscha K, Meschede D, Horst J, Nieschlag E. Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 2000;73(6):1226–31. doi: 10.1016/S0015-0282(00)00516-1.
32. Thorpe-Beeston JG. Contraception and pregnancy in cystic fibrosis. *J R Soc Med*. 2009;102 Suppl 1:3–10. doi: 10.1258/jrsm.2009.s19002.
33. Leifke E, Friemert M, Heilmann M, Puvogel N, Smaczny C, von zur Muhlen A, Brabant G. Sex steroids and body composition in men with cystic fibrosis. *Eur J Endocrinol*. 2003;148(5):551–7.
34. Штаут МИ, Шилейко ЛВ, Репина СА, Красовский СА, Шмарина ГВ, Сорокина ТМ, Курило ЛФ, Черных ВБ. Комплексное сперматологическое обследование пациентов с муковисцидозом. *Андрология и генитальная хирургия*. 2017;18(4):69–76. doi: 10.17650/2070-9781-2017-18-4-69-76.
35. Boyd JM, Mehta A, Murphy DJ. Fertility and pregnancy outcomes in men and women with cystic fibrosis in the United Kingdom. *Hum Reprod*. 2004;19(10):2238–43. doi: 10.1093/humrep/deh405.
36. Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis. *Cell*. 1993;73(7):1251–4. doi: 10.1016/0092-8674(93)90353-R.
37. Kapranov NI, Kashirskaya NYu, editors. Cystic fibrosis. Moscow: Medpraktika-M; 2014. 672 p. Russian.
38. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis. *Cell*. 1993;73(7):1251–4. doi: 10.1016/0092-8674(93)90353-R.

References

1. Krasovskiy SA, Chernyak AV, Voronkova AYu, Amelina EL, Kashirskaya NYu, Kondrat'eva EI, Gembitskaya TE, editors. The Russian Federation cystic fibrosis patient registry for 2016. Moscow: Medpraktika-M; 2018. 64 p. Russian.
2. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in

- cystic fibrosis. *Cell*. 1993;73(7):1251–4. doi: 10.1016/0092-8674(93)90353-R.
3. Kapranov NI, Kashirskaya NYu, editors. Cystic fibrosis. Moscow: Medpraktika-M; 2014. 672 p. Russian.
4. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM,

- Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic



- fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros.* 2008;7(3):179–96. doi: 10.1016/j.jcf.2008.03.009.
5. Pettit RS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-modifying medications: the future of cystic fibrosis treatment. *Ann Pharmacother.* 2012;46(7–8):1065–75. doi: 10.1345/aph.1R076.
6. Michl RK, Tabori H, Hentschel J, Beck JF, Mainz JG. Clinical approach to the diagnosis and treatment of cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Expert Rev Respir Med.* 2016;12:1–10. doi: 10.1080/17476348.2016.1240032.
7. Petrova NV, Timkovskaya EE, Zinchenko RA, Ginter EK. The analysis of CFTR mutation frequencies in different populations of Russia. *Medical Genetics.* 2006;5(2):28–31. Russian.
8. Stepanova AA, Krasovsky SA, Polyakov AV. Reliability of the search for 19 common mutations in the CFTR gene in Russian cystic fibrosis patients and the calculated frequency of the disease in Russian Federation. *Russian Journal of Genetics.* 2016;52(2):204–13. doi: 10.1134/S1022795416010130.
9. Krasovsky SA, Petrova NV, Stepanova AA, Usacheva MV, Samoilenko VA, Amelina EL, Nikonova VS. Clinical course of cystic fibrosis on adult patients carrying "mild" mutations. *Russian Pulmonology.* 2012;6(5):5–11. Russian. doi: 10.18093/0869-0189-2012-0-6-5-11.
10. Chernykh VB. CFTR gene and male infertility. *Andrology and Genital Surgery.* 2010;11(4): 23–32. Russian.
11. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet.* 2003;67(Pt 5):471–85. doi: 10.1046/j.1469-1809.2003.00028.x.
12. Duguépéroux I, De Braekeleer M. The CFTR 3849+10kbC>T and 2789+5G>A alleles are associated with a mild CF phenotype. *Eur Respir J.* 2005;25(3):468–73. doi: 10.1183/09031936.05.10100004.
13. Feldmann D, Couderc R, Audrezet MP, Ferec C, Bienvenu T, Desgeorges M, Claustres M, Mitre H, Blayau M, Bozon D, Malinge MC, Monnier N, Bonnefont JP, Iron A, Bieth E, Dumur V, Clavel C, Cazeneuve C, Girodon E. CFTR genotypes in patients with normal or borderline sweat chloride levels. *Hum Mutat.* 2003;22(4):340. doi: 10.1002/humu.9183.
14. Mickle JE, Cutting GR. Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. *Med Clin North Am.* 2000;84(3):597–607. doi: 10.1016/S0025-7125(05)70243-1.
15. Chernykh VB, Stepanova AA, Beskorovainaya TS, Sorokina TM, Shileiko LV, Kurilo LF, Polyakov AV. The frequency and spectrum of mutations and the IVS8-T polymorphism of the CFTR gene in Russian infertile men. *Russian Journal of Genetics.* 2010;46(6):750–7. doi: 10.1134/S1022795410060165.
16. Claustres M. Molecular pathology of the CFTR locus in male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2005;10(1):14–41. doi: 10.1016/S1472-6483(10)60801-2.
17. Chen H, Ruan YC, Xu WM, Chen J, Chan HC. Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility. *Hum Reprod Update.* 2012;18(6):703–13. doi: 10.1093/humupd/dms027.
18. Blau H, Freud E, Mussaffi H, Werner M, Konen O, Rathaus V. Urogenital abnormalities in male children with cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 2002;87(2):135–8. <http://dx.doi.org/10.1136/ad.87.2.135>.
19. Radpour R, Gourabi H, Dizaj AV, Holzgreve W, Zhong XY. Genetic investigations of CFTR mutations in congenital absence of vas deferens, uterus, and vagina as a cause of infertility. *J Androl.* 2008;29(5):506–13. doi: 10.2164/jandrol.108.005074.
20. Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Claustres M, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med.* 1995;332(22):1475–80. doi: 10.1056/NEJM199506013322204.
21. Llabador MA, Pagin A, Lefebvre-Maunoury C, Marcelli F, Leroy-Martin B, Rigot JM, Mitchell V. Congenital bilateral absence of the vas deferens: the impact of spermatogenesis quality on intracytoplasmic sperm injection outcomes in 108 men. *Andrology.* 2015;3(3):473–80. doi: 10.1111/andr.12019.
22. Patat O, Pagin A, Siegfried A, Mitchell V, Chassaing N, Faguer S, Monteil L, Gaston V, Bujan L, Courtade-Saïdi M, Marcelli F, Lalau G, Rigot JM, Mieuisset R, Bieth E. Truncating mutations in the adhesion G Protein-Coupled Receptor G2 Gene ADGRG2 Cause an X-linked congenital bilateral absence of vas deferens. *Am J Hum Genet.* 2016;99(2):437–42. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.06.012.
23. Marcotelles P, Gillet D, Friocourt G, Ledé F, Sammaison L, Huguen G, Ferec C. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression in the male excretory duct system during development. *Hum Pathol.* 2012;43(3):390–7. doi: 10.1016/j.humpath.2011.04.031.
24. Fok KL, Chen H, Ruan YC, Chan HC. Novel regulators of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;29:31–42. doi: 10.1016/j.semdcb.2014.02.008.
25. Xu WM, Chen J, Chen H, Diao RY, Fok KL, Dong JD, Sun TT, Chen WY, Yu MK, Zhang XH, Tsang LL, Lau A, Shi QX, Shi QH, Huang PB, Chan HC. Defective CFTR-dependent CREB activation results in impaired spermatogenesis and azoospermia. *PLoS One.* 2011;6(5):e19120. doi: 10.1371/journal.pone.0019120.
26. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. *Arch Dis Child.* 1966;41(219): 454–71.
27. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition. WHO; 2010. 287 p.
28. Rathaus V, Werner M, Freud E, Mei-Zahav M, Mussaffi H, Blau H. Sonographic findings of the genital tract in boys with cystic fibrosis. *Pediatr Radiol.* 2006;36(2):162–6. doi: 10.1007/s00247-005-0055-4.
29. Hubert D, Patrat C, Guibert J, Thiounn N, Bienvenu T, Viot G, Jouannet P, Epelboin S. Results of assisted reproductive technique in men with cystic fibrosis. *Hum Reprod.* 2006;21(5): 1232–6. doi: 10.1093/humrep/dei453.
30. Chiang HS, Lin YH, Wu YN, Wu CC, Liu MC, Lin CM. Advantages of magnetic resonance imaging (MRI) of the seminal vesicles and intra-abdominal vas deferens in patients with congenital absence of the vas deferens. *Urology.* 2013;82(2):345–51. doi: 10.1016/j.urology.2013.03.038.
31. von Eckardstein S, Cooper TG, Rutscha K, Meschede D, Horst J, Nieschlag E. Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 2000;73(6):1226–31. doi: 10.1016/S0015-0282(00)00516-1.
32. Thorpe-Beeston JG. Contraception and pregnancy in cystic fibrosis. *J R Soc Med.* 2009;102 Suppl 1:3–10. doi: 10.1258/jrsm.2009.s19002.
33. Leifke E, Friemert M, Heilmann M, Puvogel N, Smaczny C, von zur Muhlen A, Brabant G. Sex steroids and body composition in men with cystic fibrosis. *Eur J Endocrinol.* 2003;148(5): 551–7.
34. Shtaut MI, Shileiko LV, Repina SA, Krasovsky SA, Shmarina GV, Sorokina TM, Kurilo LF, Chernykh VB. Comprehensive semen examination in patients with cystic fibrosis. *Andrology and Genital Surgery.* 2017;18(4): 69–76. Russian. doi: 10.17650/2070-9781-2017-18-4-69-76.
35. Boyd JM, Mehta A, Murphy DJ. Fertility and pregnancy outcomes in men and women with cystic fibrosis in the United Kingdom. *Hum Reprod.* 2004;19(10):2238–43. doi: 10.1093/humrep/deh405.



Reproductive system status and the algorithm to solve fertility issues in men with cystic fibrosis

S.A. Repina¹ • S.A. Krasovskiy^{1,2} • G.V. Shmarina¹ • M.I. Shtaut¹ • E.K. Zhekayte^{1,3} • A.Yu. Voronkova^{1,3} • V.D. Sherman^{1,3} • E.I. Kondratyeva^{1,3} • V.B. Chernykh^{1,4}

Rationale: Cystic fibrosis (CF) is a common hereditary disease related to the CFTR gene mutations and characterized by progression and multiple system involvement (primarily of the digestive tract and/or pulmonary system). Most men with CF are infertile. Due to new therapeutic options, the life expectancy of CF patients has increased, with reproductive issues becoming relevant. **Aim:** A multifaceted assessment of the reproductive system status and fertility in male patients with CF and improvement of the strategies to resolve their reproduction issues. **Materials and methods:** This cohort prospective study was performed 2006 to 2018 and included 81 unrelated Russian male patients with confirmed CF, aged from 15 to 69 years (mean age 25.6 ± 7.9 years). Forty two (42) patients had pancreatic sufficient and 39 pancreatic insufficient CF. The patients underwent clinical, andrological, laboratory and instrumental examination (scrotal ultrasonography, standard and biochemical semen examination and hormone levels). **Results:** Reproductive disorders and semen abnormalities found in CF patients varied from preserved fertility to infertility. The following andrological abnormalities were found: delayed puberty (48%), urological disorders (26%), uni- or bilateral testicular hypoplasia (42%), diffuse lesions and cysts of the epididymis (70%), diffuse lesions /calcifications of the prostate (50%), and decreased testosterone levels (24.2%). Azoospermia was diagnosed in 87.5% of the patients, “moderate” or “mild” pathozoospermia (oligo-/astheno-/teratozoospermia) in 11.1%, and normozoospermia in 1.4% of the patients. There were significant differences between the patients with pancreatic sufficient and pancreatic insufficient CF in the ejaculate volume (1.4 ± 1.5 ml vs. 0.6 ± 0.5 ml; $p=0.006$), ejaculate pH (6.7 ± 0.7 vs. 6.1 ± 0.4 ; $p<0.0001$), and sperm concentration (19.6 ± 56.0 Mio/mL vs. 0.001 ± 0.008 Mio/mL; $p=0.011$). Normal ejaculate volume was more

frequent (21.1% vs 14.7%; $p>0.05$) in patients under the age of 25. No bilateral obstruction of vas deferens was found in 71.4% patients with 3849+10kb-C>T mutation. There was a significant difference ($p<0.00001$) in the frequency of 3849+10kbC>T mutation between the patients with vas deferens obstruction (9.5%) and without it (93.8%). We developed an algorithm to resolve infertility issues (including assisted reproductive technologies) in male CF patients depending on their fertility /presence and type of pathozoospermia and some other factors that may influence the conception and CF risk in the offspring. We also suggested practical recommendations for the andrological assessment, maintenance of reproductive health, and planning of childbirth in these patients. **Conclusion:** Male CF patients require a multifaceted assessment of their reproductive system. The prognosis of their reproductive functions, the strategy to maintain their reproductive health and making a decision on childbirth depends on the CF type, the CFTR genotype, the results of semen analysis, and the patient’s age. Pancreatic sufficient CF type, 3849+10kbC>T mutation of the CFTR gene and younger age are favorable factors for potential maintenance of vas deferens patency and male fertility in CF patients.

Key words: cystic fibrosis, *CFTR*, male infertility, obstructive azoospermia

For citation: Repina SA, Krasovskiy SA, Shmarina GV, Shtaut MI, Zhekayte EK, Voronkova AY, Sherman VD, Kondratyeva EI, Chernykh VB. Reproductive system status and the algorithm to solve fertility issues in men with cystic fibrosis. Almanac of Clinical Medicine. 2019;47(1):26–37. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-001.

Received 12 October 2018; accepted 11 January 2019; published 31 January 2019

Funding

The study was performed as a PhD thesis and research and financed by the Research Centre for Medical Genetics (Moscow, Russia) from the approved research budget.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors express their acknowledgment to the National Research Center of Endocrinology (Moscow, Russia) employee Roman V. Rozhivanov (Chief Research Fellow of Andrology and Urology Department, MD, PhD) and to the Research Centre for Medical Genetics (Moscow, Russia) employees Nika V. Petrova (Leading Research Fellow of the Laboratory of Genetic Epidemiology, Dr. Biol. Sci.), Tagui A. Adyan (Research Fellow of the Laboratory for DNA Diagnostics, MD), and Prof. Aleksandr V. Polyakov (Head of Laboratory for DNA Diagnostics, Dr. Biol. Sci., Professor of the Russian Academy of Sciences) for the DNA diagnosis in CF patients.

Svetlana A. Repina – MD, Geneticist, Medical Services Department¹

✉ 1 Moskvorech'e ul., Moscow, 115522, Russian Federation. Tel.: +7 (499) 324 70 16. E-mail: repina@med-gen.ru

Stanislav A. Krasovskiy – MD, PhD, Senior Research Fellow, Clinical and Consulting Department of Cystic Fibrosis¹; Laboratory of Cystic Fibrosis²

Galina V. Shmarina – MD, PhD, Leading Research Fellow, Laboratory of Molecular Biology¹

Maria I. Shtaut – MD, Research Fellow, Laboratory of Genetics of Reproductive Disorders¹

Elena K. Zhekayte – MD, Research Fellow, Clinical and Consulting Department of Cystic Fibrosis¹; Pediatrician, Department of Cystic Fibrosis³

Anna Yu. Voronkova – MD, PhD, Senior Research Fellow, Clinical and Consulting Department of Cystic Fibrosis¹; Pediatrician, Department of Cystic Fibrosis³

Viktoriya D. Sherman – MD, PhD, Senior Research Fellow, Clinical and Consulting Department of Cystic Fibrosis¹; Pediatrician, Department of Cystic Fibrosis³

Elena I. Kondratyeva – MD, PhD, Professor, Head of Clinical and Consulting Department of Cystic Fibrosis¹; Head of Department of Cystic Fibrosis³

Vyacheslav B. Chernykh – MD, PhD, Head of Laboratory of Genetics of Reproductive Disorders¹; Associate Professor, Chair of Molecular Genetics and Cytogenetics of Medicobiologic Faculty⁴

¹ Medical Genetic Science Center; 1 Moskvorech'e ul., Moscow, 115522, Russian Federation

² Federal Pulmonology Research Institute; 32/4 11-ya Parkovaya ul., Moscow, 105077, Russian Federation

³ Moscow Regional State Referral Center for Children; 24a/1 Kominternaya ul., Mytishchi, Moskovskaya oblast', 141009, Russian Federation

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovnyanovaya ul., Moscow, 117997, Russian Federation



Оригинальная статья

Особенности спектра мутаций, выявленных при комплексном исследовании гена *CFTR* у российских больных муковисцидозом

Петрова Н.В.¹ • Марахонов А.Ю.¹ • Васильева Т.А.¹ • Каширская Н.Ю.¹ • Кондратьева Е.И.¹ • Жекайте Е.К.¹ • Воронкова А.Ю.¹ • Шерман В.Д.¹ • Галкина В.А.¹ • Гинтер Е.К.¹ • Куцев С.И.¹ • Зинченко Р.А.^{1,2}

Петрова Ника Валентиновна – д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории генетической эпидемиологии¹
✉ 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1, Российская Федерация. Тел.: +7 (499) 320 60 90.
E-mail: npetrova63@mail.ru

Марахонов Андрей Юрьевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории генетической эпидемиологии¹

Васильева Татьяна Алексеевна – науч. сотр. лаборатории генетической эпидемиологии¹

Каширская Наталья Юрьевна – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотр. лаборатории генетической эпидемиологии¹

Кондратьева Елена Ивановна – д-р мед. наук, профессор, заведующая научно-клиническим отделом муковисцидоза¹

Жекайте Елена Кястутисовна – науч. сотр. научно-клинического отдела муковисцидоза¹

Воронкова Анна Юрьевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. научно-клинического отдела муковисцидоза¹

Шерман Виктория Давидовна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. научно-клинического отдела муковисцидоза¹

Галкина Варвара Александровна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории генетической эпидемиологии¹

Гинтер Евгений Константинович – д-р биол. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель¹

Куцев Сергей Иванович – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, директор¹

Зинченко Рена Абульфазовна – д-р мед. наук, профессор, руководитель лаборатории генетической эпидемиологии¹; профессор курса клинической фармакологии кафедры организационно-правового обеспечения медицинской и фармацевтической деятельности факультета усовершенствования врачей²

Актуальность. Муковисцидоз (МВ; OMIM 219700) – частое наследственное заболевание, обусловленное мутациями в гене *CFTR* (OMIM 602421). Распределение и частота мутаций гена *CFTR* значительно различаются в зависимости от страны и этнической группы. К настоящему времени около 11% аллелей гена *CFTR* остаются не идентифицированными после проведения тестирования частых мутаций у российских пациентов. Полное определение спектра мутаций в гене *CFTR* необходимо для оптимизации медико-генетической помощи населению и внедрения достижений таргетной терапии при лечении больных МВ. **Материал и методы.** В группе 121 российского пациента с МВ, при тестировании которых на частые мутации не идентифицирован один (107 человек) или оба (14) мутантных аллеля, проведено исследование кодирующей последовательности гена *CFTR*, включая области экзон-интронных соединений, 5'- и 3'-нетранслируемых областей, методом секвенирования по Сэнгеру, а также поиск протяженных перестроек методом мультиплексной лигазо-зависимой амплификации проб (MLPA). **Результаты.** Дополнительно к выявленным ранее определено 88 вариантов, из них 28 – миссенс-мутации, 15 – нонсенс-мутации, 18 – мутации со сдвигом рамки (14 делеций, 4 инсерции), 14 – мутации, нарушающие сайты сплайсинга, 1 – инсерция без сдвига рамки, 1 – делеция без сдвига рамки, 1 – мутация in/del, 10 – обширные перестройки (7 – делеции, 3 – дупликации). При секвенировании 23 варианта описаны впервые. Выявлено 4 комплексных мутантных аллеля. Шестдесят вариантов

обнаружены 1 раз. Идентифицированы 134 из 135 протестированных мутантных аллелей.

Заключение. Последовательное использование методов секвенирования и MLPA позволило идентифицировать высокую долю тестируемых мутантных аллелей у больных МВ из России (134 из 135, >99%), выявить значительное разнообразие спектра мутаций гена *CFTR* (дополнительно 88 генетических вариантов, 32 из них впервые), ряд повторяющихся мутаций (с.2353С>Т, с.1240_1244delCAAAA, с.1766+1G>А и с.3929G>А), встретившихся у 5 и более неродственных пациентов, которые можно включить в панель рутинно анализируемых мутаций у российских пациентов с МВ; а также высокую долю протяженных перестроек гена *CFTR*.

Ключевые слова: муковисцидоз, ген *CFTR*, генетические варианты, мутации, обширные перестройки гена, комплексный аллель, российская популяция

Для цитирования: Петрова НВ, Марахонов АЮ, Васильева ТА, Каширская НЮ, Кондратьева ЕИ, Жекайте ЕК, Воронкова АЮ, Шерман ВД, Галкина ВА, Гинтер ЕК, Куцев СИ, Зинченко РА. Особенности спектра мутаций, выявленных при комплексном исследовании гена *CFTR* у российских больных муковисцидозом. Альманах клинической медицины. 2019;47(1):38–46. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-004.

Поступила 15.10.2018; принята к публикации 22.10.2018; опубликована 07.02.2019

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1, Российская Федерация

² ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация



Муковисцидоз (МВ; OMIM 219700) – наследственное рецессивное заболевание, обусловленное патогенными вариантами гена *CFTR* (OMIM 602421), кодирующего белок, муковисцидозный трансмембранный регулятор. Заболевание характеризуется широкой вариабельностью клинических проявлений, в наибольшей степени обусловленных многообразием генетических вариантов гена *CFTR* [1]. Описано более 2200 вариантов последовательности гена *CFTR*, как патогенных, так и с неясной клинической значимостью, а также не имеющих клинических последствий [2, 3]. Спектр и частота мутаций гена *CFTR* значительно различаются в зависимости от страны и этнической группы, что предполагает необходимость расширенного поиска мутантных аллелей для разработки региональных протоколов диагностики и для внедрения достижений таргетной терапии при лечении больных МВ [4].

Исследования молекулярных причин МВ проводятся в лаборатории генетической эпидемиологии Медико-генетического научного центра начиная с 1989 г. К настоящему времени проанализированы данные более 2000 пациентов с МВ. Длительное изучение этой проблемы позволило определить спектр мутаций гена *CFTR*, рекомендуемых для генотипирования МВ на первом этапе в Российской Федерации: с.54-5940_273+10250del21kb (p.Ser18Arg*fsX16, CFTRdele2,3), с.254G>A (p.Gly85Glu, G85E), с.262_263delTT (p.Leu88IlefsX22, 394delTT), с.274G>A (p.Glu92Lys, E92K), с.287C>A (p.Ala96Glu, A96E), с.350G>A (p.Arg117His, R117H), с.411_412insCTA (p.Leu138dup; L138ins), с.472dupA (p.Ser158LysfsX5, 604insA), с.489+1G>T (621+1G>T), с.1000C>T (p.Arg334Trp, R334W), с.1040G>C (p.Arg347Pro, R347P), с.1397C>G (p.Ser466X, S466X), с.1519_1521delATC (p.Ile507del, I507del), с.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del), с.1545_1546delTA (p.Tyr515X, 1677delTA), с.1585-1G>A (1717-1G>A), с.1624G>T (p.Gly542X, G542X), с.1652G>A (p.Gly551Asp, G551D), с.1657C>T (p.Arg553X, R553X), с.2012delT (p.Leu671X, 2143delT), с.2051_2052delAAinsG (p.Lys684SerfsX38, 2183AA>G), с.2052_2053insA (p.Gln685ThrfsX4, 2184insA), с.2657+5G>A (2789+5A>G), с.3140-16T>A (3272-16T>A), с.3476C>T (p.Ser1159Phe, S1159F), с.3475T>C (p.Ser1159Pro; S1159P), с.3535_3536insTCAA (p.Thr1179IlefsX17, 3667ins4), с.3587C>G (p.Ser1196X, S1196X), с.3691delT (p.Ser1231ProfsX4, 3821delT), с.3718-2477C>T (3849+10kbC-T), с.3816_3817delGT (p.Ser1273LeufsX28, 3944delGT),

с.3844T>C (p.Trp1282Arg, W1282R), с.3846G>A (p.Trp1282X, W1282X), с.3909C>G (p.Asn1303Lys, N1303K). Суммарная доля этих вариантов составляет 88,75% от всех мутантных аллелей [5].

Таким образом, около 11% аллелей гена *CFTR* остаются не идентифицированными после проведения тестирования частых мутаций у российских пациентов.

Полное определение спектра мутаций в гене *CFTR* представляется приоритетной задачей в России, поскольку в ряде случаев это позволит уточнить диагноз и усовершенствовать подходы пренатальной диагностики, а также будет способствовать повышению качества медико-генетического консультирования и лечения пациентов.

Целью данной работы было расширенное исследование молекулярных причин МВ у российских пациентов.

Материал и методы

В исследовании использованы образцы ДНК 121 больного МВ из неродственных семей, у которых идентифицирован только один или ни одного патогенного варианта в результате анализа на 34 рутинно тестируемые мутации в гене *CFTR* [5], а также ДНК их родителей для уточнения фазы сцепления выявленных мутаций. Диагноз МВ установлен в научно-клиническом отделении муковисцидоза ФГБНУ «МГНЦ». Сто четырнадцать (94%) пациентов проживали в европейской части Российской Федерации, в том числе 74 (61%) – в г. Москве и Московской области. Пациенты или их родители подписывали информированное согласие на проведение исследования. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ» (протокол №17/2006 от 02.02.2006).

Методом прямого секвенирования по Сэнгеру осуществлен поиск мутаций в кодирующей области гена *CFTR*, включая области экзон-интронных соединений, 5'- и 3'-нетранслируемых областей. Методом мультиплексной лигазо-зависимой амплификации проб (multiplex ligation-dependent probe amplification – MLPA) проведен поиск протяженных перестроек гена *CFTR*.

Результаты и обсуждение

Для анализа выбран 121 пациент с МВ, в ДНК которых при анализе 34 мутаций не идентифицированы один (107) либо оба (14) мутантных аллеля с генотипами: с.[1521_1523delCTT];[?](F508del/n) – 64, с.[54-5940_273+10250del21kb];[?](CFTRdele2,3/n) – 15, с.[2012delT];[?](2143delT/n) – 3, с.[1624G>T];[?](G542X/n) – 4, с.[3846G>A];[?]

(W1282X/n) – 2, c.[2052_2053insA];[?] (2184insA/n) – 2, c.[3909C>G];[?] (N1303K/n) – 3, c.[1000C>T];[?] (R334W/n) – 2, c.[3718-2477C>T];[?] (3849+10kbC>T/n) – 1, c.[1397C>G];[?] (S466X/n) – 2, c.[1545_1546delTA];[?] (1677delTA/n) – 2, c.[411_412insCTA];[?] (L138ins/n) – 2, c.[3691delT];[?] (3821delT/n) – 1, c.[3844T>C];[?] (W1282R/n) – 1, c.[3475T>C];[?] (S1159P/n) – 1, c.[1657C>T];[?] (R553X/n) – 1, c.[489+1G>T];[?] (621+1G>T/n) – 1; c.[?];[?] (n/n) – 14. Всего 135 неидентифицированных мутантных аллелей гена *CFTR*. Методом секвенирования по Сэнгеру проанализированы экзоны и области экзон-интронных соединений, поиск протяженных перестроек (делеций/дупликаций) осуществлен методом MLPA.

В результате, дополнительно к 17 идентифицированным при тестировании частых мутаций, выявлены 88 патогенных (или предположительно патогенных) генетических вариантов в гене *CFTR* (таблица). Из них 28 – миссенс-мутации, 15 – нонсенс-мутации, 18 – мутации со сдвигом рамки (14 делеций, 4 инсерции), 14 – мутации, нарушающие сайты сплайсинга, 1 – инсерция без сдвига рамки, 1 – делеция без сдвига рамки, 1 – мутация in/del, 10 – обширные перестройки (7 – делеции, 3 – дупликации).

Из 79 генетических вариантов, выявленных при секвенировании, 23 идентифицированы впервые: их описание отсутствует в базах данных мутаций в гене *CFTR* [2, 3, 6]. Тринадцать из этих вариантов являются нонсенс-мутациями (с.252T>A, с.831G>A, с.1083G>A, с.3112C>T) или мутациями сдвига рамки (с.264-268delATATT, с.353delC, с.1219delG, с.1262delC, с.1608delA, с.1725delT, с.1795dupA, с.3083_3087delGTTGAinsATG, с.3189delG), приводящими к образованию преждевременного стоп-кодона и синтезу укороченной молекулы белка (см. таблицу). Вариант с.490-1G>C нарушает акцепторный сайт сплайсинга 5-го экзона. Данные варианты относятся к категории «патогенный нулевой вариант последовательности» (PS1 null variants) согласно критериям классификации патогенности генетических вариантов [7, 8]. Вариант с.1792_1793insAAA приводит к вставке лизина в положение 598. Вариант последовательности с.3925_3936delCAGTGGAGTGAT – делеция без сдвига рамки считывания, приводит к потере четырех аминокислотных остатков 1310–1313. Клиническая значимость данных вариантов оценивается как «патогенные варианты» [7, 8]. Клиническая значимость миссенс-мутаций (с.358G>C, с.1382G>A, с.1513A>C, с.1522T>A, с.1525G>C, с.3902G>A) оценивается как «вероятно

патогенные», варианта с.4262T>A – как «возможно патогенный» [7, 8].

Мутации с.422C>A, с.2491G>T, с.227_228insT, с.1086T>A, с.1364C>A, с.2374C>T, с.2417A>G, с.2589_2599delAATTTGGTGCT и с.2909G>A, представленные в международных базах данных мутаций при МВ [2, 3, 6], у российских пациентов обнаружены впервые. Мутации с.227_228insT, с.1086T>A, с.2374C>T и с.2589_2599delAATTTGGTGCT относят к I классу мутаций, при которых синтез молекулы белка *CFTR* полностью нарушен.

Мутация с.422C>A (p.Ala141Asp; A141D) в компаунде с вариантом с.3909C>G (p.Asn1303Lys; N1303K) описана у одной алжирской 14-летней пациентки, диагноз которой установлен в 4 года, экзокринная функция поджелудочной железы относительно сохранна, выявлена колонизация легких *Pseudomonas aeruginosa*, хлориды пота повышены [9].

При мутации с.2491G>T (Glu831X; E831X) происходит не только образование преждевременного стоп-кодона, но и изменение структуры акцепторного сайта сплайсинга 16-го (14а) экзона, что ведет к инициации механизма альтернативного сплайсинга с частичным сохранением синтеза полноразмерных молекул белка *CFTR*. У пациентов, несущих мутацию с.2491G>T (Glu831X; E831X) в компаунде с другими патогенными мутациями МВ, наблюдается относительно легкое течение заболевания с сохранной экзокринной панкреатической функцией [10].

Мутацию с.2909G>A (p.Gly970Asp; G970D) до сих пор регистрировали только у китайских пациентов с МВ с частотой 16,1% [11, 12]. Исходя из локализации предполагается, что следствием мутации с.2909G>A (p.Gly970Asp; G970D) может быть нарушение проводимости хлоридов с сохранением частичной функции белка *CFTR*. Однако у 3 из 9 китайских пациентов, несущих мутацию с.2909G>A (p.Gly970Asp; G970D) в компаунде с другими патогенными вариантами гена *CFTR*, наблюдалось нарушение внешнесекреторной функции поджелудочной железы. Таким образом, мутацию с.2909G>A (p.Gly970Asp; G970D) следует рассматривать скорее как мутацию с варьируемыми клиническими последствиями [13]. У российского пациента, носителя варианта с.2909G>A (p.Gly970Asp; G970D) в компаунде с вариантом с.1657C>T (p.Arg553X; R553X), отмечается нарушение панкреатической функции и тяжелое течение МВ.

Мутация с.2417A>G (p.Asp806Gly; D806G) ранее обнаружена у одного итальянского пациента

Идентифицированные варианты последовательности гена *CFTR* в российской популяции больных муковисцидозом (n = 121)

№ п/п	Изменение в cDNA	Изменение в белке	Традиционное название	Экзон/интрон	Количество
1	c.43delC	p.Leu15PhefsX1	175delC	1э	1
2	c.53+1G>T		185+1G->T	1и	2
3	c.223C>T	p.Arg75X	R75X	3э	1
4	c.227_228insT	p.Trp79LeufsX32	359insT	3э	1
5	c.252T>A	p.Tyr84X		3э	2
6	c.264-268delATATT	p.Leu88PhefsX21		3э	1
7	c.349C>T	p.Arg117Cys	R117C	4э	2
8	c.353delC	p.Ser118LeufsX6		4э	1
9	c.358G>C	p.Ala120Pro		4э	1
10	c.422C>A	p.Ala141Asp	A141D	4э	1
11	c.490-1G>C			4и	1
12	c.532G>A	p.Gly178Arg	G178R	5э	1
13	c.580-1G>T		721-1G->T	5и	4
14	c.650A>G	p.Glu217Gly	E217G	6а э	1
15	c.831G>A	p.Trp277X		6в э	1
16	c.[1075C>A;1079C>A]	p.[Gln359Lys;Thr360Lys]	Q359K/T360K	7э	1
17	c.1083G>A	p.Trp361X		7э	1
18	c.1086T>A	p.Tyr362X	Y362X	7э	1
19	c.1116+1G>A		1248+1G->A	7и	1
20	c.1209G>C	p.Glu403Asp	E403D	8э	2
21	c.[1210-12[5];1210-34TG[12]]		5T;TG12	7и	2
22	c.1219delG	p.Glu407AsnfsX35		9э	1
23	c.1240_1244delCAAAA	p.Asn415X	1367del5	9э	5
24	c.1262delC	p.Thr421IlefsX21		9э	1
25	c.1364C>A	p.Ala455Glu	A455E	9э	1
26	c.1382G>A	p.Gly461Glu		9э	1
27	c.1513A>C	p.Asn505His		10э	1
28	c.1517T>C	p.Ile506Thr	I506T	10э	2 [†]
29	c.1522T>A	p.Phe508Ile		10э	1
30	c.1525G>C	p.Gly509Arg		10э	1



31	c.1608delA	p.Asp537ThrfsX3		11э	1
32	c.1646G>A	p.Ser549Asn	S549N	11э	1
33	c.1725delT	p.Phe575LeufsX4		12э	1
34	c.1705T>G	p.Tyr569Asp	Y569D	12э	1
35	c.1705T>C	p.Tyr569His	Y569H	12э	2
36	c.1735G>T	p.Asp579Tyr	D579Y	12э	1
37	c.1766+2T>C			12и	2
38	c.1766+1G>A		1898+1G>A	12и	5
39	c.1766+1G>C		1878+1G>C	12и	1
40	c.1792_1793insAAA	p.Lys598dup	K598ins	13э	1
41	c.1795dupA	p.Thr599AsnfsX2		13э	1
42	c.1911delG	p.Gln637HisfsX26	2043delG	13э	1
43	c.1986_1989delAACT	p.Thr663ArgfsX8	2118del4	13э	1
44	c.2125C>T	p.Arg709X	R709X	13э	1
45	c.2128A>T	p.Lys710X	K710X	13э	3
46	c.2290C>T	p.Arg764X	R764X	13э	1
47	c.2353C>T	p.Arg785X	R785X	13э	6
48	c.2374C>T	p.Arg792X	R792X	13э	1
49	c.2417A>G	p.Asp806Gly	D806G	13э	1
50	c.2491G>T	p.Glu831X	E831X	14а э	1
51	c.2589_2599delAATTGGTGCT	p.Ile864SerfsX28	2721del11	14а э	2
52	c.2658-2A>G		2790-2A->G	14в и	1
53	c.2834C>T	p.Ser945Leu	S945L	15э	4
54	c.2909G>A	p.Gly970Asp	G970D	16э	1
55	c.3084_3088delinsATG	p.Met1028IlefsX18		17а э	2*
56	c.3112C>T	p.Gln1038X		17а э	1
57	c.3189delG	p.Trp1063X		17в э	1
58	c.3196C>T	p.Arg1066Cys	R1066C	17в э	1
59	c.3209G>A	p.Arg1070Gln	R1070Q	17в э	2
60	c.3274T>C	p.Tyr1092His	Y1092H	17в э	2
61	c.3472C>T	p.Arg1158X	R1158X	19э	2



62	c.3484C>T	p.Arg1162X	R1162X	19э	2
63	c.3528delC	p.Lys1177SerfsX15	3659delC	19э	1
64	c.3717G>A		3849G->A	19э	1
65	c.3731G>A	p.Gly1244Glu	G1244E	20э	2 [†]
66	c.3763T>C	p.Ser1255Pro	S1255P	20э	1
67			4006-2A->G	20и	1
68	c.3883delA	p.Ile1295PhefsX33	4015delA	21э	2
69	c.3884_3885insT	p.Ser1297PhefsX5	4016insT	21э	3
70	c.3902G>A	p.Arg1301Lys		21э	1
71	c.3929G>A	p.Trp1310X	W1310X	21э	5
72	c.3925_3936delCAGTGGAGTGAT	p.Trp1310_Gln1313del		21э	1
73	c.3963+1G>T		4095+1G->T	21и	1
74	c.4004T>C	p.Leu1335Pro	L1335P	22э	4
75	c.4242+1G>A		4374G->A	23и	1
76	c.4262T>A	p.Val1421Glu		24э	1
77	c.4296_4297insGA	p.Ser1435GlyfsX14	4428insGA	24э	2
78	c.4364C>G	p.Ser1455X	S1455X	24э	2 [†]
79	c.(?-1)_(1584+1_1585-1)del		CFTRdele1-10 [†]		1
80	c.(273-1_274+1)_(869+1_870-1)del(1209-1_1210+1)_(1392+1_1393+1)del		CFTRdele4-7;dele9-10 [†]		1
81	c.(273+1_274-1)_(743+1_744-1)del		CFTRdele4-6a [†]		1
82	c.(489+1_490-1)_(1392+1_1393-1)del		CFTRdele5-10 [†]		1
83	c.(2988+1_2989-1)_(3468+1_3469-1)del		CFTRdele17a-18 [†]		1
84	c.(1679+1_1680-1)_(2490+1_2491-1)del(2908+1_2909-1)del		CFTRdele12,13;del16 [†]		2
85	c.(743+1_744-1)_(1584+1_1585-1)dup		Dup ex 6b-10 [†] (gIVS6a+415_IVS10+2987Dup26817bp)		2
86	c.(743-1_744+1)_(869+1_870-1)dup		CFTRdup6b,7 [†]		1
87	c.(4136+1_4137-1)_(?1_?)dup		CFTRdup23,24 [†]		1
88	c.(53+1_54-1)_(869+1_870+1)del		CFTRdele2-7 [†]		1

[†] Нумерация экзонов согласно традиционной номенклатуре (legacy nomenclature)

[†] Вариант обнаружен у пациента в гомозиготном состоянии

24 лет, имеющего пограничные значения потового теста, страдающего рецидивирующим панкреатитом и несущего второй, комплексный аллель с.(1657C>T; 4389G>T) (p.(Arg553X;Gln1463His); R553X/Q1463H) гена *CFTR* [2].

Мутация с.1364C>A (p.Ala455Glu; A455E) с наибольшей частотой (8%) отмечена у канадцев французского происхождения [14]. Ее относят к V классу мутаций, при которых функция поджелудочной железы остается частично сохраненной.

Методом MLPA выявлены 10 обширных перестроек гена *CFTR*: 3 дупликации и 7 делеций (см. таблицу). Разработанная нами система тестирования позволила подтвердить, что обнаруженная у 2 российских пациентов дупликация региона, включающего экзоны 7–11 (6в–10), ранее описана в литературе [15]. Комплексная делеция, приводящая к потере 13–14-го (12–13) и 18-го (16) экзонов (с.(1679+1_1680-1)_(2490+1_2491-1)del(2908+1_2909-1)del; CFTRdele12,13;del16), ранее не описанная, встретилась у 2 пациентов из неродственных семей, проживающих в московском регионе.

Шестьдесят вариантов, идентифицированных в настоящей работе, выявлено на одной хромосоме, 20 – на двух хромосомах (см. таблицу). Но каждый из вариантов с.1517T>C, с.3731G>A, с.4364C>G, с.3084_3088delinsATG идентифицирован у одного пациента в гомозиготном состоянии, что подтверждено обследованием родителей либо MLPA анализом. Две мутации обнаружены у 3 пациентов, мутации с.580-1G>T, с.2834C>T и с.4004T>C – у 4, мутации с.1240_1244delCAAAA, с.1766+1G>A и с.3929G>A – у 5, с.2353C>T – у 6 неродственных пациентов (см. таблицу). Выявлено 4 комплексных аллеля гена *CFTR*: с.[1210–12[5];1210–34TG[12]] (5T;TG12) – у 2 пациентов; с.[1075C>A;1079C>A] (p.[Gln359Lys;Thr360Lys]; Q359K/T360K;

rs397508152) – у 1; с.[1397C>G;3209G>A] (p.[Ser466X;Arg1070Gln]; S466X(TGA)/R1070Q) – у 2 и с.[(2988+1_2989-1)_(3468+1_3469-1)del;1522T>A] (CFTRdele17a-18/F508I) – у 1. Обширные перестройки гена *CFTR* обнаружены у 12 неродственных пациентов, что составляет 8,69% от протестированных мутантных аллелей, а в пересчете на общую выборку должно составить около 1% всех мутантных аллелей у больных МВ в Российской Федерации.

Патогенные варианты идентифицированы в 134 из 135 протестированных мутантных аллелей. В одном образце не удалось идентифицировать второй мутантный аллель гена *CFTR*. Необнаружение второй патологической мутации в гене *CFTR* после проведения секвенирования кодирующей последовательности и поиска обширных перестроек может быть обусловлено расположением патогенного варианта либо во внутренних регионах интронов, либо в регуляторных областях гена *CFTR*, либо в регуляторных регионах вне гена *CFTR* [15].

Заключение

Последовательное использование методов секвенирования и MLPA позволило идентифицировать высокую долю тестируемых мутантных аллелей у больных МВ из России (134 из 135, >99%), выявить значительное разнообразие спектра мутаций гена *CFTR* (дополнительно 88 генетических вариантов, 32 из них впервые), ряд повторяющихся мутаций (с.2353C>T, с.1240_1244delCAAAA, с.1766+1G>A и с.3929G>A), встретившихся у 5 и более неродственных пациентов, которые можно включить в панель рутинно анализируемых мутаций у российских пациентов с МВ, что позволит увеличить информативность диагностики МВ в России на первом этапе до 90–92%; а также высокую долю протяженных перестроек гена *CFTR*. ☺

Дополнительная информация

Финансирование

Работа выполнена при финансировании из Российского научного фонда, грант № 17-15-01051.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Н.В. Петрова – концепция и дизайн исследования, сбор и первичная обработка материалов, проведение молекулярно-генетических исследований, анализ полученных данных, написание текста; А.Ю. Марахонов и Т.А. Васильева – проведение молекулярно-генетических исследований, анализ полученных данных, редактирование текста; Н.Ю. Каширская – концепция и дизайн исследования,

написание и редактирование текста; Е.И. Кондратьева – обеспечение посещения пациентов, предоставления письменного информированного согласия, проведение клинического обследования пациентов, редактирование текста; Е.К. Жекайте, А.Ю. Воронкова и В.Д. Шерман – обеспечение посещения пациентов, предоставления письменного информированного согласия, проведение клинического обследования пациентов, сбор образцов, редактирование текста; В.А. Галкина – анализ результатов клинического обследования пациентов, анализ полученных данных, медико-генетическое консультирование, редактирование текста; Е.К. Гинтер и С.И. Куцев – концепция и дизайн статьи, редактирование текста; Р.А. Зинченко – концепция и дизайн статьи, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.



Литература

1. Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med.* 2007;28(2):279–88. doi: 10.1016/j.ccm.2007.02.011.
2. The Cystic Fibrosis Mutation Database [Internet]. Available from: <http://www.genet.sick-kids.on.ca>.
3. EXAC. The Exome Aggregation Consortium (Exac) Database [Internet]. Available from: <http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000001626>.
4. De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L. The diagnosis of cystic fibrosis. *Presse Med.* 2017;46(6 Pt 2):e97–e108. doi: 10.1016/j.lpm.2017.04.010.
5. Петрова НВ, Кондратьева ЕИ, Красовский СА, Поляков АВ, Иващенко ТЭ, Павлов АЕ, Зинченко РА, Гинтер ЕК, Куцев СИ, Одиноква ОН, Назаренко ЛП, Капранов НИ, Шерман ВД, Амелина ЕЛ, Ашерова ИК, Гембицкая ТЕ, Ильенкова НА, Каримова ИП, Мерзлова НБ, Намазова-Баранова ЛС, Неретина АФ, Никонова ВС, Орлов АВ, Протасова ТА, Семькин СЮ, Сергиенко ДФ, Симонова ОИ, Шабалова ЛА, Каширская НЮ. Проект национального консенсуса «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия». Раздел «Генетика муковисцидоза. Молекулярно-генетическая диагностика при муковисцидозе». *Медицинская генетика.* 2016;15(11):29–45.
6. Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) [Internet]. Available from: https://www.cftr2.org/mutations_history.
7. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
8. Рыжкова ОП, Кардымон ОЛ, Прохорчук ЕБ, Конавалов ФА, Масленников АВ, Степанов ВА, Афанасьев АА, Заклязьминская ЕВ, Костарева АА, Павлов АЕ, Голубенко МВ, Поляков АВ, Куцев СИ. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS). *Медицинская генетика.* 2017;16(7):4–17.
9. Gouya L, Pascaud O, Munck A, Elion J, Denamur E. Novel mutation (A141D) in exon 4 of the CFTR gene identified in an Algerian patient. *Hum Mutat.* 1997;10(1):86–7. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1997)10:1<86::AID-HUMU15>3.0.CO;2-W.
10. Hinzpeter A, Aissat A, Sondo E, Costa C, Arous N, Gameiro C, Martin N, Tarze A, Weiss L, de Becdelièvre A, Costes B, Goossens M, Galletta LJ, Girodon E, Fanen P. Alternative splicing at a NAGNAG acceptor site as a novel phenotype modifier. *PLoS Genet.* 2010;6(10). pii: e1001153. doi: 10.1371/journal.pgen.1001153.
11. Wagner JA, Vassilakis A, Yee K, Li M, Hurlock G, Krouse ME, Moss RB, Wine JJ. Two novel mutations in a cystic fibrosis patient of Chinese origin. *Hum Genet.* 1999;104(6):511–5. doi: 10.1007/s004390050996.
12. Tian X, Liu Y, Yang J, Wang H, Liu T, Xu W, Li X, Zhu Y, Xu KF, Zhang X. p.G970D is the most frequent CFTR mutation in Chinese patients with cystic fibrosis. *Hum Genome Var.* 2016;3:15063. doi: 10.1038/hgv.2015.63.
13. Rozen R, De Braekeleer M, Daigneault J, Ferreira-Rajabi L, Gerdes M, Lamoureux L, Aubin G, Simard F, Fujiwara TM, Morgan K. Cystic fibrosis mutations in French Canadians: three CFTR mutations are relatively frequent in a Quebec population with an elevated incidence of cystic fibrosis. *Am J Med Genet.* 1992;42(3):360–4. doi: 10.1002/ajmg.1320420322.
14. Hantash FM, Redman JB, Goos D, Kammesheidt A, McGinniss MJ, Sun W, Strom CM. Characterization of a recurrent novel large duplication in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Mol Diagn.* 2007;9(4):556–60. doi: 10.2353/jmol.2007.060141.
15. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferenc C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros.* 2008;7(3):179–96. doi: 10.1016/j.jcf.2008.03.009.
16. Hinzpeter A, Aissat A, Sondo E, Costa C, Arous N, Gameiro C, Martin N, Tarze A, Weiss L, de Becdelièvre A, Costes B, Goossens M, Galletta LJ, Girodon E, Fanen P. Alternative splicing at a NAGNAG acceptor site as a novel phenotype modifier. *PLoS Genet.* 2010;6(10). pii: e1001153. doi: 10.1371/journal.pgen.1001153.
17. Wagner JA, Vassilakis A, Yee K, Li M, Hurlock G, Krouse ME, Moss RB, Wine JJ. Two novel mutations in a cystic fibrosis patient of Chinese origin. *Hum Mutat.* 1997;10(1):86–7. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1997)10:1<86::AID-HUMU15>3.0.CO;2-W.
18. Hinzpeter A, Aissat A, Sondo E, Costa C, Arous N, Gameiro C, Martin N, Tarze A, Weiss L, de Becdelièvre A, Costes B, Goossens M, Galletta LJ, Girodon E, Fanen P. Alternative splicing at a NAGNAG acceptor site as a novel phenotype modifier. *PLoS Genet.* 2010;6(10). pii: e1001153. doi: 10.1371/journal.pgen.1001153.
19. Wagner JA, Vassilakis A, Yee K, Li M, Hurlock G, Krouse ME, Moss RB, Wine JJ. Two novel mutations in a cystic fibrosis patient of Chinese origin. *Hum Genet.* 1999;104(6):511–5. doi: 10.1007/s004390050996.
20. Tian X, Liu Y, Yang J, Wang H, Liu T, Xu W, Li X, Zhu Y, Xu KF, Zhang X. p.G970D is the most frequent CFTR mutation in Chinese patients with cystic fibrosis. *Hum Genome Var.* 2016;3:15063. doi: 10.1038/hgv.2015.63.
21. Rozen R, De Braekeleer M, Daigneault J, Ferreira-Rajabi L, Gerdes M, Lamoureux L, Aubin G, Simard F, Fujiwara TM, Morgan K. Cystic fibrosis mutations in French Canadians: three CFTR mutations are relatively frequent in a Quebec population with an elevated incidence of cystic fibrosis. *Am J Med Genet.* 1992;42(3):360–4. doi: 10.1002/ajmg.1320420322.

References

1. Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med.* 2007;28(2):279–88. doi: 10.1016/j.ccm.2007.02.011.
2. The Cystic Fibrosis Mutation Database [Internet]. Available from: <http://www.genet.sick-kids.on.ca>.
3. EXAC. The Exome Aggregation Consortium (Exac) Database [Internet]. Available from: <http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000001626>.
4. De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L. The diagnosis of cystic fibrosis. *Presse Med.* 2017;46(6 Pt 2):e97–e108. doi: 10.1016/j.lpm.2017.04.010.
5. Petrova NV, Kondratyeva EI, Krasovsky SA, Polyakov AV, Ivachshenko TE, Pavlov AE, Zinchenko RA, Ginter EK, Kutsev SI, Odiokova ON, Nazarenko LP, Kapranov NI, Sherman VD, Amelina EL, Asherova IK, Gembitskaya TE, Ilyenkova NA, Karimova IP, Merzlova NB, Namazova-Baranova LS, Neretina AF, Nikonova VS, Orlov AV, Protasova TA, Semykin SY, Sergienko DF, Simonova OI, Shabalova LA, Kashirskaya NY. National Consensus Project “Cystic fibrosis: definition, diagnostic criteria, treatment”. Section “Genetics of Cystic Fibrosis. Molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis”. *Medical Genetics.* 2016;15(11):29–45. Russian.
6. Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) [Internet]. Available from: https://www.cftr2.org/mutations_history.
7. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
8. Ryzhkova OP, Kardymon OL, Prohorchuk EB, Konovalov FA, Maslennikov AB, Stepanov VA, Afanasyev AA, Zaklyazminskaya EV, Kostareva AA, Pavlov AE, Golubenkov MV, Polyakov AV, Kutsev SI. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants. *Medical Genetics.* 2017;16(7):4–17. Russian.
9. Gouya L, Pascaud O, Munck A, Elion J, Denamur E. Novel mutation (A141D) in exon 4 of the CFTR gene identified in an Algerian patient. *Hum Mutat.* 1997;10(1):86–7. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1997)10:1<86::AID-HUMU15>3.0.CO;2-W.
10. Hinzpeter A, Aissat A, Sondo E, Costa C, Arous N, Gameiro C, Martin N, Tarze A, Weiss L, de Becdelièvre A, Costes B, Goossens M, Galletta LJ, Girodon E, Fanen P. Alternative splicing at a NAGNAG acceptor site as a novel phenotype modifier. *PLoS Genet.* 2010;6(10). pii: e1001153. doi: 10.1371/journal.pgen.1001153.
11. Wagner JA, Vassilakis A, Yee K, Li M, Hurlock G, Krouse ME, Moss RB, Wine JJ. Two novel mutations in a cystic fibrosis patient of Chinese origin. *Hum Genet.* 1999;104(6):511–5. doi: 10.1007/s004390050996.
12. Tian X, Liu Y, Yang J, Wang H, Liu T, Xu W, Li X, Zhu Y, Xu KF, Zhang X. p.G970D is the most frequent CFTR mutation in Chinese patients with cystic fibrosis. *Hum Genome Var.* 2016;3:15063. doi: 10.1038/hgv.2015.63.
13. Rozen R, De Braekeleer M, Daigneault J, Ferreira-Rajabi L, Gerdes M, Lamoureux L, Aubin G, Simard F, Fujiwara TM, Morgan K. Cystic fibrosis mutations in French Canadians: three CFTR mutations are relatively frequent in a Quebec population with an elevated incidence of cystic fibrosis. *Am J Med Genet.* 1992;42(3):360–4. doi: 10.1002/ajmg.1320420322.



J Med Genet. 1992;42(3):360–4. doi: 10.1002/ajmg.1320420322.

14. Hantash FM, Redman JB, Goos D, Kammeheidt A, McGinniss MJ, Sun W, Strom CM. Characterization of a recurrent novel large duplication in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. J Mol

Diagn. 2007;9(4):556–60. doi: 10.2353/jmol.2007.060141.

15. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Giron E, Johannesson M,

Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. J Cyst Fibros. 2008;7(3):179–96. doi: 10.1016/j.jcf.2008.03.009.

Characteristics of the mutation spectrum identified by comprehensive investigation of the *CFTR* gene in the Russian patients

N.V. Petrova¹ • A.Yu. Marakhonov¹ • T.A. Vasilyeva¹ •
N.Yu. Kashirskaya¹ • E.I. Kondratyeva¹ • E.K. Zhekayte¹ •
A.Yu. Voronkova¹ • V.D. Sherman¹ • V.A. Galkina¹ • E.K. Ginter¹ •
S.I. Kutsev¹ • R.A. Zinchenko^{1,2}

Rationale: Cystic fibrosis (CF; OMIM 219700) is a common hereditary disease caused by mutations in the *CFTR* gene (OMIM 602421). The distribution and frequencies of the *CFTR* gene mutations vary considerably between countries and ethnic groups. By now about 11% alleles of the *CFTR* gene remain unidentified after testing for frequent mutations in the Russian patients. A full determination of the mutation spectrum in the *CFTR* gene is necessary to optimize medical and genetic assistance to the population and to implement the achievements of targeted therapy in the treatment of CF patients. **Materials and methods:** The sample included 121 Russian CF patients, in whom testing for 34 routinely analyzed mutations did not identify one ($n=107$) or both ($n=14$) mutant alleles. Assessment of the coding sequence of the *CFTR* gene, including the regions of exon-intron junctions, 5'- and 3'-untranslated regions was performed by the Sanger sequencing method; in addition, the search for large rearrangements was conducted by the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method. **Results:** In addition to the previously identified, 88 more variants were determined, including 28 missense mutations, 15 nonsense mutations, 18 frameshift mutations (14 deletions, 4 insertions), 14 splicing mutations, 1 in-frame insertion, 1 in-frame deletion, 1 in/del mutation, and 10 large rearrangements (7 deletions, 3 duplications). Twenty three (23) novel variants were

sequenced. Four (4) complex mutant alleles were found. Sixty (60) variants are found once each. One hundred and thirty four (134) of 135 tested mutant alleles were identified. **Conclusion:** Consequent use of the sequencing and MLPA methods has allowed for identification of a high proportion of the tested mutant alleles in CF patients from Russia (134/135, >99%), to detect a significant diversity of the *CFTR* mutation spectrum (88 additional variants, 32 of them novel), a number of repeated mutations (c.2353C>T, c.1240_1244delCAAAA, c.1766+1G>A and c.3929G>A) encountered in 5 or more unrelated patients, which could be included in the panel of routinely analyzed variants in the Russian CF patients; and a high proportion of large rearrangements of the *CFTR* gene.

Key words: cystic fibrosis, *CFTR* gene, gene variants, mutations, large genomic rearrangements, complex allele, Russian population

For citation: Petrova NV, Marakhonov AY, Vasilyeva TA, Kashirskaya NY, Kondratyeva EI, Zhekayte EK, Voronkova AY, Sherman VD, Galkina VA, Ginter EK, Kutsev SI, Zinchenko RA. Characteristics of the mutation spectrum identified by comprehensive investigation of the *CFTR* gene in the Russian patients. Almanac of Clinical Medicine. 2019;47(1):38–46. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-004.

Received 15 October 2018; accepted 22 October 2018; published 07 February 2019

Nika V. Petrova – PhD, Doctor of Biol. Sci., Leading Research Fellow, Laboratory of Genetic Epidemiology¹

✉ 1 Moskvorech'e ul., Moscow, 115522, Russian Federation. Tel.: +7 (499) 320 60 90. E-mail: npetrova63@mail.ru

Andrey Yu. Marakhonov – PhD (in Biol.), Senior Research Fellow, Laboratory of Genetic Epidemiology¹

Tatyana A. Vasilyeva – Research Fellow, Laboratory of Genetic Epidemiology¹

Nataliya Yu. Kashirskaya – MD, PhD, Professor, Chief Research Fellow, Laboratory of Genetic Epidemiology¹

Elena I. Kondratyeva – MD, PhD, Professor, Head of Clinical and Consulting Department of Cystic Fibrosis¹

Elena K. Zhekayte – MD, Research Fellow, Clinical and Consulting Department of Cystic Fibrosis¹

Anna Yu. Voronkova – MD, PhD, Senior Research Fellow, Clinical and Consulting Department of Cystic Fibrosis¹

Viktoriya D. Sherman – MD, PhD, Senior Research Fellow, Clinical and Consulting Department of Cystic Fibrosis¹

Varvara A. Galkina – MD, PhD, Senior Research Fellow, Laboratory of Genetic Epidemiology¹

Eugeny K. Ginter – PhD, Doctor of Biol. Sci., Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Head¹

Sergey I. Kutsev – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director¹

Rena A. Zinchenko – MD, PhD, Professor, Head of Laboratory of Genetic Epidemiology¹; Professor of Clinical Pharmacology Course of the Chair of Organizational and Legal Support of Medical and Pharmaceutical Activities, Postgraduate Training Faculty²

¹ Medical Genetic Science Center; 1 Moskvorech'e ul., Moscow, 115522, Russian Federation

² Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

Funding

The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 17-15-01051.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.



Оригинальная статья

Гиперметилирование генов микроРНК miR-124, miR-125b, miR-127 и miR-129 в карциноме яичников вовлечено в подавление их экспрессии и ассоциировано как с развитием, так и с прогрессией рака яичников

Брага Э.А.^{1,2} • Пронина И.В.¹ • Уткин Д.О.³ • Филиппова Е.А.¹ • Бурденный А.М.¹ • Логинов В.И.^{1,2} • Фридман М.В.⁴ • Казубская Т.П.⁵ • Кушлинский Н.Е.⁵

Брага Элеонора Александровна – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотр., заведующая лабораторией патогеномики и транскриптомики¹; вед. науч. сотр. лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний²

✉ 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8, Российская Федерация.
Тел.: +7 (917) 545 43 93.
E-mail: eleonora10_45@mail.ru

Пронина Ирина Валерьевна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики¹

Уткин Дмитрий Олегович – врач-хирург, соискатель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования³

Филиппова Елена Александровна – аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики¹

Бурденный Алексей Михайлович – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики¹

Логинов Виталий Игоревич – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики¹; ст. науч. сотр. лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний²

Фридман Марина Владиславовна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории системной биологии и вычислительной генетики⁴

Казубская Татьяна Павловна – д-р мед. наук, врач-онкогенетик, ст. науч. сотр. лаборатории клинической онкогенетики⁵

Кушлинский Николай Евгеньевич – д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии⁵

Обоснование. Ранее нами определена группа генов микроРНК (*MIR-107*, *MIR-125B*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3* и др.), метилирование которых вовлечено в развитие и прогрессию рака яичников. **Цель** – расширить спектр генов микроРНК, гиперметируемых при раке яичников, и изучить роль этой модификации в патогенезе и прогрессии рака яичников. **Материал и методы.** Исследование выполнено на выборке из 76 образцов рака яичников и 13 перитонеальных метастазах. Использовали метод бисульфитной конверсии ДНК с последующей метилспецифичной полимеразной цепной реакцией (ПЦР) для оценки статуса метилирования генов микроРНК и количественную ПЦР в реальном времени для оценки уровня их экспрессии. **Результаты.** Показано значимое повышение частот метилирования в образцах опухолей в сравнении с гистологически неизменной тканью яичников для 6 исследованных генов микроРНК: *MIR-124-1*, *MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2* ($p \leq 10^{-3}$). Установлено подавление уровня экспрессии 4 микроРНК (*miR-124-3p*, *miR-125b-5p*, *miR-127-5p*, *miR-129-5p*), кодируемых этими генами, и значимая корреляция между изменениями уровней их экспрессии и метилированием генов ($r_s = 0,63-0,94$, $p \leq 10^{-4}$). Кроме того, выявлены статистически значимые ассоциации метилирования 5 генов (*MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*) с параметрами прогрессии

рака: с клинической стадией, метастазированием, а также с размером и степенью инвазии опухоли, и в меньшей мере – со снижением степени дифференцировки. Связь с метастазированием 5 генов микроРНК подтверждена при анализе перитонеальных макрометастазов от 13 пациенток. **Заключение.** Продemonстрировано функциональное значение aberrантного метилирования группы генов микроРНК в подавлении их экспрессии в карциномах яичников. Показана ассоциация гиперметилирования генов микроРНК с прогрессией рака яичников, включая метастазирование в брюшину.

Ключевые слова: рак яичников, гены микроРНК, гиперметилирование, метастазирование, перитонеальные макрометастазы

Для цитирования: Брага ЭА, Пронина ИВ, Уткин ДО, Филиппова ЕА, Бурденный АМ, Логинов ВИ, Фридман МВ, Казубская ТП, Кушлинский НЕ. Гиперметилирование генов микроРНК miR-124, miR-125b, miR-127 и miR-129 в карциноме яичников вовлечено в подавление их экспрессии и ассоциировано как с развитием, так и с прогрессией рака яичников. Альманах клинической медицины. 2019;47(1):47–53. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-003.

Поступила 19.11.2018; принята к публикации 03.12.2018; опубликована 31.01.2019

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8, Российская Федерация

² ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России; 127473, г. Москва, ул. Делегатская, 20–1, Российская Федерация

⁴ ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН; 119333, г. Москва, ул. Губкина, 3, Российская Федерация

⁵ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация



Важное место в развитии и прогрессии злокачественных опухолей принадлежит микроРНК [1]. Это семейство коротких рибонуклеиновых кислот длиной 19–24 нуклеотидов, не кодирующих белки или пептиды, но выполняющих функцию посттранскрипционного регулятора экспрессии генов-мишеней и имеющих ключевое значение в онкогенезе. МикроРНК отличается широкая мультитаргетность и способность к наиболее динамичной регуляции генов.

Рак яичников представляет собой группу крайне агрессивных злокачественных опухолей с высокой частотой летальных исходов, что обусловлено выявлением заболевания на поздних стадиях, осложненных метастазированием в лимфатические узлы, брюшину и отдаленные органы [2]. При обнаружении опухолей яичников на I–II клинических стадиях уровень 5-летней выживаемости достигает 70%; однако более половины случаев диагностируют на поздних стадиях, когда уровень 5-летней выживаемости в среднем составляет 30%.

К настоящему времени накоплена обширная информация о влиянии микроРНК на развитие и прогрессию рака яичников [3]. Показано, что в диагностике и прогнозе течения этого заболевания перспективны профили экспрессии микроРНК [4]. Кроме самих микроРНК системную роль в регуляции их генов-мишеней играют факторы, изменяющие уровень их экспрессии, в том числе aberrантное метилирование регуляторных CpG-островков генов микроРНК. Интересно отметить: среди генов микроРНК гиперметилирование регуляторных CpG-островков встречается в несколько раз чаще, чем среди генов, кодирующих белки [5, 6], что делает их перспективными маркерами опухолей. Профили гиперметилирования генов микроРНК предложены как потенциальные маркеры для диагностики и прогноза рака разной локализации, в частности, рака толстой кишки [7]. В то же время анализ гиперметилирования генов микроРНК в опухолях яичников ограничен единичными исследованиями, например, относительно aberrантного метилирования генов семейства miR-9 [8].

Недавно нами определена группа генов микроРНК (*MIR-107*, *MIR-1258*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3* и др.), метилирование которых вовлечено в развитие и прогрессию рака яичников [9].

Цель данной работы – расширить спектр генов микроРНК, гиперметируемых при раке яичников, и изучить роль метилирования в подавлении экспрессии микроРНК, а также возможную ассоциацию метилирования генов микроРНК с прогрессией этого вида рака.

Материал и методы

Образцы рака яичников собраны и морфологически охарактеризованы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Основами законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан, от всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании. Анализировали образцы рака яичников у больных, которые до операции не получали лучевую или химиотерапию. Все опухоли яичников были классифицированы в соответствии с системой TNM Международного противоракового союза (Union for International Cancer Control's – UICC) и гистологически верифицированы на основании критериев классификации Всемирной организации здравоохранения [10]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70–80%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3–5 мкм), окрашенных гематоксилин-эозином. В исследовании использованы парные образцы опухолей и гистологически неизмененных тканей яичников, полученные от 76 женщин, больных раком яичников, включая 45 образцов от пациенток, у которых не было выявлено метастазов, и 31 образец от пациенток, у которых выявлены метастазы в регионарных лимфатических узлах и/или в брюшине, в отдаленных органах. Кроме того, исследованы 13 образцов первичных опухолей, для которых были также собраны образцы метастазов, обнаруженных в брюшине. Клинико-гистологические характеристики всех опухолевых образцов приведены в табл. 1.

Образцы тканей хранили при -70°C . Замороженную в жидком азоте ткань измельчали с помощью гомогенизатора-диспергатора SilentCrusher S («Heidolph», Германия). Высокомолекулярную ДНК и РНК выделяли из ткани по стандартной методике. Бисульфитную конверсию ДНК и метилспецифичную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили, как описано ранее [11]. Модифицированную бисульфитом ДНК (1–2 мкг) очищали с помощью Centrifugal Filter Microcon, Ultracel YM-30 («Millipore», США), хранили при -20°C и использовали в качестве матрицы при выполнении метилспецифичной ПЦР. ПЦР проводили в амплификаторе DNA Engine Dyad Cyclor T-100 («Bio-Rad», США) с использованием олигонуклеотидов и условий амплификации, описанных в работе [11]. Для каждого гена анализировали от 3 до 6 CpG-динуклеотидов. Препарат метилированной ДНК человека (#SD1131, «Thermo Scientific») использовали как контроль для



Клинические и гистологические характеристики	N = 76	N = 13
Гистологический тип опухоли		
пограничная серозная аденома	6	0
S	67	12
E	5	1
CC	2	0
Mu	2	0
Стадия		
I	13	0
II	14	0
III	44	13
IV	5	0
Степень дифференцировки		
G1	9	0
G2	18	7
G3	42	6
Перитонеальные метастазы		
T3b	1	3
T3c	22	10
Поражение регионарных лимфоузлов		
N0	55	12
N1	21	1
Отдаленные метастазы		
M0	71	13
M1	5	0

Таблица 1.

Клинические и гистологические характеристики основной выборки из 76 образцов первичных опухолей и дополнительной выборки из 13 первичных опухолей и перитонеальных метастазов

S – серозная цистаденокарцинома, E – эндометриоидная цистаденокарцинома, Mu – муцинозная цистаденокарцинома, CC – светлоклеточная цистаденокарцинома, G3 – низко дифференцированная, G2 – умеренно дифференцированная, G1 – высоко дифференцированная

метилованного аллеля, а препарат неметилованной ДНК человека (Male, #G1471, “Promega”) – как контроль для неметилованного аллеля. Продукты ПЦР от разных генов разделяли одновременно с использованием 2% агарозного геля. Чтобы определить интенсивность люминесценции продукта ПЦР, применяли Gel DOC Ez Imager software (“Bio-Rad”). Метилирование учитывали в образцах, в которых сигнал был эквивалентен маркеру (7 нг/мкл).

Уровни экспрессии 4 микроРНК оценивали методом количественной ПЦР в реальном времени с использованием кДНК, полученной для каждого образца, как описано ранее [11], и наборов TaqMan MicroRNA Assays (“Applied Biosystems”, США): miR-124-3p (Assay ID: 001182), miR-125b-5p (Assay ID: 000449), miR-127-5p (Assay ID: 002229) и miR-129-5p (Assay ID: 000590). Для нормализации применяли RNU48 (Assay ID: 001006) и RNU6 (Assay ID: 001093). Все реакции повторяли трижды и с добавлением пробы на отрицательный контроль (без добавления кДНК). Для анализа данных использовали относительную количественную оценку по $\Delta\Delta Ct$ -методу, менее чем двукратные изменения ($|\Delta\Delta Ct| \leq 1$) на уровне микроРНК рассматривались как отсутствие изменений (то есть значениям $\Delta\Delta Ct$

был присвоен 0), а остальные значения $\Delta\Delta Ct$ были округлены до ближайшего целого числа [11].

Для статистической обработки полученных данных использовали программу IBM SPSS Statistics 20. Статистический анализ проводили с применением точного критерия Фишера, изменения считали значимыми при $p \leq 0,05$. Применен корреляционный анализ для сопоставления изменений уровня экспрессии и метилирования генов с определением коэффициента Спирмена (r_s). Достоверность значений p проверяли с помощью поправки Бенджамини – Хохберга на множественное сравнение; результат считали значимым при FDR (false discovery rate), равном 0,05 или ниже.

Результаты

Частоты встречаемости метилирования 6 генов микроРНК (MIR-124-1, MIR-124-2, MIR-124-3, MIR-125B-1, MIR-127, MIR-129-2), исследованных с использованием представительной выборки образцов тканей яичников от 76 пациенток, приведены в табл. 2. Результаты анализа показали статистически значимое повышение частоты метилирования всех 6 исследованных генов в образцах опухолей по сравнению с парными образцами гистологически неизмененных тканей яичников (29–62% против 4–9%; $p \leq 0,001$, FDR=0,01, см. табл. 2). Эти результаты позволяют предположить связь метилирования данных 6 генов с патогенезом рака яичников.

Исследуемые 6 генов кодируют 4 микроРНК (miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p), изменения их экспрессии были изучены на подвыборке из 29 образцов рака яичников (табл. 3). У всех 4 исследованных микроРНК наблюдалась высокая частота снижения экспрессии. Так, уровень miR-125b-5p был снижен в 59% образцов рака яичников, miR-129-5p – в 55% ($p \leq 0,05$ по Фишеру, FDR=0,05, см. табл. 3). Что касается miR-124-3p и miR-127-5p, дифференциальная экспрессия (когда и снижение, и повышение наблюдаются с достаточно высокой частотой) отмечена в 76 и 58% образцов рака яичников. При этом для miR-124-3p снижение выявлено почти вдвое чаще, чем повышение (48 против 28%), а у miR-127-5p снижение было в 2,4 раза чаще, чем повышение (41 против 17%). Таким образом, для всех исследованных 4 микроРНК наиболее свойственно снижение экспрессии при раке яичников, что может быть вызвано метилированием регуляторных CpG-островков.

Результаты, полученные на общей подвыборке из 29 парных (опухоль/норма) образцов, были использованы для анализа корреляций между изменениями уровней экспрессии и метилирования

**Таблица 2.** Частота метилирования 6 генов микроРНК в карциноме яичников

Ген микроРНК	Локализация	Опухоль	Условно нормальная ткань	Значение <i>p</i>
<i>MIR-124-1</i>	8p23.1	29%, 22/76	7%, 5/76	5×10^{-4}
<i>MIR-124-2</i>	8q12.3	41%, 31/76	4%, 3/76	3×10^{-8}
<i>MIR-124-3</i>	20q13.33	49%, 37/76	8%, 6/76	2×10^{-8}
<i>MIR-125B-1</i>	11q24.1	57%, 43/76	9%, 7/76	4×10^{-10}
<i>MIR-127</i>	14q32.2	46%, 35/76	7%, 5/76	3×10^{-8}
<i>MIR-129-2</i>	11p11.2	62%, 47/76	7%, 5/76	2×10^{-13}

Даны процент и число образцов, в которых данный ген микроРНК метилирован, от общего количества образцов ($n = 76$). Условная норма соответствует парным образцам гистологически неизменной ткани яичников ($n = 76$). Статистическая значимость (p) определена по тесту Фишера и подтверждена с учетом поправки Бенджамини – Хохберга на множественное сравнение ($FDR = 0,01$)

Таблица 3. Частота изменений экспрессии 4 микроРНК в карциноме яичников

МикроРНК	Снижение	Повышение	Изменений нет
miR-124-3p	48% (14/29)*	28% (8/29)	24% (7/29)
miR-125b-5p	59% (17/29)**	14% (4/29)	28% (8/29)
miR-127-5p	41% (12/29)*	17% (5/29)	34% (10/29)
miR-129-5p	55% (16/29)**	14% (4/29)	31% (9/29)

Данные количественной полимеразной цепной реакции, полученные на подвыборке из 29 парных образцов рака яичников. Применен тест Фишера

* Статистически значимое превышение частоты снижений экспрессии над увеличениями

** Преобладание случаев со снижением в 2–3 раза (но незначимое статистически)

для 4 микроРНК и 6 кодирующих их генов. Строгая корреляция выявлена между относительным уровнем экспрессии 4 микроРНК (miR-124-3p, -125b-5p, -127-5p, -129-5p) и изменениями метилирования 5 из 6 генов (кроме гена *MIR-124-2*). Коэффициент корреляции Спирмена (r_s) для 5 генов изменялся в пределах 0,63–0,94 ($p \leq 10^{-4}$). При оценке поправки Бенджамини – Хохберга на множественное сравнение величина $p = 10^{-4}$ найдена значимой при $FDR = 0,01$. Коэффициент корреляции Спирмена (r_s) для гена *MIR-124-2* составил 0,27 ($p = 0,15$), что незначимо. Очевидно, метилирование генов *MIR-124-1* и *MIR-124-3* вносит наибольший вклад в подавление экспрессии miR-124-3p.

Данные по частотам метилирования исследованных генов микроРНК, полученные на репрезентативной выборке из 76 образцов рака яичников, были сопоставлены с клинико-гистологическими характеристиками пациенток (табл. 4). Как видно из данных табл. 4, выявлена

значимая ассоциация метилирования 5 генов (*MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*) с более тяжелыми стадиями ($p \leq 0,02$). Проведено сравнение частот метилирования всех исследованных генов микроРНК в группе пациенток, у которых диагностировано метастазирование в региональных лимфатических узлах, и/или отдаленных органах, и/или в брюшине (31 женщина), и в группе пациенток, у которых метастазирование не обнаружено (45 женщин). Показана высоко значимая ($p \leq 0,01$) ассоциация гиперметилирования с метастазированием для тех же 5 генов (*MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*) (см. табл. 4). Кроме того, для 4 генов – *MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-129-2* – установлена связь метилирования с размером и степенью инвазии опухоли ($p \leq 0,01$, см. табл. 4). Интересно отметить, что наиболее значимую связь с метастазированием проявил ген *MIR-124-2* ($p \leq 10^{-6}$), а со стадией и размером опухоли – *MIR-129-2* ($p \leq 10^{-5}$).

Обнаружена также связь метилирования этих генов с понижением степени дифференцировки (при переходе от умеренно- и высокодифференцированных опухолей к низкодифференцированным), однако менее выражено (данные не представлены). Так, наиболее значимая ассоциация с понижением степени дифференцировки отмечена для *MIR-129-2* ($p \leq 10^{-3}$).

Поскольку метастазирование – наиболее важный из связанных с выживаемостью прогностических факторов, метилирование 5 генов, ассоциированных с метастазированием (*MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*), было изучено на дополнительной выборке из образцов опухолей, собранных вместе с метастазами опухоли яичника в брюшину во время хирургического удаления опухоли у 13 пациенток. Дополнительная выборка образцов включала: 3 триплета, состоящие из образцов условно нормальных тканей, первичных опухолей и перитонеальных метастазов, а также 10 первичных опухолей и 10 парных перитонеальных метастазов. Анализ данных показал наличие метилирования всех 5 генов микроРНК в большинстве первичных опухолей и перитонеальных метастазов, как в триплетах, так и парах, но отсутствие метилирования генов микроРНК в нормальных образцах, представленных в 3 триплетах. Исключения, а именно метилирование генов *MIR-124-3* и *MIR-125B-1* в 2 единичных образцах условной нормы (составившие 13%) и, наоборот, отсутствие метилирования одного из генов в 2 образцах макрометастазов и в единственном образце опухоли составили 13 и 11% соответственно.

**Таблица 4.** Ассоциация метилирования 6 генов микроРНК с прогрессией рака яичников

Группа	Ген микроРНК					
	MIR-124-1	MIR-124-2	MIR-124-3	MIR-125B-1	MIR-127	MIR-129-2
I/II	5/27, 19%	4/27, 15%	7/27, 26%	8/27, 30%	7/27, 26%	7/27, 26%
III/IV	17/49, 35%	27/49, 55%	30/49, 61%	35/49, 71%	28/49, 57%	40/49, 82%
P	0,2	0,6 × 10 ^{-3*}	0,004*	0,6 × 10 ^{-3*}	0,02*	4 × 10 ^{-6**}
Нет	10/45, 22%	8/45, 18%	16/45, 36%	17/45, 38%	15/45, 33%	21/45, 47%
Есть	12/31, 39%	23/31, 74%	21/31, 68%	26/31, 84%	20/31, 64%	26/31, 84%
P	0,1	1 × 10 ^{-6**}	0,01*	0,7 × 10 ^{-4*}	0,01*	0,002*
T1	1/13, 8%	1/13, 8%	2/13, 15%	1/13, 8%	3/13, 23%	3/13, 23%
T2	4/15, 27%	4/15, 27%	6/15, 40%	8/15, 53%	6/15, 40%	5/15, 33%
T3	17/48, 35%	26/48, 54%	29/48, 60%	34/48, 71%	26/48, 54%	39/48, 81%
P	0,2	0,004*	0,01*	1 × 10 ^{-4*}	0,1	1 × 10 ^{-5**}

I/II – ранние, III/IV – поздние клинические стадии; «нет» – группа пациенток без метастазов, «есть» – группа пациенток с метастазами; T1, T2, T3 характеризуют размер и степень инвазии опухоли и соответствуют T1a–c, T2a–c, T3a–c [10]. С учетом поправки Бенджамини – Хохберга на множественное сравнение значения $p \leq 0,01$ статистически достоверны при FDR = 0,05

* Статистически значимые величины p

** Наиболее высоко значимые величины p

Обсуждение

Полученные нами результаты свидетельствуют о системной роли гиперметилирования 6 генов микроРНК (MIR-124-1, MIR-124-2, MIR-124-3, MIR-125B-1, MIR-127, MIR-129-2) в эпигенетической модификации ДНК в процессе развития первичных опухолей, которая приводит к подавлению их экспрессии. Это подтверждает функциональную роль aberrантного метилирования регуляторных областей генов в патогенезе рака яичников. Кроме того, показана ассоциация гиперметилирования 5 генов микроРНК (MIR-124-2, MIR-124-3, MIR-125B-1, MIR-127, MIR-129-2) с прогрессией рака яичников: с более поздней стадией, с увеличением размера опухоли и инвазии, а также с метастазированием в брюшину, региональные лимфоузлы и отдаленные ткани. При этом данные по связи метилирования 5 генов микроРНК с метастазированием валидированы в образцах перитонеальных макрометастазов.

В отношении дальнейших эпигенетических aberrаций в клетках уже вторичных опухолей мы не обнаружили значимых изменений в статусе метилирования данных 5 генов микроРНК в перитонеальных метастазах в сравнении с первичной опухолью. Очевидно, требуются дальнейшие исследования на

более представительных выборках образцов макрометастазов. Так, в работе W.A. Schrijver и соавт. с участием Голландского консорциума по макрометастамам рака молочной железы (Dutch Distant Breast Cancer Metastases Consortium) отмечено, что изменения экспрессии микроРНК в макрометастазах в сравнении с первичной «метастазирующей» опухолью не такие выраженные, как между «метастазирующей» опухолью и «неметастазирующей», хотя и выявлено изменение уровня экспрессии отдельных микроРНК [12].

Как известно, метастатические клетки в процессе продвижения от первичной опухоли претерпевают дальнейшие изменения, например, эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), который может динамично обращаться вспять, и тогда клетки могут претерпевать обратный – мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП), как и другие процессы репрограммирования опухолевой клетки в процессе ее миграции и колонизации в органе-мишени [3]. По-видимому, вторичная опухоль может, в частности, обладать характеристиками эпителиальных клеток в большей степени, чем исходная родительская опухоль. Так, интересная особенность обнаружена для miR-424, уровень которой повышен в первичных опухолях рака молочной железы, но понижен в метастазах по сравнению с родительскими первичными опухолями [13]. Авторы предполагают двухфазное изменение экспрессии этой микроРНК при смене ЭМП на МЭП. При ЭМП miR-424 проявляет свойства онкогена, а при обратном переходе, МЭП, она выступает как антиметастатическая и супрессорная микроРНК.

Следует отметить: несмотря на то, что к настоящему времени накоплена обширная информация о влиянии микроРНК на метастазирование рака яичников (точнее, на свойства «метастазирующих» первичных опухолей [3]), практически отсутствуют работы, направленные на изучение функции микроРНК и тем более метилирования генов микроРНК в макрометастазах, в том числе перитонеальных метастазах рака яичников. И эта задача представляется весьма актуальной и интересной.

Выводы

Установлено функциональное значение aberrантного метилирования группы генов микроРНК в подавлении их экспрессии в карциномах яичников.

Показана ассоциация гиперметилирования генов микроРНК с прогрессией рака яичников, включая метастазирование в брюшину. ©



Дополнительная информация

Финансирование

Исследование выполнено за счет средств Российского научного фонда, грант 14-15-00654.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Э.А. Брага – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста статьи; И.В. Пронина – проведение эксперимента по анализу экспрессии

генов и анализ результатов; Д.О. Уткин – сбор клинического материала и анализ клинко-гистологических характеристик образцов; Е.А. Филиппова и А.М. Бурденный – проведение части эксперимента по анализу метилирования генов и анализ результатов; В.И. Логинов – концепция и дизайн экспериментальной части исследования, анализ и интерпретация результатов исследования; М.В. Фридман – биоинформатический анализ, статистический анализ; Т.П. Казубская – сбор клинического материала и клинко-гистологических характеристик образцов, редактирование текста; Н.Е. Кушлинский – организация сбора клинического материала, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста статьи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Литература

1. Логинов ВИ, Рыков СВ, Фридман МВ, Брага ЭА. Метилирование генов микрорнк и онкогенез (обзор). Биохимия. 2015;80(2): 184–203.
2. Kinose Y, Sawada K, Nakamura K, Kimura T. The role of microRNAs in ovarian cancer. Biomed Res Int. 2014;2014:249393. doi: 10.1155/2014/249393.
3. Брага ЭА, Фридман МВ, Кушлинский НЕ. Молекулярные механизмы в метастазировании рака яичников: ключевые гены и регуляторные микроРНК. Биохимия. 2017;82(5): 717–31.
4. Shi M, Mu Y, Zhang H, Liu M, Wan J, Qin X, Li C. MicroRNA-200 and microRNA-30 family as prognostic molecular signatures in ovarian cancer: A meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2018;97(32):e11505. doi: 10.1097/MD.00000000000011505.
5. Kunej T, Godnic I, Ferdin J, Horvat S, Dovc P, Calin GA. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. Mutat Res. 2011;717(1–2):77–84. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.008.
6. Piletič K, Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. Arch Toxicol. 2016;90(10):2405–19. doi: 10.1007/s00204-016-1815-7.
7. Weisenberger DJ, Liang G, Lenz HJ. DNA methylation aberrancies delineate clinically distinct subsets of colorectal cancer and provide novel targets for epigenetic therapies. Oncogene. 2018;37(5):566–77. doi: 10.1038/onc.2017.374.
8. Li X, Pan Q, Wan X, Mao Y, Lu W, Xie X, Cheng X. Methylation-associated Has-miR-9 deregulation in paclitaxel-resistant epithelial ovarian carcinoma. BMC Cancer. 2015;15:509. doi: 10.1186/s12885-015-1509-1.
9. Брага ЭА, Логинов ВИ, Бурденный АМ, Филиппова ЕА, Пронина ИВ, Куревлев СВ, Казубская ТП, Кушлинский ДН, Уткин ДО, Ермилова ВД, Кушлинский НЕ. Пять гиперметилированных генов микрорнк как потенциальные маркеры рака яичников. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017;164(9):335–40.
10. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, editors. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Vol. 6. Lyon: IARC; 2014. 307 p.
11. Pronina IV, Loginov VI, Burdennyy AM, Fridman MV, Senchenko VN, Kazubskaya TP, Kushlinskii NE, Dmitriev AA, Braga EA. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. Gene. 2017;604:1–8. doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018.
12. Schrijver WA, van Diest PJ; Dutch Distant Breast Cancer Metastases Consortium, Moelans CB. Unravelling site-specific breast cancer metastasis: a microRNA expression profiling study. Oncotarget. 2017;8(2):3111–23. doi: 10.18632/oncotarget.13623.
13. Drasin DJ, Guarnieri AL, Neelakantan D, Kim J, Cabrera JH, Wang CA, Zaberezhnyy V, Gasparini P, Cascione L, Huebner K, Tan AC, Ford HL. TWIST1-Induced miR-424 Reversibly Drives Mesenchymal Programming while Inhibiting Tumor Initiation. Cancer Res. 2015;75(9):1908–21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2394.
1. Loginov VI, Rykov SV, Fridman MV, Braga EA. Methylation of miRNA genes and oncogenesis. Biochemistry (Mosc). 2015;80(2):145–62. doi: 10.1134/S0006297915020029.
2. Kinose Y, Sawada K, Nakamura K, Kimura T. The role of microRNAs in ovarian cancer. Biomed Res Int. 2014;2014:249393. doi: 10.1155/2014/249393.
3. Braga EA, Fridman MV, Kushlinskii NE. Molecular mechanisms of ovarian carcinoma metastasis: Key genes and regulatory microRNAs. Biochemistry (Mosc). 2017;82(5): 529–41. doi: 10.1134/S0006297917050017.
4. Shi M, Mu Y, Zhang H, Liu M, Wan J, Qin X, Li C. MicroRNA-200 and microRNA-30 family as prognostic molecular signatures in ovarian cancer: A meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2018;97(32):e11505. doi: 10.1097/MD.00000000000011505.
5. Kunej T, Godnic I, Ferdin J, Horvat S, Dovc P, Calin GA. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. Mutat Res. 2011;717(1–2):77–84. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.008.
6. Piletič K, Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. Arch Toxicol. 2016;90(10):2405–19. doi: 10.1007/s00204-016-1815-7.
7. Weisenberger DJ, Liang G, Lenz HJ. DNA methylation aberrancies delineate clinically distinct subsets of colorectal cancer and provide novel targets for epigenetic therapies. Oncogene. 2018;37(5):566–77. doi: 10.1038/onc.2017.374.
8. Li X, Pan Q, Wan X, Mao Y, Lu W, Xie X, Cheng X. Methylation-associated Has-miR-9 deregulation in paclitaxel-resistant epithelial ovarian carcinoma. BMC Cancer. 2015;15:509. doi: 10.1186/s12885-015-1509-1.
9. Braga EA, Loginov VI, Burdennyy AM, Filippova EA, Pronina IV, Kurevlev SV, Kazubskaya TP, Kushlinskii DN, Utkin DO, Ermilova VD, Kushlinskii NE. Five hypermethylated microRNA genes as potential markers of ovarian cancer. Bull Exp Biol Med. 2018;164(3):351–5. doi: 10.1007/s10517-018-3988-y.
10. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, editors. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Vol. 6. Lyon: IARC; 2014. 307 p.



11. Pronina IV, Loginov VI, Burdenny AM, Fridman MV, Senchenko VN, Kazubskaya TP, Kushlinskii NE, Dmitriev AA, Braga EA. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene*. 2017;604:1–8. doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018.

12. Schrijver WA, van Diest PJ; Dutch Distant Breast Cancer Metastases Consortium, Moelans CB. Unravelling site-specific breast cancer metastasis: a microRNA expression profiling study. *Oncotarget*. 2017;8(2):3111–23. doi: 10.18632/oncotarget.13623.

13. Drasin DJ, Guarnieri AL, Neelakantan D, Kim J, Cabrera JH, Wang CA, Zaberezhny V,

Gasparini P, Cascione L, Huebner K, Tan AC, Ford HL. TWIST1-Induced miR-424 Reversibly Drives Mesenchymal Programming while Inhibiting Tumor Initiation. *Cancer Res*. 2015;75(9):1908–21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2394.

Hypermethylation of the microRNA miR-124, miR-125b, miR-127, and miR-129 in ovarian carcinoma is involved in suppression of their expression and associated with both the development and progression of ovarian cancer

E.A. Braga^{1,2} • I.V. Pronina¹ • D.O. Utkin³ • E.A. Filippova¹ • A.M. Burdenny¹ • V.I. Loginov^{1,2} • M.V. Fridman⁴ • T.P. Kazubskaya⁵ • N.E. Kushlinskii⁵

Rationale: We have previously identified a group of microRNA genes (*MIR-107*, *MIR-1258*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3* et al.), whose methylation was involved into the development and progression of ovarian cancer. **Aim:** To expand the range of microRNA genes hypermethylated in ovarian cancer and to study the role of this modification in the pathogenesis and progression of ovarian cancer. **Materials and methods:** The study was performed on a series of 76 ovarian cancer and 13 peritoneal metastases samples. The method of bisulfite DNA conversion followed by methylation-specific polymerase chain reaction (PCR) was used to assess the methylation status of the microRNA genes; the expression of these genes was measured by quantitative real-time PCR. **Results:** Compared to histologically unchanged ovarian tissue, there was a significant increase in methylation frequencies in the tumor samples for 6 microRNA genes studied: *MIR-124-1*, *MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, and *MIR-129-2* ($p \leq 10^{-3}$). The expression level of 4 microRNAs (miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p) encoded by these genes was suppressed, with a significant correlation between changes in their expression levels and the gene methylation ($r_s = 0.63–0.94$, $p \leq 10^{-4}$). In addition, there were statistically significant associations between methylation of 5 genes (*MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, and *MIR-129-2*) and the parameters of cancer progression,

such as its clinical stage, metastatic spread, tumor size and invasion, and to a lesser extent with a decrease in the differentiation grade. The association of 5 microRNA genes with metastatic spread was confirmed by the analysis of peritoneal macro-metastases from 13 patients. **Conclusion:** We have demonstrated the functional significance of aberrant methylation in a group of microRNA genes for suppression of their expression in ovarian carcinomas. There is an association of microRNA gene hypermethylation with the progression of ovarian cancer, including metastatic spread to the peritoneum.

Key words: ovarian cancer, microRNA genes, hypermethylation, metastasis, peritoneal macro-metastases

For citation: Braga EA, Pronina IV, Utkin DO, Filippova EA, Burdenny AM, Loginov VI, Fridman MV, Kazubskaya TP, Kushlinskii NE. Hypermethylation of the microRNA miR-124, miR-125b, miR-127, and miR-129 in ovarian carcinoma is involved in suppression of their expression and associated with both the development and progression of ovarian cancer. *Almanac of Clinical Medicine*. 2019;47(1):47–53. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-003.

Received 19 November 2018; accepted 03 December 2018; published 31 January 2019

Funding

The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 14-15-00654.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Eleonora A. Braga – PhD, Doctor of Biol. Sci., Professor, Chief Research Fellow, Head of the Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹; Leading Research Fellow, Laboratory of Molecular Genetics of Complicated Inherited Diseases²
✉ 8 Baltiyskaya ul., Moscow, 125315, Russian Federation. Tel.: +7 (917) 545 43 93.
E-mail: eleonora10_45@mail.ru

Irina V. Pronina – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹

Dmitriy O. Utkin – MD, Surgeon, Applicant, Chair of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Faculty of Postgraduate Education³

Elena A. Filippova – Postgraduate Student, Junior Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹

Alexey M. Burdenny – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹

Vitaly I. Loginov – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹; Senior Research Fellow, Laboratory of Molecular Genetics of Complicated Inherited Diseases²

Marina V. Fridman – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Systems Biology and Computational Genetics⁴

Tatiana P. Kazubskaya – MD, PhD, Oncogenetic Physician, Senior Research Fellow, Laboratory of Clinical Oncogenetics⁵

Nikolay E. Kushlinskii – MD, PhD, Professor, Member-Correspondent of Russian Academy of Sciences, Head of Clinical Biochemistry Laboratory⁵

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8 Baltiyskaya ul., Moscow, 125315, Russian Federation

²Medical Genetic Science Center; 1 Moskvorech'e ul., Moscow, 115522, Russian Federation

³A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry; 20–1 Delegatskaya ul., Moscow, 127473, Russian Federation

⁴Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences; 3 Gubkina ul., Moscow, 119333, Russian Federation

⁵N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation



Оригинальная статья

Алгоритм молекулярно-генетического обследования для выявления наследственного *BRCA*-ассоциированного рака молочной железы

Снигирева Г.П.¹ • Румянцева В.А.² • Новикова Е.И.¹ • Новицкая Н.Н.¹ • Телышева Е.Н.¹ • Хазинс Е.Д.¹ • Шайхаев Е.Г.¹

Актуальность. Около 30% случаев наследственного рака молочной железы (РМЖ) обусловлено мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Отсутствие в России программ обязательного генетического скрининга наследственного *BRCA*-ассоциированного РМЖ, а также алгоритма молекулярно-генетического обследования не позволяет в полной мере проводить необходимые профилактические, диагностические и лечебные мероприятия. **Цель** – разработка алгоритма молекулярно-генетического обследования больных РМЖ для повышения эффективности выявления наследственного характера заболевания. **Материал и методы.** Работа основана на анализе результатов молекулярно-генетического тестирования 3826 больных РМЖ в возрасте от 22 до 90 лет, которые прошли обследование и лечение в ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России в период с 2010 по 2016 г. На первом этапе с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени определяли распространенные в российской популяции герминальные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, на втором этапе методом секвенирования «нового поколения» (англ. next generation sequencing – NGS) осуществляли поиск редких генетических вариантов в этих генах. **Результаты.** Исследование методом ПЦР в режиме реального времени (первый этап) показало: частота наиболее характерных для

российской популяции мутаций в гене *BRCA1*, ассоциированных с риском развития РМЖ, составила 3,5% (132 из 3826 пациентов с РМЖ); ни одного носителя мутаций в гене *BRCA2* не выявлено. На основании анализа данных анкетирования и первичной медицинской документации из общей когорты обследованных была сформирована группа из 717 человек, в которую вошли пациенты с клиническими признаками наследственного заболевания (КПНЗ). В этой группе мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* были выявлены у 126 человек, что составило 17,6%. На втором этапе методом NGS в группе из 193 больных РМЖ с КПНЗ и отсутствием характерных для российской популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* были найдены редкие патогенные мутации в этих генах у 27 человек, то есть у 14%. Суммируя полученные данные, можно заключить, что не менее 30% больных РМЖ с КПНЗ имеют наследственные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*. На основании полученных данных разработан алгоритм молекулярно-генетического обследования больных РМЖ для выявления наследственного характера заболевания. **Заключение.** Выявленная в настоящей работе высокая частота мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных РМЖ с КПНЗ подтверждает необходимость генетического тестирования наследственного заболевания. Информация о наследственном характере заболевания

позволит вносить существенные изменения в тактику проводимого лечения, применяя персонализированный подход. Динамическое наблюдение пациентов с наследственным РМЖ и профилактика возникновения новых случаев РМЖ и других онкологических заболеваний (рак яичника, желудка, поджелудочной железы, предстательной железы, меланомы) у их родственников – носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* – должны осуществляться мультидисциплинарной командой (маммологи, гинекологи, онкологи, медицинские генетики, химиотерапевты, психотерапевты).

Ключевые слова: наследственный рак молочной железы, гены *BRCA1* и *BRCA2*, секвенирование «нового поколения» (NGS), медико-генетическое консультирование

Для цитирования: Снигирева ГП, Румянцева ВА, Новикова ЕИ, Новицкая НН, Телышева ЕН, Хазинс ЕД, Шайхаев ЕГ. Алгоритм молекулярно-генетического обследования для выявления наследственного *BRCA*-ассоциированного рака молочной железы. Альманах клинической медицины. 2019;47(1):54–65. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-002.

Поступила 13.09.2018; принята к публикации 16.01.2019; опубликована 06.02.2019

Ежегодный рост заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) наблюдается в большинстве регионов мира [1], включая Россию. Так, в 2015 г. в стране было зарегистрировано 66,4 тыс. новых случаев РМЖ, в 2016 – 68,2 тыс., в 2017 – 70,6 тыс. [2]. Отмечается также тенденция «омоложения» РМЖ [3]. В России за десятилетний период (2002–2012) частота его развития у женщин в возрастной группе

19–39 лет выросла на 34% [4]. Ряд авторов это связывают с разработкой и внедрением скрининговых программ [3, 5–7].

На долю генетически обусловленных форм РМЖ приходится от 5 до 10% случаев этого мультифакторного заболевания, что указывает на необходимость раннего выявления женщин с наследственной предрасположенностью к нему [8]. Механизм развития наследственного РМЖ



обусловлен мутациями в определенных, специфических для данного заболевания, генах [9]. К ним относятся гены, вовлеченные в процесс репарации, регуляции клеточного цикла, апоптоза, дифференцировки клеток, то есть отвечающие за поддержание стабильности генома (*BRCA1/2*, *CHEK2*, *TP53*, *STK11*, *PTEN*, *ATM*, *BRIP1*, *PALB2* и др.). Нарушения в этих генах определяют риск возникновения заболевания у их носителей и, соответственно, предрасположенность к развитию РМЖ [10].

BRCA-ассоциированный РМЖ (OMIM 604370) – заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования – составляет до 50% всех генетически обусловленных форм РМЖ [8, 11, 12]. Для него характерен ранний дебют, а также более агрессивное, чем при других формах, течение: около 80% *BRCA1*-ассоциированных опухолей молочной железы при иммуногистохимическом исследовании характеризуются тройным негативным иммунофенотипом (ER-, PR-, HER2/неu-), наиболее часто выявляется базальный фенотип опухоли. У больных РМЖ – носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* – значительно повышен риск развития контралатерального РМЖ, рака яичников, меланомы, толстой кишки, желудка и поджелудочной железы [13–15]. Гены *BRCA1* и *BRCA2* кодируют аминокислотные последовательности ядерных белков, которые участвуют в регуляции восстановления ДНК и деления клеток [11, 16]. В интактном (не мутантном) состоянии оба гена выступают в качестве супрессоров опухоли и обеспечивают целостность генома. Кроме того, белковые продукты генов репрессируют транскрипционную функцию гена рецептора эстрогенов, сдерживая, таким образом, избыточную пролиферацию клеток молочной железы и других эстрогензависимых органов, в частности, при половом созревании и беременности. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* приводят к повышению уровня хромосомной нестабильности в клетках, что может способствовать их опухолевой трансформации. Сегодня известно более 1000 различных мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2*, ассоциированных с РМЖ [17, 18].

В ряде стран Западной Европы, а также в Канаде и США скрининговые программы по выявлению наследственной предрасположенности к РМЖ утверждены на государственном уровне и успешно проводятся уже не одно десятилетие, охватывая более 70% женского населения [5, 6, 19]. В Российской Федерации такой общегосударственной программы пока не существует. Что касается регионов, сегодня наиболее обширная скрининговая программа по ранней диагностике РМЖ проводится в Москве при поддержке городского

департамента здравоохранения в рамках программы по ранней диагностике онкологических заболеваний «Я выбираю здоровое будущее». Эта программа нацелена на возрастную группу 40–60 лет, что для случаев наследственного РМЖ чаще всего бывает поздно. Подчеркнем: обнаружение наследственного характера заболевания у онкологических больных имеет огромное значение, так как позволяет внести существенные изменения в тактику проводимого лечения, применяя персонализированный подход: определить объем и радикальность хирургического лечения, возможность подбора таргетной химиотерапии, а также необходимость одновременного использования методики хирургического лечения и профилактической контралатеральной мастэктомии. Точная генетическая идентификация формы наследственного РМЖ с последующими персонализированными вариантами терапии уменьшает смертность от РМЖ на 90% [20]. Это дает основания рассматривать генетическое тестирование наследственного РМЖ в качестве одного из важнейших инструментов повышения эффективности лечения.

Учитывая имеющиеся сведения о частоте встречаемости носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* в российской популяции (1:800–1:1000) [21], численность этого контингента только в Москве может составить от 5 до 7 тыс. человек. Отсутствие центра наблюдений для здоровых носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, программ обязательного скрининга этой группы пациентов, а также алгоритма молекулярно-генетического обследования для выявления наследственного РМЖ не позволяет в полной мере проводить профилактические, диагностические и лечебные мероприятия.

В этой связи нашей целью была разработка алгоритма молекулярно-генетического обследования больных РМЖ для повышения эффективности выявления наследственного характера заболевания.

Материал и методы

Работа основана на анализе результатов молекулярно-генетического тестирования 3826 больных РМЖ в возрасте от 22 до 90 лет (средний возраст манифестации заболевания составил 58 лет), которые в период с 2010 по 2016 г. проходили обследование и лечение в ФГБУ «РНЦПР» Минздрава России.

Критерием включения в исследование был диагноз РМЖ, не включения – отказ от молекулярно-генетического тестирования. Все вошедшие в исследование пациенты подписали информиро-

Снигирева Галина Петровна – д-р биол. наук, заведующая лабораторией молекулярной биологии и цитогенетики¹
✉ 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, 86, Российская Федерация.
Тел.: +7 (495) 334 92 88.
E-mail: sni_gal@mail.ru

Румянцова Виктория Алексеевна – канд. мед. наук, врач-генетик лаборатории медицинской генетики²

Новикова Екатерина Ивановна – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии и цитогенетики¹

Новицкая Наталия Николаевна – инженер лаборатории молекулярной биологии и цитогенетики¹

Телышева Екатерина Николаевна – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии и цитогенетики¹

Хазинс Ева Давидовна – инженер лаборатории молекулярной биологии и цитогенетики¹

Шайхаев Евгений Гаджирамзанович – ст. науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии и цитогенетики¹

¹ ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России; 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, 86, Российская Федерация

² ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»; 119991, г. Москва, Абрикосовский пер., 2, Российская Федерация

ванное согласие на проведение молекулярно-генетического исследования и хранение биологического материала, а также заполнили специальную анкету, которая включала подробную информацию о наличии в семье родственников с онкологическими заболеваниями, в первую очередь РМЖ и рака яичников.

Проведение данного исследования было одобрено этическим комитетом ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России (протокол № 4 от 14.04.2010).

На первом этапе всем пациентам было проведено молекулярно-генетическое исследование методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени для выявления распространенных в российской популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, ассоциированных с риском развития РМЖ и рака яичников.

На втором этапе из общей группы больных сформирована группа, руководствуясь следующими критериями включения: 1) отсутствие выявляемых на первом этапе распространенных в российской популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*; 2) наличие клинических признаков наследственного заболевания (КПНЗ), таких как молодой возраст манифестации заболевания (до 50 лет), наличие первично-множественных опухолей (РМЖ и/или рак яичника), онкологическиотягощенный семейный анамнез (наличие родственников первой и/или второй степени родства с диагнозом РМЖ и/или рака яичников), трижды негативный фенотип опухоли. Пациентам этой группы было проведено молекулярно-генетическое исследование методом секвенирования «нового поколения» (англ. next generation sequencing – NGS) для выявления редких мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, ассоциированных с риском развития РМЖ и рака яичников.

Метод ПЦР в режиме реального времени. Для поиска распространенных в российской популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* – 185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G, 2080delA (*BRCA1*) и 6174delT (*BRCA2*) – использовали метод ПЦР в режиме реального времени. Выделение геномной ДНК проводили из 100 мкл периферической крови на магнитных шариках с помощью наборов M-Corb («Синтол», Россия) согласно протоколу производителя. Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали набор реагентов ОнкоГенетика BRCA (ООО «НПФ ДНК-Технология», Россия) и детектирующий амплификатор ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Все этапы анализа выполняли согласно инструкции, предоставленной фирмой-производителем.

Метод секвенирования «нового поколения» (NGS). Для проведения молекулярно-генетического исследования методом NGS ДНК выделяли из 200 мкл крови на колонках с использованием наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit («Qiagen», Германия), позволяющих получать ДНК с концентрацией не менее 10 нг/мкл согласно протоколу производителя. Библиотеки были подготовлены с помощью панели TruSight Cancer («Illumina», США) и реагентов для подготовки библиотек TruSight Rapid Capture («Illumina», США) с использованием методики селективного захвата участков ДНК. Пробоподготовку выполняли по стандартному протоколу, предоставленному производителем. Секвенирование проводили на приборе MiSeq («Illumina», США) методом парно-концевого чтения (2×151 пар оснований) со средним 100-кратным покрытием с использованием реагентов MiSeq Reagent Kits v2 («Illumina», США). Полученные после секвенирования данные были автоматически обработаны с помощью программного обеспечения, установленного на приборе, для исключения ридов с низким качеством прочтения, выравнивания относительно референсной последовательности генома человека (hg19), а также идентификации полученных генетических вариантов. Анализ полученных с прибора данных (в текстовом формате) проводился на персональном компьютере с использованием программного обеспечения Variant Studio 2.2 («Illumina», США), которое позволяет аннотировать и классифицировать выявленные генетические нарушения. Для интерпретации выявленных генетических вариантов использовались базы данных dbSNP (The Single Nucleotide Polymorphism database), ClinVar (Clinical Variation), HGMD (Human Gene Mutation Database), BIC (Breast Cancer Information Core), OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Частоту аллелей оценивали с помощью баз данных проектов ExAC (Exome Aggregation Consortium) и 1000G (1000 Genomes Project), а функциональную значимость найденных генетических вариантов – с использованием программ предсказания патогенности CADD (Combined Annotation Dependent Depletion), PolyPhen (Polymorphism Phenotyping) и Sift (Sorting Intolerant from Tolerant). Полученные варианты интерпретировали согласно классификации, предложенной Американским колледжем медицинской генетики (American College of Medical Genetics and Genomics – ACMG). Варианты классифицировались как патогенные и вероятно патогенные, а также как варианты с неизвестным клиническим значением с учетом информации в доступных базах данных (упомянуты выше) и критериев для оценки



генетических вариантов, предложенных ACMG. Варианты, не имеющие клинического значения, в данной работе не рассматривались.

Секвенирование по Сэнгеру. Полученные методами ПЦР в режиме реального времени и NGS генетические варианты были верифицированы методом секвенирования по Сэнгеру. Для проведения ПЦР использовали реактивы GenPak PCR Core (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) и праймеры, подобранные с помощью программы Primer3 и синтезированные в компании «Синтол» (Россия). Очистку реакционной смеси (ПЦР) проводили с помощью наборов Cleanup Mini (ЗАО «Евроген», Россия). Для реакции Сэнгера применяли реактивы BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США). Секвенирование проводили на приборе ABI PRISM 3100 (“Applied Biosystems”, США). Все этапы исследования выполняли согласно инструкциям, предоставленным фирмами-производителями.

Статистический анализ. Размер выборки предварительно не рассчитывался. Данные анализировали с помощью StatSoft Statistica 10.0 и представляли как среднее арифметическое и стандартное отклонение среднего ($M \pm SD$). Для сравнения частот мутантных аллелей в разных группах пациентов применяли анализ таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 с поправкой Йейтса и двустороннего точного критерия Фишера. Различие частот считалось статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе было проведено молекулярно-генетическое обследование 3826 больных РМЖ методом ПЦР в режиме реального времени для поиска распространенных в российской популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*: 185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G, 2080delA (*BRCA1*) и 6174delT (*BRCA2*). У 132 (3,5%) пациентов были выявлены мутации в гене *BRCA1*, что значительно превышает популяционную частоту носителей мутаций (1:800–1:1000) [21]. Это вполне ожидаемо, поскольку все обследованные пациенты имели диагноз РМЖ.

Спектр и частота выявленных мутаций в гене *BRCA1* в общей группе больных РМЖ приведены в табл. 1. Известно, что спектр выявляемых мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* достаточно широк и варьирует в зависимости от этнической принадлежности изучаемой популяции. В славянской популяции при наследственных формах РМЖ наиболее часто встречается мутация 5382insC в гене *BRCA1* [10, 12, 13]. Этот генетический вариант

преобладал и в нашей выборке, которая не была отобрана по национальной принадлежности. Его частота среди всей обследованной группы составила 2,5% (96 из 3826). Остальные мутации встречались значительно реже – с частотой менее 0,5%. Ни у одного из обследованных больных РМЖ не была найдена мутация 3875delGTCT в гене *BRCA1*. Не было выявлено также ни одного носителя мутаций в гене *BRCA2*.

С учетом рекомендаций Европейского общества медицинской онкологии (European Society for Medical Oncology – ESMO) [19] и Национальной онкологической сети США (National Comprehensive Cancer Network – NCCN) [6], а также на основании анализа данных анкетирования и первичной медицинской документации из общей когорты ($n = 3826$) были выделены в отдельную группу 717 больных РМЖ с одним или несколькими КПНЗ. Частота мутаций в гене *BRCA1* в сформированной группе больных с КПНЗ оказалась в 5 раз выше, чем в общей группе, – 17,6% ($n = 126$), при этом частота встречаемости мутации 5382insC составила 12,6% ($n = 91$). Шесть больных РМЖ с выявленными наиболее распространенными в российской популяции мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2* не вошли в сформированную группу с КПНЗ в связи с отсутствием достоверной информации о семейном онкологическом анамнезе.

На втором этапе было проведено молекулярно-генетическое обследование 193 больных РМЖ методом высокопроизводительного секвенирования (NGS). В эту группу были включены пациенты с КПНЗ, у которых на первом этапе исследования не были выявлены распространенные в России мутации в исследуемых генах. У 27 (14%) больных были найдены редкие патогенные мутации: 10 нонсенс-мутаций, 7 вариантов, приводящих к сдвигу рамки считывания, 4 варианта в сайте сплайсинга и 1 миссенс-вариант в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Спектр и частота выявленных генетических вариантов отражены в табл. 2. У 13 из 27 больных (6,7%) найдены мутации в гене *BRCA1*, а у 14 из 27 (7,2%) – в гене *BRCA2*. С наибольшей частотой встретилась мутация с.3607C>T в гене *BRCA1*, которая была найдена у 3 больных. Эта мутация, впервые описанная в 1994 г., характеризуется высоким индивидуальным риском развития РМЖ и рака яичников [22, 23]. Дважды встретились мутации с.9098_9090insA, с.1301_1304delAAAG и с.4689C>G в гене *BRCA1*. Информация о выявленных патогенных вариантах содержится в генетических базах данных (ExAC, 1000G).

Кроме мутаций с известным клиническим значением мы проанализировали варианты

Таблица 1. Спектр и частота распространенных в российской популяции мутаций в гене *BRCA1* в обследованной группе больных раком молочной железы (метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени)

Ген	Название мутации (номенклатура BIC)	Количество пациентов с мутацией в общей группе (n = 3826), абс.	Частота мутации (M ± SD), %	Количество пациентов с мутацией в группе с КПНЗ (n = 717), абс.	Частота мутации (M ± SD), %
<i>BRCA1</i>	5382insC	96	2,5 ± 0,3	91	12,6 ± 1,2*
	4153delA	4	0,1 ± 0,1	4	0,6 ± 0,3*
	300T>G	8	0,2 ± 0,1	8	1,1 ± 0,4*
	2080delA	8	0,2 ± 0,1	8	1,1 ± 0,4*
	185delAG	10	0,3 ± 0,1	9	1,3 ± 0,4*
	3819delGTAAA	6	0,2 ± 0,1	6	0,8 ± 0,3*
	3875delGTCT	–	–	–	–
Всего		132	3,5 ± 0,3	126	17,6 ± 1,4*

КПНЗ – клинические признаки наследственного заболевания

* Статистически значимые различия с частотой мутаций в общей группе больных раком молочной железы ($p < 0,05$)

с неизвестным клиническим значением в генах *BRCA1* и *BRCA2*. У 6 больных были обнаружены гетерозиготные миссенс-варианты, встречающиеся с низкой частотой среди разных популяций (табл. 3). Все варианты с неизвестным клиническим значением в генах *BRCA1* и *BRCA2* были тщательно проанализированы. Показано, что выявленные варианты с.7522G>A, с.7868A>G, с.8524C>T в гене *BRCA2* приводят к потере функций кодируемых белков, а результаты различных программ предсказания свидетельствуют об их патогенности. Y. Zhang и соавт. установили связь варианта с.7522G>A с повышением риска развития РМЖ в 16,5 раза [24]. Генетический вариант с.8524C>T в нашем исследовании был обнаружен у 2 больных РМЖ, на основании чего мы предположили, что эта миссенс-мутация является патогенной [18]. В некоторых генетических базах данных и вариант с.7868A>G присутствует с пометкой «патогенный» [17, 25, 26]. Связывать выявленные генетические варианты с.3541G>A (*BRCA1*), с.1243G>A (*BRCA1*), с.9934A>G (*BRCA2*) с повышенным риском развития РМЖ, по-видимому, не совсем корректно, так как результаты программ предсказания патогенности свидетельствуют о сохранении функций кодируемых белков. У одной из обследованных нами больных РМЖ с выявленным генетическим вариантом с.9934A>G в гене *BRCA2* была обнаружена патогенная мутация с.3607C>T в гене *BRCA1*. У этой пациентки был верифицирован первично-множественный метакронный рак. Гистологический диагноз – инфильтративно-протоковый рак третьей

степени злокачественности, трижды негативный фенотип опухоли. Диагноз установлен в 59 лет, в семье есть случаи онкологических заболеваний (РМЖ и рак яичников) у родственников 1 и 2-й линии родства. Основываясь на результатах проведенного исследования, а также имеющихся в литературе данных [17], можно предположить, что выявленные у больных РМЖ генетические варианты с неизвестным клиническим значением могут быть одной из причин развития заболевания.

К настоящему времени клинические рекомендации по профилактике и лечению наследственного РМЖ разработаны только для носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* [10, 13]. В клинической практике спектр анализируемых мутаций ограничен выявлением наиболее распространенных вариантов. Однако информация о мутациях в других регионах этих генов длительное время была недоступна в связи с большим размером генов *BRCA1* и *BRCA2*. Исследования, позволяющие выявлять широкий спектр мутаций по всей длине гена, проводились лишь в небольшом числе специализированных лабораторий в мире. В России такая диагностика была недоступна в силу высокой стоимости и трудоемкости. И только после внедрения в практику новых высокопроизводительных молекулярно-генетических методов (в том числе NGS) появилась реальная возможность проводить поиск и идентификацию новых клинически значимых вариантов в генах *BRCA1* и *BRCA2*. В этой связи все больные, имеющие КПНЗ, но у которых отсутствуют распространенные в российской



Таблица 2. Спектр и частота редких патогенных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* в обследованной группе больных раком молочной железы ($n = 193$) (метод NGS)

Ген	Название мутации (номенклатура HGVS)	Характеристика мутации	Количество пациентов с мутацией, абс.	Частота мутации, %
<i>BRCA1</i>	c.4327C>T	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.4752C>G	нонсенс-мутация	2	1,1
	c.5531-1G>A	мутация в сайте сплайсинга	1	0,5
	c.3607C>T	нонсенс-мутация	3	1,6
	c.5224C>T	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.4258C>T	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.1687C>T	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.4165_4166delAG	делеция со сдвигом рамки считывания	1	0,5
	c.3257T>G	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.5152+1G>T	мутация в сайте сплайсинга	1	0,5
<i>BRCA2</i>	c.8002A>T	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.6070C>T	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.6997_6998insT	инсерция со сдвигом рамки считывания	1	0,5
	c.3748_3749insA	инсерция со сдвигом рамки считывания	1	0,5
	c.5718_5719delCT	делеция со сдвигом рамки считывания	1	0,5
	c.1301_1304delAAAG	делеция со сдвигом рамки считывания	2	1,1
	c.9117G>A	мутация в сайте сплайсинга	1	0,5
	c.9089_9090insA	инсерция со сдвигом рамки считывания	2	1,1
	c.632-1G>A	мутация в сайте сплайсинга	1	0,5
	c.4111C>T	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.7254_7255delAG	делеция со сдвигом рамки считывания	1	0,5
	c.7007G>A	миссенс-мутация	1	0,5
Всего			27	14 ± 2,5

популяции мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, должны быть направлены на полное исследование генов *BRCA1* и *BRCA2* методом NGS.

Принимая во внимание полученные в нашем исследовании данные, был разработан алгоритм молекулярно-генетического обследования больных для выявления наследственного

BRCA-ассоциированного РМЖ, который включает следующие основные этапы (рис. 1):

- медико-генетическое консультирование больных (изучение семейного онкологического анамнеза);
- проведение молекулярно-генетического исследования всем больным РМЖ для выявления



Таблица 3. Спектр редких вариантов с неизвестным клиническим значением в генах *BRCA1* и *BRCA2* в обследованной группе больных раком молочной железы (n = 193) (метод NGS)

Ген	Название генетического варианта (номенклатура HGVS)	Характеристика мутации	Количество пациентов с мутацией, абс.	Средняя частота варианта среди разных популяций, %	
				ExAC	1000G
<i>BRCA1</i>	c.3541G>A	миссенс-мутация	1	0,009	0,04
	c.1243G>A	миссенс-мутация	1	0,004	0
<i>BRCA2</i>	c.9934A>G	миссенс-мутация	1	≤ 0,001	0
	c.7522G>A	миссенс-мутация	1	0,01	0
	c.7868A>G	миссенс-мутация	1	0	0
	c.8524C>T	миссенс-мутация	1	0	0

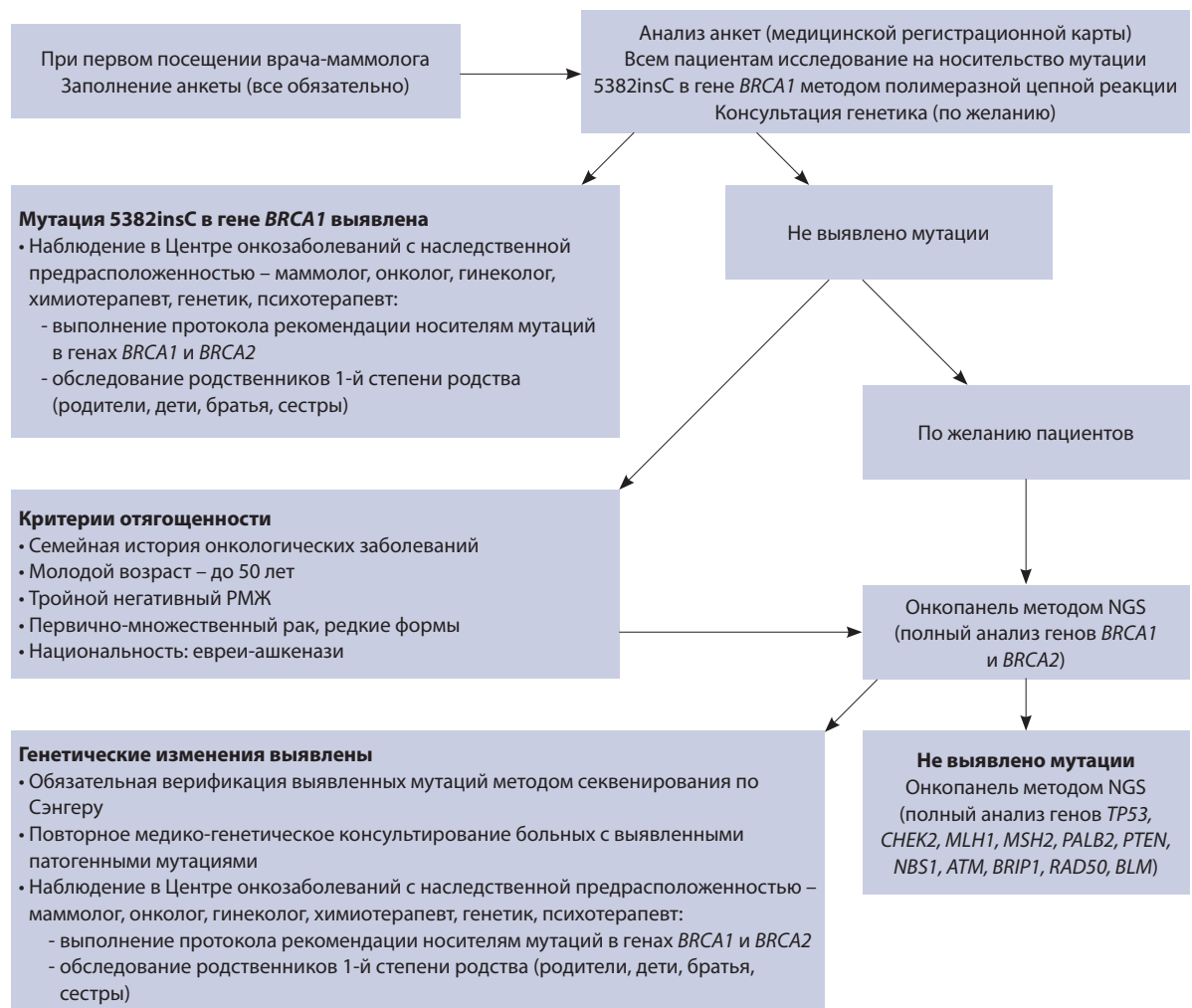


Рис. 1. Алгоритм молекулярно-генетического обследования для выявления наследственного *BRCA*-ассоциированного рака молочной железы (РМЖ)



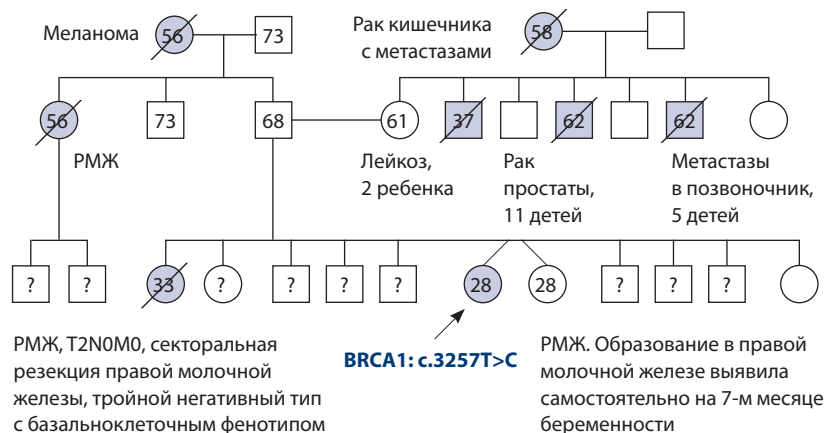
распространенной в популяции мутации 5382insC в гене *BRCA1* методом ПЦР в режиме реального времени;

- при отсутствии у больных РМЖ мутации 5382insC в гене *BRCA1*, но наличии у них КПНЗ целесообразно проведение молекулярно-генетического исследования методом NGS с использованием панели, позволяющей секвенировать всю кодирующую часть генов *BRCA1* и *BRCA2*;
- обязательная верификация выявленных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру;
- повторное медико-генетическое консультирование больных с выявленными мутациями;
- в случае обнаружения мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* проведение молекулярно-генетического обследования родственников (при достижении совершеннолетия) для выявления аналогичных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру с последующей консультацией врача-генетика.

Важность внедрения в клиническую практику предложенного алгоритма молекулярно-генетического обследования больных для определения наследственного *BRCA*-ассоциированного РМЖ можно проиллюстрировать на примере следующего **клинического наблюдения**.

Пробанд, пациентка В., возраст 28 лет, с отягощенным семейным анамнезом (рис. 2). Методом NGS с последующей верификацией методом секвенирования по Сэнгеру было выявлено генетическое изменение: с.3257T>C (*BRCA1*). Это редкая нонсенс-мутация, приводящая к синтезу короткого нефункционального белка, ассоциированная с высоким риском развития РМЖ и рака яичников (рис. 3, 4). Ранее сестре пробанда в другом медицинском учреждении не был поставлен диагноз наследственного РМЖ, так как ни одна из распространенных в российской популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G, 2080delA и 6174delT) не была обнаружена при тестировании методом ПЦР. Сестра пациентки В. умерла в возрасте 33 лет.

Таким образом, с помощью диагностической панели, включающей характерные для российской популяции мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, ассоциированные с риском развития РМЖ, в нашей работе была протестирована группа из 3826 больных. Частота выявленных мутаций в этой группе составила 3,5%. В группе больных РМЖ с КПНЗ ($n = 717$), сформированной из общего числа обследованных, частота характерных для российской популяции мутаций оказалась в 5 раз выше – 17,6%. С помощью метода высокопроизводительного секвенирования (NGS) дополнительно были



Частых мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* не выявлено!

Рис. 2. Родословная пациентки В. с наследственным раком молочной железы (РМЖ), 28 лет, патогенная мутация с.3257T>C в гене *BRCA*, выявленная методом NGS

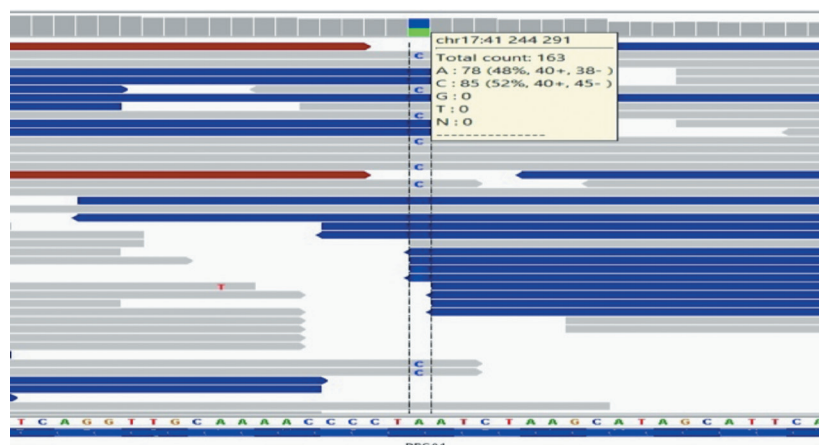


Рис. 3. Фрагмент секвенирования последовательности гена *BRCA1* методом NGS (прибор MiSeq ("Illumina", США) у пациентки В. с наследственным раком молочной железы. Положение замены с.3257T>C в гене *BRCA1* выделено линиями

выявлены редкие патогенные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* еще у 14% обследованных из группы больных РМЖ с КПНЗ и отсутствием характерных для российской популяции мутаций ($n = 193$). На основании полученных данных можно заключить, что не менее 30% больных РМЖ с КПНЗ имеют наследственные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*.

Мы показали, что применение технологии NGS упрощает анализ таких протяженных генов, как *BRCA1* и *BRCA2*. Однако при проведении молекулярно-генетического исследования необходимо учитывать ограничения данного метода, а именно невозможность полного покрытия всего гена или неравномерность прочтения отдельных участков. Широкое применение методов

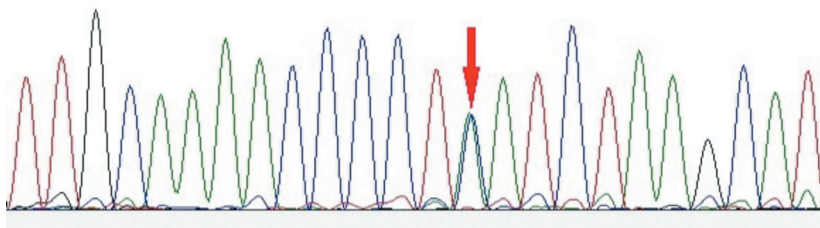


Рис. 4. Фрагмент секвенирования последовательности гена *BRCA1* по методу Сэнгера (подтверждающая диагностика) у пациентки В. с наследственным раком молочной железы. Визуализация в программе Chromas. Патогенная мутация c.3257T>C в гене *BRCA1* указана стрелкой

высокопроизводительного секвенирования приводит к выявлению большого числа неописанных вариантов, квалификация которых требует большой осторожности, как и вынесение заключения о связи выявленного генетического варианта с заболеванием. Очень важно аккуратно анализировать вновь выявленные варианты, так как не все аминокислотные замены являются мутациями. Подтверждение всех найденных патогенных генетических вариантов должно проводиться с помощью секвенирования по Сэнгеру – единственного сертифицированного метода для клинической диагностики.

Предложенный нами алгоритм молекулярно-генетического обследования для выявления наследственного *BRCA*-ассоциированного РМЖ позволяет диагностировать заболевание на ранней стадии и проводить необходимые профилактические и лечебные мероприятия, что будет способствовать повышению эффективности лечения и снижению смертности при данной онкопатологии.

Полученные в работе результаты молекулярно-генетического исследования указывают на необходимость создания единого регистра всех выявленных вариантов в генах *BRCA1* и *BRCA2* у российских больных с наследственным РМЖ (патогенных замен, неописанных замен, замен с неизвестным клиническим значением), который поможет в будущем разрабатывать персонализированные протоколы лечения и консультирования таких больных.

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена в рамках выполнения Государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 115040640033.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Г.П. Снигирева – концепция и дизайн статьи, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи; В.А. Румянцев – формирование групп пациентов, набор и обработка

Заключение

Важность развития программ ранней диагностики онкологических заболеваний практически никем не оспаривается, однако широкое внедрение методик генетического скрининга вызывает серьезные дискуссии не только в профессиональной среде, но и среди населения. Разработка программы, в которой генетическое тестирование станет повсеместно рутинной процедурой, чрезвычайно необходима, так как выявление герминальных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* дает возможность прогнозировать заболевание задолго до его возникновения и вовремя принять необходимые меры для профилактики, включая молекулярно-направленную терапию и превентивные операции. Аутосомно-доминантный тип наследования при *BRCA*-ассоциированном РМЖ позволяет ожидать накопления заболеваний в семье, что требует выполнения каскадного семейного скрининга. Это предполагает разработку алгоритма обследования, при котором экономическая и медицинская эффективность применяемых методик должна учитывать социально-этические факторы, связанные с необходимостью проводить углубленную диагностику здоровых людей, не создавая при этом стрессовую ситуацию и не провоцируя канцерофобию [27]. Программа должна обязательно включать четкие показания и рекомендации для врачей общей практики и онкологов.

Выявленная в проведенном нами исследовании высокая частота мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных РМЖ подтверждает необходимость тотального генетического скрининга в этой группе. Динамическое наблюдение пациентов с наследственным РМЖ и профилактика возникновения новых случаев онкозаболевания у их родственников – носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* – должны осуществляться мультидисциплинарной командой (маммологи, гинекологи, онкологи, медицинские генетики, химиотерапевты, психотерапевты). ©

клинического материала, написание текста; Е.И. Новикова – формирование групп пациентов, набор клинического материала, сбор и обработка материалов, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста; Н.Н. Новицкая – сбор и обработка материалов клинического исследования; Е.Н. Тельшева – сбор и обработка материалов, анализ и интерпретация результатов исследования; Е.Д. Хазинс – набор клинического материала, статистическая обработка данных; Е.Г. Шайхаев – анализ клинико-экспериментальных результатов исследования. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.



Литература

1. World Health Organization. Cancer. Early diagnosis and screening. Breast cancer [Internet]. Available from: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>.
2. Каприн АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ, ред. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2018. 250 с.
3. Holford TR, Cronin KA, Mariotto AB, Feuer EJ. Changing patterns in breast cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2006;(36): 19–25. doi: 10.1093/jncimonographs/lgj016.
4. Рассказова ЕА, Рожкова НИ. Скрининг для ранней диагностики рака молочной железы. Исследования и практика в медицине. 2014;1(1):45–51. doi: 10.17709/2409-2231-2014-1-1-45-51.
5. Bytautas J, Dobrow M, Sullivan T, Brown A. Accountability in the ontario cancer services system: a qualitative study of system leaders' perspectives. *Health Policy*. 2014;10(Spec issue):45–55. doi: 10.12927/hcpol.2014.23919.
6. National Comprehensive Cancer Network. NCCN guidelines for detection, prevention, & risk reduction: genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian 2015 [Internet]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#detection.
7. Ossa CA, Torres D. Founder and recurrent mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in Latin American countries: state of the art and literature review. *Oncologist*. 2016;21(7):832–9. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0416.
8. Parkes A, Arun BK, Litton JK. Systemic treatment strategies for patients with hereditary breast cancer syndromes. *Oncologist*. 2017;22(6):655–66. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0430.
9. Lynch HT, Snyder C, Lynch J. Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(6):1723–31. doi: 10.1245/s10434-012-2256-z.
10. Имянитов ЕН. Наследственный рак молочной железы. Практическая онкология. 2010;11(4):258–66.
11. Paul A, Paul S. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014;19:605–18. doi: 10.2741/4230.
12. Brozek I, Cybulska C, Ratajska M, Piatkowska M, Kluska A, Balabas A, Dabrowska M, Nowakowska D, Niwinska A, Pamula-Pilat J, Tecza K, Pekala W, Rembowski J, Nowicka K, Mosor M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Rachtan J, Grzybowska E, Nowak J, Steffen J, Limon J. Prevalence of the most frequent BRCA1 mutations in Polish population. *J Appl Genet*. 2011;52(3):325–30. doi: 10.1007/s13353-011-0040-6.
13. Любченко ЛН, Батенева ЕИ, Абрамов ИС, Емельянова МА, Будик ЮА, Тюлядина АС, Крохина ОВ, Воротников ИК, Соколевский ВА, Наседкина ТВ, Портной СМ. Наследственный рак молочной железы и яичников. Злокачественные опухоли. 2013;(2):53–61. doi: 10.18027/2224-5057-2013-2-53-61.
14. Shimelis H, LaDuca H, Hu C, Hart SN, Na J, Thomas A, Akinhanmi M, Moore RM, Brauch H, Cox A, Eccles DM, Ewart-Toland A, Fasching PA, Fostira F, Garber J, Godwin AK, Konstantopoulou I, Nevanlinna H, Sharma P, Yannoukakos D, Yao S, Feng BJ, Tiffin Davis B, Lilyquist J, Pesaran T, Goldgar DE, Polley EC, Dolinsky JS, Couch FJ. Triple-negative breast cancer risk genes identified by multigene hereditary cancer panel testing. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(8):855–62. doi: 10.1093/jnci/djy106.
15. van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ. Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011;34(2):71–88. doi: 10.1007/s13402-011-0010-3.
16. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*. 2006;25(43):5864–74. doi: 10.1038/sj.onc.1209874.
17. Yilmaz NK, Karagin PH, Terzi YK, Kahyaoglu I, Yilmaz S, Erkaya S, Şahin Fİ. BRCA1 and BRCA2 sequence variations detected with next-generation sequencing in patients with premature ovarian insufficiency. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2016;17(2):77–82. doi: 10.5152/jtgga.2016.16035.
18. Winter C, Nilsson MP, Olsson E, George AM, Chen Y, Kvist A, Törngren T, Vallon-Christersson J, Hegardt C, Häkkinen J, Jönsson G, Grabau D, Malmberg M, Kristofferson U, Rehn M, Gruvberger-Saal SK, Larsson C, Borg Å, Loman N, Saal LH. Targeted sequencing of BRCA1 and BRCA2 across a large unselected breast cancer cohort suggests that one-third of mutations are somatic. *Ann Oncol*. 2016;27(8): 1532–8. doi: 10.1093/annonc/mdw209.
19. Balmaña J, Díez O, Rubio IT, Cardoso F; ESMO Guidelines Working Group. BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2011;22 Suppl 6:vi31–4. doi: 10.1093/annonc/mdr373.
20. Domchek SM, Friebe TM, Singer CF, Evans DG, Lynch HT, Isaacs C, Garber JE, Neuhausen SL, Matloff E, Eeles R, Pichert G, Van't Veer L, Tung N, Weitzel JN, Couch FJ, Rubinstein WS, Ganz PA, Daly MB, Olopade OI, Tomlinson G, Schildkraut J, Blum JL, Rebbeck TR. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA*. 2010;304(9):967–75. doi: 10.1001/jama.2010.1237.
21. Любченко ЛН. Генетическое тестирование при наследственном раке молочной железы. Практическая онкология. 2014;15(3): 107–17.
22. Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King MC. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet*. 1994;8(4):399–404. doi: 10.1038/ng1294-399.
23. Manguoglu AE, Lüleci G, Özçelik T, Colak T, Schayek H, Akaydin M, Friedman E. Germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in Turkish breast/ovarian cancer patients. *Hum Mutat*. 2003;21(4):444–5. doi: 10.1002/humu.9119.
24. Zhang Y, Long J, Lu W, Shu XO, Cai Q, Zheng Y, Li C, Li B, Gao YT, Zheng W. Rare coding variants and breast cancer risk: evaluation of susceptibility Loci identified in genome-wide association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(4):622–8. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-1043.
25. Vail PJ, Morris B, van Kan A, Burdett BC, Moyes K, Theisen A, Kerr ID, Wenstrup RJ, Eggington JM. Comparison of locus-specific databases for BRCA1 and BRCA2 variants reveals disparity in variant classification within and among databases. *J Community Genet*. 2015;6(4):351–9. doi: 10.1007/s12687-015-0220-x.
26. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5): 405–24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
27. Тищенко ПД, Шевченко СЮ. Казус Анджелы Джели и этические проблемы современной онкологии. Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского. 2015;(4):5–11.



References

1. World Health Organization. Cancer. Early diagnosis and screening. Breast cancer [Internet]. Available from: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>.
2. Malignant neoplasms in Russia in 2017 (incidence and mortality). Moscow: P.A. Herzen Moscow Research Oncological Institute; 2018. 250 p. Russian.
3. Holford TR, Cronin KA, Mariotto AB, Feuer EJ. Changing patterns in breast cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2006;(36): 19–25. doi: 10.1093/jncimonographs/lgj016.
4. Rasskazova EA, Rozhkov NI. Screening for early detection of breast cancer. *Research'n Practical Medicine Journal*. 2014;1(1):45–51. Russian. doi: 10.17709/2409-2231-2014-1-1-45-51.
5. Bytautas J, Dobrow M, Sullivan T, Brown A. Accountability in the ontario cancer services system: a qualitative study of system leaders' perspectives. *Health Policy*. 2014;10(Spec issue):45–55. doi: 10.12927/hcpol.2014.23919.
6. National Comprehensive Cancer Network. NCCN guidelines for detection, prevention, & risk reduction: genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian 2015 [Internet]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#detection.
7. Ossa CA, Torres D. Founder and recurrent mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in Latin American countries: state of the art and literature review. *Oncologist*. 2016;21(7):832–9. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0416.
8. Parkes A, Arun BK, Litton JK. Systemic treatment strategies for patients with hereditary breast cancer syndromes. *Oncologist*. 2017;22(6):655–66. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0430.
9. Lynch HT, Snyder C, Lynch J. Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(6):1723–31. doi: 10.1245/s10434-012-2256-z.
10. Imyaninov EN. Hereditary breast cancer. *Practical Oncology*. 2010;11(4):258–66. Russian.
11. Paul A, Paul S. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014;19:605–18. doi: 10.2741/4230.
12. Brozek I, Cybulska C, Ratajska M, Piatkowska M, Kluska A, Balabas A, Dabrowska M, Nowakowska D, Niwinska A, Pamula-Pilat J, Tecza K, Pekala W, Rembowska J, Nowicka K, Mosor M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Rachtan J, Grzybowska E, Nowak J, Steffen J, Limon J. Prevalence of the most frequent BRCA1 mutations in Polish population. *J Appl Genet*. 2011;52(3):325–30. doi: 10.1007/s13353-011-0040-6.
13. Lyubchenko LN, Bateneva EI, Abramov IS, Emelyanova MA, Budik YA, Tyulyandina AS, Krokhnina OV, Vorotnikov IK, Sobolevskiy VA, Nasedkina TV, Portnoy SM. Hereditary breast and ovarian cancer. *Malignant Tumours*. 2013;(2): 53–61. Russian. doi: 10.18027/2224-5057-2013-2-53-61.
14. Shimelis H, LaDuca H, Hu C, Hart SN, Na J, Thomas A, Akinhanmi M, Moore RM, Brauch H, Cox A, Eccles DM, Ewart-Toland A, Fasching PA, Fostira F, Garber J, Godwin AK, Konstantopoulou I, Nevanlinna H, Sharma P, Yannoukakos D, Yao S, Feng BJ, Tiffin Davis B, Lilyquist J, Pesaran T, Goldgar DE, Polley EC, Dolinsky JS, Couch FJ. Triple-negative breast cancer risk genes identified by multigene hereditary cancer panel testing. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(8):855–62. doi: 10.1093/jnci/djy106.
15. van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ. Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011;34(2):71–88. doi: 10.1007/s13402-011-0010-3.
16. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*. 2006;25(43):5864–74. doi: 10.1038/sj.onc.1209874.
17. Yilmaz NK, Karagin PH, Terzi YK, Kahyaoğlu İ, Yilmaz S, Erkaya S, Şahin Fİ. BRCA1 and BRCA2 sequence variations detected with next-generation sequencing in patients with premature ovarian insufficiency. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2016;17(2):77–82. doi: 10.5152/jtgga.2016.16035.
18. Winter C, Nilsson MP, Olsson E, George AM, Chen Y, Kvist A, Törngren T, Vallon-Christersson J, Hegardt C, Häkkinen J, Jönsson G, Grabau D, Malmberg M, Kristoffersson U, Rehn M, Gruvberger-Saal SK, Larsson C, Borg Å, Loman N, Saal LH. Targeted sequencing of BRCA1 and BRCA2 across a large unselected breast cancer cohort suggests that one-third of mutations are somatic. *Ann Oncol*. 2016;27(8): 1532–8. doi: 10.1093/annonc/mdw209.
19. Balmaña J, Díez O, Rubio IT, Cardoso F; ESMO Guidelines Working Group. BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2011;22 Suppl 6:vi31–4. doi: 10.1093/annonc/mdr373.
20. Domchek SM, Friebe TM, Singer CF, Evans DG, Lynch HT, Isaacs C, Garber JE, Neuhausen SL, Matloff E, Eeles R, Pichert G, Van't Veer L, Tung N, Weitzel JN, Couch FJ, Rubinstein WS, Ganz PA, Daly MB, Olopade OI, Tomlinson G, Schildkraut J, Blum JL, Rebbeck TR. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA*. 2010;304(9):967–75. doi: 10.1001/jama.2010.1237.
21. Lubchenko LN. Genetic testing in hereditary breast cancer. *Practical Oncology*. 2014;15(3): 107–17. Russian.
22. Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King MC. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet*. 1994;8(4):399–404. doi: 10.1038/ng1294-399.
23. Manguoglu AE, Lüleci G, Özçelik T, Colak T, Schayek H, Akaydin M, Friedman E. Germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in Turkish breast/ovarian cancer patients. *Hum Mutat*. 2003;21(4):444–5. doi: 10.1002/humu.9119.
24. Zhang Y, Long J, Lu W, Shu XO, Cai Q, Zheng Y, Li C, Li B, Gao YT, Zheng W. Rare coding variants and breast cancer risk: evaluation of susceptibility loci identified in genome-wide association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(4):622–8. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-1043.
25. Vail PJ, Morris B, van Kan A, Burdett BC, Moyes K, Theisen A, Kerr ID, Wenstrup RJ, Eggington JM. Comparison of locus-specific databases for BRCA1 and BRCA2 variants reveals disparity in variant classification within and among databases. *J Community Genet*. 2015;6(4):351–9. doi: 10.1007/s12687-015-0220-x.
26. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5): 405–24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
27. Tishchenko PD, Shevchenko SYu. Angelina Jolie's casus and ethical problems of modern oncology. *Clinical and Experimental Surgery. Petrovsky Journal*. 2015;(4):5–11. Russian.



Algorithm of molecular genetic investigation to identify hereditary *BRCA*-associated breast cancer

G.P. Snigireva¹ • V.A. Romyantseva² • E.I. Novikova¹ •
N.N. Novitskaya¹ • E.N. Telysheva¹ • E.D. Khazins¹ • E.G. Shaikhaev¹

Background: About 30% of cases of hereditary breast cancer (BC) are associated with the *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations. The absence of the programs of mandatory genetic screening for hereditary *BRCA*-associated BC in Russia, as well as of an algorithm for molecular genetic testing does not allow fully accomplishing the necessary preventive, diagnostic and medical measures. **Aim:** To elaborate an algorithm for molecular genetic testing of BC patients in order to improve the efficacy of identification of the hereditary nature of the disease. **Materials and methods:** The study is based on the analysis of the results of molecular genetic testing of 3826 BC patients aged from 22 to 90 years, who were examined and treated in the Russian Research Center of Roentgenoradiology (Moscow) from 2010 to 2016. At the first stage of the study, germinal mutation in the *BRCA1* and *BRCA2* genes prevalent in the Russian population were identified by the real-time polymerase chain reaction (PCR). At the second stage, we searched for rare genetic variants of these genes by the 'next generation sequencing' (NGS) method.

Results: The real-time PCR (the first stage) showed that the prevalence of the most typical for the Russian population mutations in the *BRCA1* gene, associated with BC risk, was 3.5% (132/3826 BC patients). No carriers of the *BRCA2* mutations were identified. Based on the analysis of a questionnaire survey and primary medical documentation, a group of 717 patients was selected from the total cohort, who had clinical features of the hereditary disease (CFHD). In this group, the *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations were found in 126 patients (17.6%). At the second stage, a group of 193 patients with CFHD and no *BRCA1* and *BRCA2* mutations prevalent in the Russian population was investigated by

NGS. Rare pathogenic mutations of these genes were found in 27 patients (14%). In total, it may be concluded that at least 30% of the BC patients with CFHD have germinal mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. Based on the data obtained, we have developed the algorithm of molecular genetic testing of BC patients aimed at identification of the hereditary nature of the disease. **Conclusion:** The high frequency of mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes found in this study in BC patients with CFHD confirms the necessity of genetic testing for this hereditary disease. The information on its hereditary nature allows for the introduction of essential therapy modification with a personalized approach. Regular follow-up of patients with hereditary BC and prevention of new BC cases and other cancers (ovarian, gastric, pancreatic and prostate cancer, as well as melanoma) in their relatives with *BRCA1* and *BRCA2* mutations have to be implemented by a multidisciplinary team (specialists in mammology, gynecology, oncology, medical genetics, chemotherapy and psychotherapy).

Key words: hereditary breast cancer, *BRCA1/2* genes, next generation sequencing (NGS), genetic consultation

For citation: Snigireva GP, Romyantseva VA, Novikova EI, Novitskaya NN, Telysheva EN, Khazins ED, Shaikhaev EG. Algorithm of molecular genetic investigation to identify hereditary *BRCA*-associated breast cancer. Almanac of Clinical Medicine. 2019;47(1):54–65. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-002.

Received 13 September 2018; accepted 16 January 2019. Published 06 February 2019

Galina P. Snigireva – PhD, Doctor of Biol. Sci., Head of Molecular Biology and Cytogenetics Laboratory¹
✉ 86 Profsoyuznaya ul., Moscow, 117997, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 334 92 88.
E-mail: sni_gal@mail.ru

Viktoriya A. Romyantseva – MD, PhD, Physician-Geneticist, Medical Genetics Laboratory²

Ekaterina I. Novikova – Junior Research Fellow, Molecular Biology and Cytogenetics Laboratory¹

Nataliya N. Novitskaya – Engineer, Molecular Biology and Cytogenetics Laboratory¹

Ekaterina N. Telysheva – Junior Research Fellow, Molecular Biology and Cytogenetics Laboratory¹

Eva D. Khazins – Engineer, Molecular Biology and Cytogenetics Laboratory¹

Evgeny G. Shaikhaev – Senior Research Fellow, Molecular Biology and Cytogenetics Laboratory¹

Funding

The study was performed as a part of the Government Contract No 115040640033 by the Ministry of Health of the Russian Federation.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

¹ Russian Research Center of Roentgenoradiology; 86 Profsoyuznaya ul., Moscow, 117997, Russian Federation

² Petrovsky National Research Center of Surgery; 2 Abrikosovskiy pereulok, Moscow, 119991, Russian Federation



Оригинальная статья

Исследование модифицирующей роли полиморфизма митохондриальной ДНК в манифестации синдрома Бругада

Голубенко М.В.¹ • Михайлов В.С.² • Заклязьминская Е.В.^{2,3}

Актуальность. Синдром Бругада – генетически и фенотипически гетерогенное наследственное заболевание, для которого характерен высокий риск развития аритмий и внезапной сердечной смерти. Предполагают, что в вариабельность фенотипа вносят вклад модифицирующие генетические факторы. Среди них рассматривают полиморфизм митохондриальной ДНК (мтДНК), поскольку дисфункция митохондрий, в том числе связанная с вариантами мтДНК, может оказывать аритмогенный эффект. **Цель** – изучение возможной связи полиморфизма мтДНК с фенотипом у российских больных с синдромом Бругада. **Материал и методы.** Исследован полиморфизм мтДНК у 36 российских пробандов

с синдромом Бругада. На основании секвенирования первого гипервариабельного сегмента D-петли определена принадлежность мтДНК к основным европейским гаплогруппам мтДНК. **Результаты.** Частоты основных гаплогрупп мтДНК в исследованной выборке в целом соответствуют распределению, характерному для русских популяций, за исключением гаплогруппы J, которая не была выявлена у исследованных пробандов. Полученные результаты не согласуются с опубликованными ранее данными, согласно которым гаплогруппы J и T были фактором риска проявления симптомов при этом заболевании. **Заключение.** Наше исследование не выявило роли полиморфизма мтДНК

(гаплогрупп J и T) в формировании фенотипа синдрома Бругада.

Ключевые слова: синдром Бругада, модифицирующие генетические факторы, митохондриальная ДНК

Для цитирования: Голубенко МВ, Михайлов ВС, Заклязьминская ЕВ. Исследование модифицирующей роли полиморфизма митохондриальной ДНК в манифестации синдрома Бругада. Альманах клинической медицины. 2019;47(1):66–71. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-007.

Поступила 28.01.2019; принята к публикации 10.02.2019; опубликована 15.02.2019

Синдром Бругада – наследственное нарушение сердечного ритма, первое описание которого датируется 1992 г. [1]. Заболевание характеризуется подъемом сегмента ST в правых прекардиальных отведениях V_1 – $V_2 \geq 2$ мм, атипичной блокадой правой ножки пучка Гиса, высоким риском внезапной сердечной смерти вследствие полиморфной желудочковой тахикардии. Предполагается, что на долю синдрома Бругада приходится не менее 12% всех случаев внезапной сердечной смерти и около 20% случаев аутопсий со структурно нормальным сердцем [2].

Синдром Бругада наиболее распространен в странах Юго-Восточной Азии: в Тайланде и Японии его частота превышает 120:100 000 населения [3–5]. Однако заболевание регистрируют во всех этнических группах, в Европе и США его встречаемость составляет около 10:100 000 населения. По результатам единственного эпидемиологического исследования распространенности Бругада-подобных

изменений на электрокардиограмме в России, выполненного в Самарской области, этот электрокардиографический феномен был выявлен у 20 из 42 779 обследованных, что составляет около 50:100 000 [6].

Синдрому Бругада свойственна выраженная генетическая гетерогенность. В настоящее время известно не менее 17 генов, мутации в которых приводят к развитию заболевания [7]. Эти гены кодируют субъединицы калиевых, кальциевых и натриевых каналов, принимающих участие в генерации потенциала действия в миокарде. Мутации в гене *SCN5A* выявляются у 25–30% пациентов [8], другие известные генетические формы в совокупности отвечают не более чем за 5–10% случаев заболевания. Синдром Бругада наследуется по аутосомно-доминантному типу. Не обнаружено ни одной генетической формы, сцепленной с X- или Y-хромосомой, однако среди диагностированных больных наблюдается выраженное неравновесие по полу, с преобладанием мужчин в 8–10 раз во всех этнических группах.



Этот феномен не имеет объяснения, хотя и обсуждается роль стероидных гормонов в манифестации заболевания [9].

Синдром Бругада может длительно протекать бессимптомно, и в большинстве случаев начало клинических проявлений приходится на третью-четвертую декаду жизни (35–45 лет) [10]. При этом нарушения ритма могут проявиться практически в любом возрасте – от 2 дней до 84 лет [10]. Примерно у 20% пациентов с синдромом Бругада кроме желудочковых нарушений ритма сердца развиваются суправентрикулярные аритмии [10]. Желудочковые тахикардии и синкопальные состояния, как правило, развиваются спонтанно, не показано убедительной связи с физическими или эмоциональными нагрузками, но провоцирующим фактором может служить гипертермия (например, лихорадка при воспалительных заболеваниях или перегрев в бане), а также некоторые лекарственные препараты [11, 12]. На сегодня ни для одного из антиаритмических препаратов не доказана эффективность в уменьшении риска жизнеугрожающих нарушений ритма сердца, и имплантация кардиовертера-дефибриллятора остается единственным методом лечения, снижающим риск внезапной сердечной смерти при синдроме Бругада [13–15]. Для оценки риска используются электрокардиографические, антропометрические и семейные данные. Вместе с тем вопросы оценки риска внезапной сердечной смерти и показания к имплантации антиаритмических устройств при синдроме Бругада все еще остаются дискуссионными и нуждаются в уточнении.

Роль выявления мутаций в гене *SCN5A* и их вклад в оценку риска внезапной сердечной смерти также не вполне ясны. Неполная пенетрантность мутаций и гетерогенность фенотипа позволяют предположить наличие дополнительных модифицирующих факторов, в том числе генетических, которые могут влиять на развитие заболевания. Так, установлено, что у больных с мутацией *SCN5A* наличие одновременно полиморфизма H558R в том же гене оказывает благоприятный эффект на течение заболевания [16]. В одной из работ была показана ассоциация 5 из 73 кандидатных SNP в различных генах с развитием аритмий у пациентов с синдромом Бругада; по результатам исследования была предложена пилотная модель стратификации риска с учетом генотипа по этим SNP [17].

Данные некоторых исследований указывают на то, что дисфункция митохондрий (снижение продукции АТФ и повышение уровня активных форм кислорода) в миокарде имеет аритмогенный

Голубенко Мария Владимировна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории популяционной генетики¹
✉ 634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10, Российская Федерация.
Тел.: +7 (3822) 51 37 44.
E-mail: maria.golubenko@medgenetics.ru

Михайлов Вадим Сергеевич – науч. сотр. лаборатории медицинской генетики²

Заклязьминская Елена Валерьевна – д-р мед. наук, заведующая лабораторией медицинской генетики³; доцент кафедры клеточной и молекулярной генетики медико-биологического факультета³

эффект [18, 19]. Снижение отношения АТФ/АДФ приводит к открытию калиевых каналов, вследствие этого замедляется проведение импульса [20], а окислительный стресс влияет на возбудимость кардиомиоцитов, в частности, за счет сокращения поступления в клетку натрия и кальция [18, 21]. Таким образом, митохондриальная дисфункция вызывает изменения, схожие с эффектом мутаций при синдроме Бругада.

Митохондриальная ДНК (мтДНК) кодирует 13 субъединиц комплексов дыхательной цепи митохондрий, и мутации мтДНК могут нарушать функцию окислительного фосфорилирования, приводя к снижению синтеза аденозинтрифосфорной кислоты и повышению продукции активных форм кислорода (окислительному стрессу). Некоторые заболевания, вызываемые мутациями мтДНК, характеризуются в том числе нарушениями в проводящей системе сердца: например, при синдроме Кернса – Сейра, связанном с делецией примерно 5000 п.н. мтДНК, может развиваться полная атриовентрикулярная блокада. Аритмия и внезапная сердечная смерть могут развиваться и при синдроме MELAS у носителей наиболее частой митохондриальной мутации – A2343G [22].

Митохондриальная ДНК человека характеризуется высоким уровнем полиморфизма в популяциях. Сложно найти двух неродственных друг другу индивидов, которые бы имели одинаковую последовательность митохондриального генома. Поскольку мтДНК не рекомбинирует в мейозе, последовательно возникающие мутации образуют устойчивые гаплотипы. Родственные друг другу гаплотипы объединяют в гаплогруппы. Каждая гаплогруппа имеет буквенное обозначение и характеризуется своим устойчивым набором замен в мтДНК. Это могут быть и замены аминокислот в белках, и замены в митохондриальных генах рибосомных и транспортных РНК. Этот популяционный полиморфизм может иметь некоторую функциональную значимость, влияя (в пределах нормы) на функцию дыхательной цепи и, соответственно, митохондрий.

Исследования популяционного полиморфизма мтДНК как потенциального «модификатора» фенотипа кардиологических заболеваний проводились неоднократно. Однако, принимая во внимание значительную географическую дифференциацию полиморфизма мтДНК, всегда следует учитывать популяционную специфику. Например, в одном исследовании, проведенном в Испании, было показано, что у больных с гипертрофической кардиомиопатией чаще встречается гаплогруппа Т по сравнению с популяционной

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики (НИИ медицинской генетики) ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; 634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10, Российская Федерация

² ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»; 119991, г. Москва, Абрикосовский пер., 2, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России; 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1, Российская Федерация



выборкой [23], тогда как в другом исследовании, проведенном в популяции датчан, фактором риска была гаплогруппа Н [24].

Два зарубежных исследования, посвященные анализу митохондриального генома у пациентов с синдромом Бругада, указывают на возможную роль полиморфизма мтДНК в проявлении заболевания. При секвенировании митохондриальных генов транспортной РНК у пациентов иранского происхождения были выявлены три потенциально патогенные мутации в гетероплазмичном состоянии [25]. Согласно данным другого исследования, проведенного в итальянской популяции, гаплогруппы Т и J, объединяемые общим полиморфизмом Т4216С, встречаются у всех симптомных пациентов со спонтанным Бругада-паттерном 1-го типа на электрокардиограмме [26]. Авторы высказали предположение, что принадлежность мтДНК к гаплогруппам Т и J – важный модифицирующий фактор, способствующий проявлению фенотипа синдрома Бругада.

Целью нашей работы было изучение возможной связи полиморфизма мтДНК с фенотипом у российских больных с синдромом Бругада.

Материал и методы

Для проведения исследования были использованы образцы ДНК пациентов с синдромом Бругада, направленных для генетической диагностики в лабораторию медицинской генетики РНЦХ имени академика Б.В. Петровского. Исследование было проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации и на основании письменного информированного согласия пациентов. Диагноз синдрома Бругада был установлен всем пациентам на основании общепринятых диагностических критериев (2012) [27]. На предварительном этапе исследования всем пробандам с диагнозом синдрома Бругада было выполнено капиллярное секвенирование по Сэнгеру кодирующей последовательности и прилегающих интронных областей гена *SCN5A*. В окончательную выборку вошли 36 пробандов с клинически достоверным диагнозом (4 женского и 32 мужского пола), у которых не было обнаружено мутаций в гене *SCN5A*, в основном из центральных регионов европейской части России. Средний возраст в выборке составил 29 лет (от 6 до 60 лет). Пациенты с мутациями *SCN5A* были исключены из выборки, для того чтобы оценить влияние митохондриального генома независимо от эффекта мутаций этого гена.

Полиморфизм мтДНК изучали с помощью секвенирования первого и второго

гипервариабельных сегментов D-петли мтДНК (участки 16024–16383 и 57–372 согласно референсной последовательности мтДНК [28]). Для этого проводили ПЦР-амплификацию исследуемого участка с помощью праймеров L15997 (5'- ctc cac cat tag cac cca aag c-3') и H408 (5'- ctg tta aaa gtg cat acc gcc a-3'). Продукты полимеразной цепной реакции секвенировали методом Сэнгера на генетическом анализаторе ABI 3730 с праймеров L15997, H16526 (5'- aac gtg tgg gct att tag gc-3') и L16420 (5'- cac cat tct ccg tga aat ca-3'). Принадлежность мтДНК к гаплогруппам (группам родственных гаплотипов) определяли по характерным для этих гаплогрупп нуклеотидным заменам относительно референсной последовательности, согласно филогении мтДНК человека, доступной онлайн: www.phylotree.org [29].

В ходе анализа данных рассчитывали абсолютные и относительные (в %) частоты гаплогрупп, двусторонний 95% доверительный интервал для относительных частот (по методу Wilson без поправки на непрерывность). Сравнение частот в двух группах проводили с помощью критерия χ^2 и точного критерия Фишера (в случае количества наблюдений менее 5 в одной из подгрупп). Статистически значимым был принят уровень ошибки первого рода $\alpha < 0,05$. Расчеты проводили в программе Statistica 13.2 (Dell inc., США).

Результаты

В выборке из 36 пробандов с синдромом Бругада нами были выявлены 8 различных гаплогрупп мтДНК (таблица). Наиболее частой, как и во всех европейских популяциях, была гаплогруппа Н (44%), следующими по распространенности были гаплогруппы U (17%) и Т (10%). Четвертая по распространенности в российских европеоидных популяциях гаплогруппа J, для которой (вместе с ее «сестринской» гаплогруппой Т) была показана ассоциация с неблагоприятным течением синдрома Бругада [26], в нашей выборке отсутствовала. Интересно, что у наших пациентов со значительной частотой (для такой маленькой выборки) были определены «редкие» для русских гаплогруппы: I, W и HV0, которые в популяции встречаются реже, чем гаплогруппа J. Гаплогруппа U у больных синдромом Бругада была зарегистрирована с несколько меньшей частотой, чем в популяции. Различия в частоте гаплогруппы J в популяции и у больных синдромом Бругада были статистически значимыми ($p=0,042$ для двустороннего точного критерия Фишера).



Обсуждение

В статье L. Stocchi и соавт. [26] проанализированы клинические проявления синдрома Бругада у итальянцев в зависимости от полиморфизма митохондриального генома. Было показано, что все пациенты, у которых были отмечены симптомы заболевания (остановка сердца, фибрилляция предсердий), имели мтДНК, принадлежащую к гаплогруппам J и T. Эти гаплогруппы образуют филогенетический кластер, определяемый миссенс-заменой T4216C (замена аминокислоты Tyr304His в первой субъединице НАДН-дегидрогеназы). Кроме того, каждая из этих гаплогрупп характеризуется дополнительными аминокислотными заменами в различных субъединицах комплексов дыхательной цепи митохондрий. Можно предположить, что совокупность этих миссенс-полиморфизмов ведет к снижению эффективности окислительного фосфорилирования, и это объясняет ассоциацию данных гаплогрупп с неблагоприятным течением заболевания. Стоит отметить, однако, что этот анализ был проведен всего на 16 пациентах, из которых указанные симптомы имели 5 человек. В вышеуказанном исследовании [26] был осуществлен скрининг еще 24 пациентов на принадлежность мтДНК к гаплогруппам J и T, который выявил очень высокую суммарную частоту этих гаплогрупп у больных с синдромом Бругада – 56%, по сравнению с 20% в популяции. Наше исследование не подтверждает этой ассоциации: несмотря на то что в русских популяциях суммарная частота гаплогрупп J и T также составляет около 20% (см. таблицу), у больных синдромом Бругада была обнаружена только гаплогруппа T – 11% (4 человека). Таким образом, полученные нами данные о полиморфизме мтДНК у больных синдромом Бругада противоречат результатам исследования, проведенного в Италии: если там гаплогруппа J была зарегистрирована у 6 из 16 человек, то есть в 37,5% [26], в нашей выборке с синдромом Бругада она отсутствовала, и различия с популяционной выборкой можно считать статистически значимыми ($p < 0,05$).

Митохондриальная ДНК человека обладает высокой изменчивостью в популяциях человека. Например, генотипированные нами гаплогруппы мтДНК характерны лишь для европеоидных (в том числе ближневосточных) популяций и практически не встречаются в популяциях азиатского или африканского происхождения. Кроме того, каждая из этих гаплогрупп состоит из субгаплогрупп, имеющих свои отличительные варианты мтДНК, и эта изменчивость географически

Частота различных гаплогрупп мтДНК у пациентов с синдромом Бругада в сравнении с русской популяцией

Гаплогруппа мтДНК	Пациенты с синдромом Бругада, n = 36		Русские, европейская часть России, n = 953 (по [30])		Значение p^{**}
	n	% (ДИ)*	n	% (ДИ)*	
H	16	44,4 (29,5–60,4)	386	40,5 (37,4–43,7)	0,636
U (в том числе K)	6	16,7 (7,9–31,9)	240	25,2 (22,5–28)	0,246
T	4	11,1 (4,4–25,3)	85	8,9 (7,3–10,9)	0,557
J	0	0 (0–9,6)	92	9,7 (7,9–11,7)	0,042
I	3	8,3 (2,9–21,8)	25	2,6 (1,8–3,8)	0,078
W	2	5,6 (1,5–18,1)	19	2,0 (1,3–3,1)	0,176
HV0	3	8,3 (2,9–21,8)	29	3,0 (2,1–4,3)	0,107
Др.	2	5,6 (1,5–18,1)	77	8,1 (6,5–10)	1,000

мтДНК – митохондриальная ДНК, ДИ – доверительный интервал

*Приведена доля в процентах от общей выборки; в скобках указан двусторонний 95% ДИ для доли

**Сравнение с частотой в популяции (критерий χ^2 , точный критерий Фишера в случае, если в одной из подгрупп было менее пяти наблюдений)

дифференцирована, то есть в разных популяциях одна и та же гаплогруппа мтДНК может иметь, наряду с общими, дополнительные варианты, специфические для данного географического региона. Это может быть одной из причин противоречивости результатов исследований, проводимых в разных странах. Например, из 4 представителей гаплогруппы T в нашем исследовании 2 человека относились к подгруппе T1a, 1 – к T2a и 1 – к T2b, тогда как в работе [26] было выявлено 2 представителя гаплогруппы T – оба принадлежали к подгруппе T2c.

Заключение

Проведенное нами исследование полиморфизма мтДНК у российских пациентов с синдромом Бругада не подтвердило предположенной ранее [26] ассоциации гаплогрупп мтДНК T и J с синдромом Бругада. Поскольку в нашей работе группа больных была немногочисленной (это обусловлено редкостью заболевания), мы не можем полностью исключить роль популяционного полиморфизма мтДНК в формировании фенотипа при синдроме Бругада. Вместе с тем противоречивость результатов, получаемых в разных исследованиях, не позволяет использовать принадлежность мтДНК к гаплогруппам T и J как значимый фактор для прогноза этого заболевания. ©



Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена в рамках выполнения Государственного задания ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук». Для выполнения работы использовано оборудование Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

М.В. Голубенко – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментальных исследований, анализ полученных данных, написание и редактирование текста; В.С. Михайлов – анализ клинических данных, подготовка и проведение экспериментальных исследований, анализ результатов, редактирование текста; Е.В. Заклязьминская – концепция и дизайн исследования, набор клинического материала, анализ полученных данных, написание и редактирование текста. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Литература / References

- Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol*. 1992;20(6):1391–6. doi: 10.1016/0735-1097(92)90253-J.
- Juang JM, Huang SK. Brugada syndrome – an under-recognized electrical disease in patients with sudden cardiac death. *Cardiology*. 2004;101(4):157–69. doi: 10.1159/000076693.
- Nademanee K, Veerakul G, Nimmannit S, Chaowakul V, Bhuripanyo K, Likittanasombat K, Tunsanga K, Kuasirikul S, Malasit P, Tansupasawadikul S, Tatsanavivat P. Arrhythmogenic marker for the sudden unexplained death syndrome in Thai men. *Circulation*. 1997;96(8):2595–600. doi: 10.1161/01.CIR.96.8.2595.
- Miyasaka Y, Tsuji H, Yamada K, Tokunaga S, Saito D, Imuro Y, Matsumoto N, Iwasaka T. Prevalence and mortality of the Brugada-type electrocardiogram in one city in Japan. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(3):771–4. doi: 10.1016/S0735-1097(01)01419-X.
- Rattanawong P, Ngarmukos T, Chung EH, Vutthikraivit W, Putthapiban P, Sukhumthamarat W, Vathesatogkit P, Sritara P. Prevalence of Brugada ECG pattern in Thailand from a population-based cohort study. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(10):1355–6. doi: 10.1016/j.jacc.2016.12.028.
- Дупляков ДВ, Глухова ВЛ, Максимова СВ, Вожаева ЗИ, Старостина ИВ, Васильева ЕН, Сысуюнкова ЕВ, Светлакова ЛП, Голева СВ, Сорокина ТТ. Частота выявления признаков синдрома Бругада при регистрации ЭКГ. *Кардиология*. 2007;47(11):55–9. [Duplyakov DV, Glukhova VL, Maximova SV, Vozhdaeva ZI, Starostina IV, Vasilieva EN, Sysuenkova EV, Svetlakova LP, Goleva SV, Sorokina TT. Frequency of detection of the Brugada syndrome signs in the course of ECG registration. *Kardiologiya*. 2007;47(11):55–9. Russian].
- Nielsen MW, Holst AG, Olesen SP, Olesen MS. The genetic component of Brugada syndrome. *Front Physiol*. 2013;4:179. doi: 10.3389/fphys.2013.00179.
- Kaplinger JD, Tester DJ, Alders M, Benito B, Berthet M, Brugada J, Brugada P, Fressart V, Guerchicoff A, Harris-Kerr C, Kamakura S, Kundt F, Koopmann TT, Miyamoto Y, Pfeiffer R, Pollevick GD, Probst V, Zumhagen S, Vatta M, Towbin JA, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Antzelevitch C, Salisbury BA, Guicheney P, Wilde AA, Brugada R, Schott JJ, Ackerman MJ. An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2010;7(1):33–46. doi: 10.1016/j.hrthm.2009.09.069.
- Shimizu W, Matsuo K, Kokubo Y, Satomi K, Kurita T, Noda T, Nagaya N, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Inamoto N, Akahoshi M, Tomoi-ke H. Sex hormone and gender difference – role of testosterone on male predominance in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2007;18(4):415–21. doi: 10.1111/j.1540-8167.2006.00743.x.
- Antzelevitch C, Patocskai B. Brugada syndrome: clinical, genetic, molecular, cellular, and ionic aspects. *Curr Probl Cardiol*. 2016;41(1):7–57. doi: 10.1016/j.cpcardiol.2015.06.002.
- Keller DI, Rougier JS, Kucera JP, Benammar N, Fressart V, Guicheney P, Madle A, Fromer M, Schläpfer J, Abriel H. Brugada syndrome and fever: genetic and molecular characterization of patients carrying SCN5A mutations. *Cardiovasc Res*. 2005;67(3):510–9. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.03.024.
- Barajas-Martinez HM, Hu D, Cordeiro JM, Wu Y, Kovacs RJ, Meltzer H, Kui H, Elena B, Brugada R, Antzelevitch C, Dumaine R. Lidocaine-induced Brugada syndrome phenotype linked to a novel double mutation in the cardiac sodium channel. *Circ Res*. 2008;103(4):396–404. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.172619.
- Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, Blom N, Brugada J, Chiang CE, Hukuri H, Kannankeril P, Krahn A, Leenhardt A, Moss A, Schwartz PJ, Shimizu W, Tomaselli G, Tracy C; Document Reviewers, Ackerman M, Belhassen B, Estes NA 3rd, Fatkin D, Kalman J, Kaufman E, Kirchhof P, Schulze-Bahr E, Wolpert C, Vohra J, Refaat M, Etheridge SP, Campbell RM, Martin ET, Quek SC; Heart Rhythm Society; European Heart Rhythm Association; Asia Pacific Heart Rhythm Society. Executive summary: HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes. *Europace*. 2013;15(10):1389–406. doi: 10.1093/europace/eut272.
- Brugada J, Brugada R, Brugada P. Pharmacological and device approach to therapy of inherited cardiac diseases associated with cardiac arrhythmias and sudden death. *J Electrocardiol*. 2000;33 Suppl:41–7. doi: 10.1054/jelc.2000.20322.
- Brugada P, Brugada R, Brugada J, Geelen P. Use of the prophylactic implantable cardioverter defibrillator for patients with normal hearts. *Am J Cardiol*. 1999;83(5B):98D–100D. doi: 10.1016/S0002-9149(98)01009-1.
- Lizotte E, Junttila MJ, Dube MP, Hong K, Benito B, DE Zutter M, Henkens S, Sarkozy A, Huikuri HV, Towbin J, Vatta M, Brugada P, Brugada J, Brugada R. Genetic modulation of Brugada syndrome by a common polymorphism. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2009;20(10):1137–41. doi: 10.1111/j.1540-8167.2009.01508.x.
- Sommariva E, Pappone C, Martinelli Boneschi F, Di Resta C, Rosaria Carbone M, Salvi E, Vergara P, Sala S, Cusi D, Ferrari M, Benedetti S. Genetics can contribute to the prognosis of Brugada syndrome: a pilot model for risk stratification. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(9):911–7. doi: 10.1038/ejhg.2012.289.
- Montaigne D, Maréchal X, Lacroix D, Staels B. From cardiac mitochondrial dysfunction to clinical arrhythmias. *Int J Cardiol*. 2015;184:597–9. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.03.012.
- Tse G, Yan BP, Chan YW, Tian XY, Huang Y. Reactive oxygen species, endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction: the link with cardiac arrhythmogenesis. *Front Physiol*. 2016;7:313. doi: 10.3389/fphys.2016.00313.
- Zhou L, Solhjoo S, Millare B, Plank G, Abraham MR, Cortassa S, Trayanova N, O'Rourke B. Effects of regional mitochondrial depolarization on electrical propagation: implications for arrhythmogenesis. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2014;7(1):143–51. doi: 10.1161/CIRCEP.113.000600.
- Liu M, Liu H, Dudley SC Jr. Reactive oxygen species originating from mitochondria regulate the cardiac sodium channel. *Circ Res*. 2010;107(8):967–74. doi: 10.1161/CIRCRESA-HA.110.220673.



22. Ng YS, Grady JP, Lax NZ, Bourke JP, Alston CL, Hardy SA, Falkous G, Schaefer AG, Radunovic A, Mohiddin SA, Ralph M, Alhakim A, Taylor RW, McFarland R, Turnbull DM, Gorman GS. Sudden adult death syndrome in m.3243A>G-related mitochondrial disease: an unrecognized clinical entity in young, asymptomatic adults. *Eur Heart J*. 2016;37(32):2552–9. doi: 10.1093/eurheartj/ehv306.
23. Castro MG, Huerta C, Reguero JR, Soto MI, Doménech E, Alvarez V, Gómez-Zaera M, Nunes V, González P, Corao A, Coto E. Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2006;112(2):202–6. doi: 10.1016/j.ijcard.2005.09.008.
24. Hagen CM, Aidt FH, Hedley PL, Jensen MK, Havndrup O, Kanter JK, Moolman-Smook JC, Larsen SO, Bundgaard H, Christiansen M. Mitochondrial haplogroups modify the risk of developing hypertrophic cardiomyopathy in a Danish population. *PLoS One*. 2013;8(8):e71904. doi: 10.1371/journal.pone.0071904.
25. Tafti MF, Khatami M, Rezaei S, Heidari MM, Hadadzadeh M. Novel and heteroplasmic mutations in mitochondrial tRNA genes in Brugada syndrome. *Cardiol J*. 2018;25(1):113–9. doi: 10.5603/CJ.a2017.0104.
26. Stocchi L, Polidori E, Potenza L, Rocchi MB, Calcabrini C, Busacca P, Capalbo M, Potenza D, Amati F, Mango R, Romeo F, Novelli G, Stocchi V. Mutational analysis of mitochondrial DNA in Brugada syndrome. *Cardiovasc Pathol*. 2016;25(1):47–54. doi: 10.1016/j.carpath.2015.10.001.
27. Bayés de Luna A, Brugada J, Baranchuk A, Borggrefe M, Breithardt G, Goldwasser D, Lambiase P, Riera AP, Garcia-Niebla J, Pastore C, Oreto G, McKenna W, Zareba W, Brugada P, Brugada P. Current electrocardiographic criteria for diagnosis of Brugada pattern: a consensus report. *J Electrocardiol*. 2012;45(5):433–42. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2012.06.004.
28. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999;23(2):147. doi: 10.1038/13779.
29. van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat*. 2009;30(2):E386–94. doi: 10.1002/humu.20921.
30. Morozova I, Evsyukov A, Kon'kov A, Grosheva A, Zhukova O, Rychkov S. Russian ethnic history inferred from mitochondrial DNA diversity. *Am J Phys Anthropol*. 2012;147(3):341–51. doi: 10.1002/ajpa.21649.

The study on the modifying role of mitochondrial DNA polymorphism in the Brugada syndrome manifestation

M.V. Golubenko¹ • V.S. Mikhaylov² • E.V. Zaklyazminskaya^{2,3}

Background: Brugada syndrome is a hereditary disease with genetic and phenotypic variability characterized by a high risk for arrhythmia and sudden cardiac death. It is assumed that modifying genetic factors contribute to the variability of the phenotype. Mitochondrial DNA (mtDNA) polymorphism can be considered among such factors, since mitochondrial dysfunction, including that associated with mtDNA variants, can have an arrhythmogenic effect. **Aim:** To study possible association between mtDNA polymorphism with the phenotype in the Russian patients with Brugada syndrome. **Materials and methods:** We have studied mtDNA polymorphism in 36 Russian probands with Brugada syndrome. Common “European” haplogroups of mtDNA were assigned using sequencing of the hypervariable segment 1 in mtDNA D-loop. **Results:** In the study sample, the frequencies of the mtDNA haplogroups generally correspond to the distribution common for

the Russian populations, except the J haplogroup, which was not found in the studied probands. The results contradict with previously published data on the J and T haplogroups as risk factors for Brugada syndrome manifestation. **Conclusion:** The study did not reveal the role of mtDNA polymorphism (J and T haplogroups) in the formation of the Brugada syndrome phenotype.

Key words: Brugada syndrome, modifying genetic factors, mitochondrial DNA

For citation: Golubenko MV, Mikhaylov VS, Zaklyazminskaya EV. The study on the modifying role of mitochondrial DNA polymorphism in the Brugada syndrome manifestation. *Almanac of Clinical Medicine*. 2019;47(1):66–71. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-007.

Received 28 January 2018; accepted 10 February 2019; published 15 February 2019

Funding

The study was done under the State project by the Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, with the equipment of the Center for Collaborative Usage “Medical Genomics” (Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences).

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Mariya V. Golubenko – PhD (in Biol.), Senior Research Fellow, Population Genetics Laboratory¹
✉ 10 Naberezhnaya reki Ushayki ul., Tomsk, 634050, Russian Federation. Tel.: +7 (3822) 51 37 44. E-mail: maria.golubenko@medgenetics.ru

Vadim S. Mikhaylov – Research Fellow, Laboratory of Medical Genetics²

Elena V. Zaklyazminskaya – MD, PhD, Head of Laboratory of Medical Genetics²; Associate Professor, Department of Cell Biology and Molecular Genetics, Medical-Biological Faculty³

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; 10 Naberezhnaya reki Ushayki ul., Tomsk, 634050, Russian Federation

² Petrovsky National Research Center of Surgery; 2 Abrikosovskiy pereulok, Moscow, 119991, Russian Federation

³ Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU); 1 Ostrovityanova ul., Moscow, 117997, Russian Federation



Оригинальная статья

Ассоциация генетических маркеров целиакии с репродуктивными нарушениями

Минайчева Л.И.¹ • Брагина Е.Ю.¹ • Жалсанова И.Ж.¹ • Чеснокова Н.А.¹ • Марусин А.В.¹

Минайчева Лариса Ивановна – д-р мед. наук, врач-генетик, медико-генетический центр¹

✉ 634040, г. Томск, ул. Московский тракт, 3, Российская Федерация.
Тел.: +7 (913) 864 61 71.
E-mail: larisa.minaycheva@medgenetics.ru

Брагина Елена Юрьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории популяционной генетики¹

Жалсанова Ирина Жаргаловна – аспирант лаборатории популяционной генетики¹

Чеснокова Наталья Александровна – ординатор¹

Марусин Андрей Викторович – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории эволюционной генетики¹

Обоснование. Многочисленные исследования показали связь генов, вовлеченных в иммунный ответ, с бесплодием и невынашиванием беременности. Наиболее значимые ассоциации установлены для генов цитокинов (*IL1B*, *IL6*, *IL10*, *IL18*), хемокинов (*CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*), генов главного комплекса гистосовместимости HLA II класса (*DQA1*, *DQB1*, *DRB1*). Гены HLA ассоциированы с целиакией, генетически детерминированным аутоиммунным заболеванием, одним из симптомов которого является нарушение репродуктивной функции у мужчин и женщин. **Цель** – оценить распространенность полиморфных вариантов генов иммунного ответа (HLA: *DQA1*, *DQB1*, *DRB1*; *TNF*, *IL10*, *CXCL10*) у пациентов с нарушением репродуктивной функции. **Материал и методы.** В пилотном исследовании изучен полиморфизм генов *IL10* (rs1800872), *TNF* (rs1800629), *CXCL10* (rs4386624), HLA II класса (*DQA1*, *DQB1*, *DRB1*) у семейных пар (n=220) с репродуктивными нарушениями (бесплодие и невынашивание беременности). Генотипирование осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (реал-тайм ПЦР) и рестрикционного анализа продуктов амплификации (ПЦР-ПДРФ). Для сравнения использовали популяционные данные о генотипах и аллелях по исследуемым вариантам генов *IL10* (rs1800872), *TNF* (rs1800629), *CXCL10* (rs4386624). Различия в распространенности аллелей и генотипов

оценивали с помощью χ^2 теста. Достигнутый уровень значимости различий считали при $p < 0,05$. Гаплотипическое разнообразие рассчитывали с помощью программы Arlequin, версия 3.5.x. **Результаты.** Наблюдали значительное перераспределение генотипов и аллелей по варианту гена *TNF* (rs1800629) у мужчин с нарушениями функций репродукции по сравнению с популяционными данными. Для других изученных вариантов генов различий не обнаружено. В исследуемой выборке частота гаплотипов генов HLA II класса (*DQA1*, *DQB1*, *DRB1*), связанных с целиакией (DQ2 и DQ8), составила 23,8%. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о важной роли генов, связанных с целиакией, в развитии нарушений репродукции.

Ключевые слова: репродуктивная функция, невынашивание беременности, бесплодие, целиакия, гены иммунного ответа, полиморфизм

Для цитирования: Минайчева ЛИ, Брагина ЕЮ, Жалсанова ИЖ, Чеснокова НА, Марусин АВ. Ассоциация генетических маркеров целиакии с репродуктивными нарушениями. Альманах клинической медицины. 2019;47(1):72–82. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-006.

Поступила 04.11.2018; принята к публикации 31.01.2019; опубликована 15.02.2019

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики (НИИ медицинской генетики) ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; 634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10, Российская Федерация



Бесплодие диагностируется у 6–17% супружеских пар и представляет собой серьезную клиническую и социальную проблему [1]. Уровень распространенности и структура причин бесплодия значительно различаются в развитых странах и в развивающихся регионах мира. По данным Росстата, в нашей стране отмечается рост этой патологии. Так, в 2017 г. по результатам анализа заболеваемости показатель бесплодия (впервые выявленного) у женщин составил 278,8 (на 100 000 женщин в возрасте от 18 до 49 лет), в то время как в 2005 г. он был на уровне 146,6 [2]. Невынашивание беременности – одно из частых событий, которым заканчивается от 15 до 25% случаев всех беременностей и которое регистрируется у 5% супружеских пар [3, 4]. В настоящее время не существует надежных методов оценки степени риска этого серьезного осложнения.

К основным причинам, приводящим к бесплодию и невынашиванию беременности, относятся структурные аномалии репродуктивных органов, хронический эндометриоз, возраст матери, злоупотребление алкоголем, курение, гормональные и иммунологические нарушения, психоэмоциональное состояние, мужской фактор, а также генетические причины. Среди генетических факторов повторных потерь беременности весомая доля (от 50 до 70%) принадлежит хромосомным аномалиям одного из партнеров [5, 6].

Несомненно, успешная беременность зависит от иммунного баланса. Во время беременности преобладает субпопуляция цитокинов Th2-типа. Они индуцируют иммунную толерантность матери к плоду как к аллотрансплантату, тем самым обеспечивая успешную имплантацию и репродуктивные результаты. Сдвиг в сторону цитокинов Th1-типа приводит к иммунному дисбалансу, в результате которого значительно возрастает риск потери беременности [7]. В этой связи важная роль отводится исследованию генетической предрасположенности, обусловленной влиянием функционально ослабленных вариантов генов, вовлеченных прежде всего в иммунный ответ, а также в процессы коагуляции, обмена веществ и ангиогенез [8]. Наиболее выраженные ассоциации, регистрируемые в разных популяциях, установлены для генов главного комплекса тканевой совместимости человека (HLA), фенотипирование которых получило широкое применение в клинической практике, генов цитокинов, включая *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *IL18*, и многих других генов, необходимых для успешной имплантации эмбриона и поддержания активности Th2-клеток [3, 9,

10]. Однако после полного скрининга известных этиологических или предрасполагающих факторов примерно в 40% всех случаев привычного невынашивания причина этого состояния остается неизвестной [11].

В нескольких исследованиях установлено влияние заболеваний кишечника на дисфункцию репродуктивной системы [12, 13]. Целиакия, будучи наиболее изученной среди этих патологий, может стать интересной моделью для исследования нарушений функции репродуктивной системы. Целиакия – хроническое генетически детерминированное аутоиммунное заболевание, характеризующееся иммунопатологическими нарушениями слизистой оболочки тонкой кишки. Репродуктивные расстройства при целиакии относят к атипичному течению заболевания, когда гастроинтестинальные симптомы отсутствуют. Для этой формы целиакии характерны бесплодие, спонтанные аборт, привычное невынашивание беременности у женщин, вторичное бесплодие у мужчин [14, 15]. Предполагается, что способность антител классов IgA и IgG к тканевой трансглутаминазе нарушать инвазивность трофобласта и дифференцировку эндотелиальных клеток эндометрия лежит в основе неудач ранней плацентации при целиакии [12].

Гены HLA в значительной степени ассоциированы с развитием целиакии. Так, у 90% пациентов выявляют гаплотипы DQ2 (DQA1*0501-DQB1*0201) и DQ8 (DQA1*0301-DQB1*0302) [16, 17]. Наличие рисков для целиакии аллелей HLA не объясняет полностью генетическую составляющую заболевания. Получены убедительные данные об ассоциации полиморфных вариантов генов *IL10*, *TNFA* с подверженностью целиакии [18–20]. В ряде работ обнаружена важная роль генов хемокинов (*CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*) в развитии воспаления при целиакии [21, 22]. У женщин с целиакией отмечен высокий риск развития репродуктивных нарушений по сравнению с общей популяцией [23, 24]. У мужчин с целиакией также выявляются фертильные проблемы, включая андрогенную резистентность, снижение подвижности сперматозоидов [25, 26], недостаточность минералов и витаминов [27–29]. Анализ данных литературы показал противоречивость полученных результатов. В недавнем масштабном исследовании не было обнаружено снижения репродуктивной функции у пациенток с диагностированной целиакией, в то же время наблюдается значительное снижение фертильности до установления диагноза аутоиммунного заболевания [30]. Возможно, различия в результатах проведенных

**Таблица 1.** Последовательности праймеров для генотипирования полиморфных вариантов генов *IL10* (rs1800872), *TNF* (rs1800629), *CXCL10* (rs4386624)

Ген	Полиморфизм	Метод генотипирования	Последовательности праймеров	Эндонуклеаза и фрагменты рестрикции, п.о.
<i>IL10</i>	rs1800872	ПЦР-ПДРФ	F: 5'-ggtcacgtgagcactacct	Rsa I A: 311+182; C: 493
			R: 5'-aaaaagttgatttcctgggg	
<i>TNF</i>	rs1800629	ПЦР в режиме реального времени	F: gaaatggaggcaataggtttgag	–
			R: ggcaactgactgattgtgtgtag	
			FAM: ccgtcctcatgcc-RTQ1	
			ROX: ccgtcccatgcc - BHQ2	
<i>CXCL10</i>	rs4386624	ПЦР в режиме реального времени	F: gtaggaactccatcataagcaga	–
			R: tctacctcacctccctctctttt	
			FAM: tctagcaaattgcattacccaagcaa	
			HEX: tctagcaaattccattacccaagcaa	

ПЦР – полимеразная цепная реакция, ПЦР-ПДРФ – полимеразная цепная реакция с последующим анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов

Использовали последовательности праймеров из опубликованных источников [33, 34]. F (forward) – прямой праймер, R (reverse) – обратный праймер. FAM, ROX, HEX – флуоресцентные красители для детекции ПЦР-продукта

исследований обусловлены тем, что последствия, связанные с репродуктивной дисфункцией, как у мужчин с целиакией, так и у женщин успешно корректируются с помощью безглютеновой диеты [31, 32]. Не исключено, что генетические причины, предрасполагающие к целиакии, играют важную роль в снижении фертильности.

Цель – изучить распространенность полиморфных вариантов генов *TNF*, *IL10*, *CXCL10*, HLA: *DQA1*, *DQB1*, *DRB1* у пациентов с нарушением репродуктивной функции.

Материал и методы

В работе изучен полиморфизм генов, для которых ранее установлен высокий прогностический потенциал в отношении целиакии, включая *IL10* (rs1800872), *TNF* (rs1800629), HLA II класса (*DQA1*, *DQB1*, *DRB1*), а также вариант гена *CXCL10* (rs4386624) [14, 15, 18–22]. Исследование носит пилотный характер. Генотипирование выполнено у 110 семейных пар с нарушениями репродуктивной функции (220 человек), обратившихся в генетическую клинику НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ в период с декабря 2014 по апрель 2018 года. Критериями включения в исследование были диагнозы «бесплодие» и «невыведение беременности» (все случаи подтверждены медицинскими документами: выписками из стационаров и протоколами ультразвукового

исследования). Средний возраст женщин ($\pm$ стандартное отклонение) составил $32,25 \pm 4,6$ года, мужчин – $34,94 \pm 6,49$ года. Все пациенты подписали информированное согласие об участии в исследовании.

Забор образцов крови, сбор данных анамнеза, формирование групп исследования проводились сотрудниками генетической клиники НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Из анализа исключены индивидуумы с экстрагенитальной патологией: диабетом, заболеваниями щитовидной железы, аутоиммунными заболеваниями, а также с хромосомными нарушениями и женщины с пороками развития половой системы (врожденные пороки развития матки).

Для молекулярно-генетического исследования использовали образцы ДНК, экстрагированные из лейкоцитов периферической крови с помощью фенол-хлороформного метода. Генотипирование полиморфных вариантов генов выполнено с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (реал-тайм ПЦР), а также метода полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ анализ). Структура праймеров представлена в табл. 1. Для сравнения использовали данные о частотах генотипов и аллелей исследуемых вариантов генов (*IL10* (rs1800872), *TNF*



Таблица 2. Частоты аллелей и генотипов *IL10* (rs1800872), *TNF* (rs1800629), *CXCL10* (rs4386624) в группе супружеских пар с репродуктивной дисфункцией

Ген	Полиморфизм	Генотипы	Семьи, n (%)	Популяция, n (%)	Критерий χ^2 (значение <i>p</i>)	
					*	**
<i>IL10</i>	1800872	CC	105 (53,8)	63 (63,6)	2,5761 (0,2758)	1,8312 (0,1759)
		CA	78 (40,0)	31 (31,3)		
		AA	12 (6,2)	5 (5,1)		
		Аллель А, %	26,2	20,7		
<i>TNF</i>	1800629	GG	168 (79,6)	64 (64,7)	8,0824 (0,0176)	6,3912 (0,0115)
		GA	40 (19)	33 (33,3)		
		AA	3 (1,4)	2 (2,0)		
		Аллель А, %	10,9	18,6		
<i>CXCL10</i>	4386624	CC	31 (15,0)	22 (22,2)	3,2798 (0,1939)	0,2412 (0,6233)
		CG	118 (57,0)	47 (47,5)		
		GG	58 (28,0)	30 (30,3)		
		Аллель G, %	43,5	45,9		

p – уровень значимости достигнутых различий при сравнении двух выборок: * при сравнении по частотам генотипов; ** при сравнении по частотам аллелей

(rs1800629), *CXCL10* (rs4386624)) популяционной выборки из проекта «1000 геномов» (данные по распространенности частот у американцев северо- и западноевропейского происхождения (штат Юта, США)). Типирование специфичностей генов HLA II класса (*DQA1*, *DQB1*, *DRB1*) осуществляли с помощью коммерческих наборов производства ООО «ДНК-технология» (Москва). Согласно инструкции производителя в работе выявляли следующие группы аллелей для гена *DRB1*: *01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15, *16; для гена *DQB1*: *02, *0301, *0302, *0303, *0304, *0305, *0401/*0402, *0501, *0502/*0504, *0503, *0601, *0602-8; для гена *DQA1*: *0201, *0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601.

Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (регистрационный номер 79, протокол № 3 от 27.11.2014).

Статистический анализ. Различия в распространенности аллелей и генотипов оценивали с помощью χ^2 теста. Достигнутый уровень значимости различий считали при $p < 0,05$. Для расчетов использовали онлайн программу <https://www.socscistatistics.com>. Отношение шансов и доверительный интервал рассчитывали с помощью онлайн калькулятора (<http://vassarstats.net/odds2x2>).

html). Распространенность гаплотипов генов HLA II класса оценена в программе Arlequin, версия 3.5.x [35].

Результаты

В изученной группе супружеских пар с нарушениями репродуктивной функции наблюдали значительное перераспределение генотипов и аллелей по варианту гена *TNF* rs1800629 по сравнению с популяцией (табл. 2). Частота генотипа GG среди супружеских пар составила 79,6%, что значительно превышает популяционную распространенность – 64,7% ($p = 0,0176$).

При сравнении подгруппы женщин с популяционной выборкой не наблюдали значимых различий ни для одного из изученных полиморфных вариантов генов цитокинов (табл. 3).

Значительные различия были получены при сравнении подгруппы мужчин с частотами генотипов и аллелей популяционной группы для гена *TNF* (rs1800629) (табл. 4). У мужчин наблюдается преобладание гомозигот по аллелю G*rs1800629 (82,7%, $p = 0,0049$), а также снижение частоты гетерозигот (17,3%) по сравнению с популяцией (33,3%, $p = 0,0086$).

Преобладающими гаплотипами по генам HLA II класса в исследуемой выборке были



Таблица 3. Частоты аллелей и генотипов *IL10* (rs1800872), *TNF* (rs1800629), *CXCL10* (rs4386624) у женщин с нарушением репродуктивных функций

Ген	Полиморфизм	Генотипы	Женщины, n (%)	Популяция, n (%)	Критерий χ^2 (значение <i>p</i>)	
					*	**
<i>IL10</i>	1800872	CC	52 (53,1)	63 (63,6)	2,2789 (0,3199)	1,5436 (0,2141)
		CA	40 (40,8)	31 (31,1)		
		AA	6 (6,1)	5 (5,1)		
		Аллель А, %	26,5	20,7		
<i>TNF</i>	rs1800629	GG	82 (76,6)	64 (64,7)	4,3150 (0,1156)	2,0262 (0,1546)
		GA	22 (20,6)	33 (33,3)		
		AA	3 (2,8)	2 (2,0)		
		Аллель А, %	13,1	18,6		
<i>CXCL10</i>	rs4386624	CC	23 (22,1)	22 (22,2)	5,3236 (0,0698)	0,0036 (0,9518)
		CG	66 (63,5)	47 (47,5)		
		GG	15 (14,4)	30 (30,3)		
		Аллель G, %	46,2	45,9		

p – уровень значимости достигнутых различий при сравнении двух выборок: * при сравнении по частотам генотипов; ** при сравнении по частотам аллелей

Таблица 4. Частоты аллелей и генотипов *IL10* (rs1800872), *TNF* (rs1800629), *CXCL10* (rs4386624) у мужчин с нарушением репродуктивных функций

Ген	Полиморфизм	Генотипы	Мужчины, n (%)	Популяция, n (%)	Критерий χ^2 (значение <i>p</i>)	
					*	**
<i>IL10</i>	1800872	CC	52 (53,6)	63 (63,6)	2,0754 (0,3542)	1,6901 (0,1936)
		CA	38 (39,2)	31 (31,3)		
		AA	7 (7,2)	5 (5,1)		
		Аллель А, %	26,8	20,7		
<i>TNF</i>	rs1800629	GG	86 (82,7)	64 (64,7)	9,5210 (0,0086)	7,8830 (0,0049)
		GA	18 (17,3)	33 (33,3)		
		AA	0 (0)	2 (2,0)		
		Аллель А, %	9,5	18,6		
<i>CXCL10</i>	rs4386624	CC	35 (34)	22 (22,2)	1,5059 (0,4709)	0,9035 (0,3418)
		CG	52 (50,5)	47 (47,5)		
		GG	16 (15,5)	30 (30,3)		
		Аллель G, %	40,8	45,9		

p – уровень значимости достигнутых различий при сравнении двух выборок: * при сравнении по частотам генотипов; ** при сравнении по частотам аллелей



DQA1*0501-DQB1*0301-DRB1*11(05) (12%), а также гаплотипы, связанные с целиакией (DQ2 и DQ8), суммарная частота которых составила 23,8% (табл. 5).

Обсуждение

Основываясь на данных литературы о том, что возможным фактором бесплодия выступают латентные формы целиакии, как у женщин, так и у мужчин, в настоящем исследовании у семейных пар, наблюдающихся по поводу нарушения репродуктивной функции, мы изучили полиморфные варианты генов, наиболее значимые для развития целиакии [23, 24, 27–29].

В результате проведенного анализа выявлена ассоциация полиморфизма гена *TNF* (rs1800629) с нарушением репродукции. Ассоциации полиморфизма гена *TNF* в развитии аутоиммунного процесса при целиакии изучали во многих работах. Согласно данным последнего метаанализа, для полиморфизма rs1800629 установлено: риск развития целиакии связан с аллелем А ($p=0,001$; отношение шансов (ОШ) 2,051, 95% доверительный интервал (ДИ) 1,452–2,895) [36]. Мы предполагали, что рискованные аллели в отношении целиакии будут ассоциированы с нарушениями репродуктивных функций, однако в нашей работе рисковым относительно репродуктивных дисфункций у мужчин оказался другой аллель – G* rs1800629 ($p=0,0031$; ОШ 2,43, 95% ДИ 1,28–4,63), а также гомозиготный генотип GG ($p=0,0034$; ОШ 2,61, 95% ДИ 1,3–5,3). Изученный полиморфизм связывают с изменениями транскрипционной активности гена у носителей разных вариантов аллелей. По сравнению с аллелем G* rs1800629 гена *TNF* аллель A* rs1800629 имеет более высокую транскрипционную активность и часто связан с аутоиммунными заболеваниями [37]. Фактор некроза опухоли альфа представляет собой мощный противовоспалительный и иммунорегуляторный цитокин, который, опосредуя цитокиновый каскад, вызывает воспаление, регулирует дифференциацию, пролиферацию и гибель клеток [38]. Ген *TNF* имеет тесную связь с генами HLA I и II класса [39]. Расположение гена в основном комплексе гистосовместимости и предполагаемое влияние полиморфизма гена *TNF* (rs1800629) на промоторную активность повышают вероятность того, что этот полиморфизм может оказывать воздействие на иммунологический гомеостаз и способствовать нарушениям репродуктивной функции. Несмотря на то что в исследуемой выборке эта зависимость наблюдалась исключительно у мужчин (см. табл. 4), эти данные позволяют предположить важное значение

Таблица 5. Распространенность предрасполагающих к целиакии гаплотипов HLA DQA1-DQB1 среди пар с нарушениями репродуктивной функции

DQA1	DQB1	Тип	Частота гаплотипа
*0301	*0302	DQ8	5,4
*0201	*02	DQ2	10,7
*0501	*02	DQ2	7,7
Всего			23,8

данного гена в нарушении репродукции. Как показано в эксперименте на животных моделях, нокаут гена *TNF* значительно влияет на концентрацию сперматозоидов [40]. Кроме того, отмечается снижение плодовитости мышей за счет увеличения доимплантационных потерь у нокаутированных *TNF*^{-/-} животных [41]. Некоторые исследователи отмечают: подвижность и морфология сперматозоидов связаны с уровнем TNFA [42, 43], а также с функциональным полиморфизмом гена *TNF* (rs1800629) [44, 45]. В семенниках рецепторы *TNF* (p55) присутствуют в клетках Сертоли и Лейдига [46], что позволяет TNFA влиять на их функции.

Несмотря на то что в нашем исследовании не выявлено ассоциаций с репродуктивной дисфункцией у женщин, в литературе есть данные о связи полиморфизма гена *TNF* (rs1800629) у женщин моногеноидной популяции с привычным невынашиванием беременности [47]. Другие полиморфные варианты этого гена также имеют высокий потенциал, связанный с нарушениями фертильности у женщин. Варианты гена *TNF* -1031T>C и -238G>A способствуют увеличению риска повторных спонтанных аборт [48]. Продукция *TNF* в периферической крови и децидуальных тканях у пациенток с привычным невынашиванием беременности значительно выше, чем в группе контроля. У пациенток, перенесших спонтанный аборт дважды, уровень *TNF* был сходным с таковым у женщин с тремя спонтанными абортами в анамнезе, но был значительно ниже, чем у пациенток, перенесших спонтанный аборт более трех раз. Уровень *TNF* у пациенток, впервые перенесших спонтанный аборт, был статистически значимо ниже, чем у женщин с двумя спонтанными абортами в анамнезе [49].

Оценка частот гаплотипов генов HLA II класса показала, что в исследуемой выборке распространены гаплотипы, связанные с целиакией. Так, частота гаплотипов DQ2 и DQ8 составила 23,8% (см. табл. 5). Частота данных гаплотипов, несомненно, была значительно ниже в исследуемой выборке по сравнению с пациентами с целиакией, где она

превышает 90% [50]. Вместе с тем этот показатель в исследованной выборке был значимым.

Система HLA – важный фактор направленности в выборе половых партнеров [51, 52]. Отмечается, что гомозиготность по гену *HLA DRB1* связана с неблагоприятным прогнозом в отношении репродуктивного успеха [53]. Большинство работ, связанных с HLA генами, касаются определения совпадения аллелей между супругами. Тем не менее к настоящему времени накоплены сведения о связи аутоиммунных процессов, в основе которых лежит дефект в генах HLA, с нарушением репродуктивной функции. Выдвигается гипотеза, согласно которой бесплодие может быть вторично по отношению к аутоиммунному заболеванию [54]. Полученные данные о распространенности аллелей риска целиакии среди супружеских пар позволяют предположить недостаточное обследование супружеских пар на наличие патологий аутоиммунного характера или атипичное либо бессимптомное течение заболевания как одну из причин нарушения репродукции.

Стоит отметить, что настоящее исследование носит пилотный характер и имеет ряд ограничений. В частности, не была предусмотрена контрольная группа без репродуктивных нарушений, для сравнения использовали популяционные данные по индивидам, проживающим в ином географическом регионе, чем пациенты основной группы.

На современном этапе исследования репродуктивных дисфункций еще только накапливается материал о выявлении латентных и скрытых форм целиакии у пациентов с нарушением

фертильности и акушерскими осложнениями. Проведенный анализ показал достаточно высокую распространенность аллелей HLA (DQ2 и DQ8), связанных с целиакией, среди семейных пар с нарушениями репродукции. Исходя из этого, следует предположить, что проблемы невынашивания отчасти могут быть связаны с субклиническим течением аутоиммунного заболевания. Имея в виду ограничения выполненной работы, для подтверждения данной гипотезы необходимо проведение дальнейшего исследования в более многочисленной выборке пациентов с репродуктивными нарушениями, которое будет направлено в том числе на тщательный анализ сопутствующей патологии и данных анамнеза.

Заключение

В результате исследования генетических маркеров целиакии среди супружеских пар с репродуктивной дисфункцией установлена ассоциация полиморфизма гена *TNF* (rs1800629) у мужчин, показана высокая распространенность аллелей, предрасполагающих к аутоиммунному воспалительному заболеванию (DQ2 и DQ8), что предполагает наличие связи субклинического течения целиакии с нарушением репродукции. Учитывая вышеизложенное, дальнейшее исследование генетического аспекта целиакии в контексте невынашивания беременности и бесплодия представляется перспективным направлением, поскольку диагностика аутоиммунных состояний с последующей их коррекцией, возможно, позволит снизить частоту репродуктивных неудач. ©

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена в рамках выполнения Государственного задания Министерства науки и высшего образования № 075-00603-19-00 (Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»).

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Л.И. Минячева и Е.Ю. Брагина – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материалов, анализ полученных данных, написание текста; И.Ж. Жалсанова и Н.А. Чеснокова – молекулярно-генетический анализ, интерпретация полученных данных, обсуждение и написание текста; А.В. Марусин – обсуждение дизайна исследования, статистическая обработка и интерпретация полученных данных, написание текста. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Литература

1. Паскарь СС, Боярский КЮ. Эпидемиологические аспекты бесплодного брака (обзор литературы). Проблемы репродукции. 2017;23(5):23–6. doi: 10.17116/repro201723523-26.
2. Здравоохранение в России. 2017: Статистический сборник. М.: Росстат; 2017. 170 с.
3. El Hachem H, Crepau V, May-Panloup P, Desamps P, Legendre G, Bouet PE. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. Int J Womens Health. 2017;9:331–45. doi: 10.2147/IJWH.S100817.
4. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Fertil Steril. 2012;98(5):1103–11. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.048.
5. Gupta B, Singh P. The evolving role of genetics in recurrent pregnancy loss. In: Mehta S, Gupta B, editors. Recurrent pregnancy loss. Singapore: Springer; 2018. p. 67–77.
6. Robberecht C, Pexsters A, Deprest J, Fryns JP, D'Hooghe T, Vermeesch JR. Cyto-



- genetic and morphological analysis of early products of conception following hystero-embryoscopy from couples with recurrent pregnancy loss. *Prenat Diagn*. 2012;32(10):933–42. doi: 10.1002/pd.3936.
7. Tur-Torres MH, Garrido-Gimenez C, Alijotas-Reig J. Genetics of recurrent miscarriage and fetal loss. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017;42:11–25. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.03.007.
 8. Баранов ВС, ред. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб.: Н-Л; 2009. 528 с.
 9. Perez N, Ostojić S, Kapović M, Peterlin B. Systematic review and meta-analysis of genetic association studies in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril*. 2017;107(1):150–9.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.10.007.
 10. Shi X, Xie X, Jia Y, Li S. Maternal genetic polymorphisms and unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Clin Genet*. 2017;91(2):265–84. doi: 10.1111/cge.12910.
 11. Tersigni C, D'Ippolito S, Di Nicuolo F, Marana R, Valenza V, Masciullo V, Scaldaferrì F, Malatucci F, de Waure C, Gasbarrini A, Scambia G, Di Simone N. Recurrent pregnancy loss is associated to leaky gut: a novel pathogenic model of endometrium inflammation? *J Transl Med*. 2018;16(1):102. doi: 10.1186/s12967-018-1482-y.
 12. D'Ippolito S, Gasbarrini A, Castellani R, Rocchetti S, Sisti LG, Scambia G, Di Simone N. Human leukocyte antigen (HLA) DQ2/DQ8 prevalence in recurrent pregnancy loss women. *Autoimmun Rev*. 2016;15(7):638–43. doi: 10.1016/j.autrev.2016.02.009.
 13. Saccone G, Berghella V, Sarno L, Maruotti GM, Cetin I, Greco L, Khashan AS, McCarthy F, Martinelli D, Fortunato F, Martinelli P. Celiac disease and obstetric complications: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;214(2):225–34. doi: 10.1016/j.ajog.2015.09.080.
 14. Лазебник ЛБ, Ткаченко ЕИ, Орешко ЛС, Ситкин СИ, Карпов АА, Немцов ВИ, Осипенко МФ, Радченко ВГ, Федоров ЕД, Медведева ОИ, Селиверстов ПВ, Соловьева ЕА, Шабанова АА, Журавлева МС. Рекомендации по диагностике и лечению целиакии взрослых. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015;(5):3–12.
 15. Admou B, Essaadouni L, Krati K, Zaher K, Sbihi M, Chabaa L, Belaabidia B, Alaoui-Yazidi A. Atypical celiac disease: from recognizing to managing. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:637187. doi: 10.1155/2012/637187.
 16. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology*. 1993;105(3):910–22. doi: 10.1016/0016-5085(93)90912-V.
 17. Polvi A, Arranz E, Fernandez-Arquero M, Collin P, Mäki M, Sanz A, Calvo C, Maluenda C, Westman P, de la Concha EG, Partanen J. HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol*. 1998;59(3):169–75. doi: 10.1016/S0198-8859(98)00008-1.
 18. Barisani D, Ceroni S, Meneveri R, Cesana BM, Bardella MT. IL-10 polymorphisms are associated with early-onset celiac disease and severe mucosal damage in patients of Caucasian origin. *Genet Med*. 2006;8(3):169–74. doi: 10.109701.gim.0000204464.87540.39.
 19. de la Concha EG, Fernández-Arquero M, Vigil P, Rubio A, Maluenda C, Polanco I, Fernandez C, Figueredo MA. Celiac disease and TNF promoter polymorphisms. *Hum Immunol*. 2000;61(5):513–7. doi: 10.1016/S0198-8859(99)00187-1.
 20. Garrote JA, Arranz E, Tellería JJ, Castro J, Calvo C, Blanco-Quiros A. TNF alpha and LT alpha gene polymorphisms as additional markers of celiac disease susceptibility in a DQ2-positive population. *Immunogenetics*. 2002;54(8):551–5. doi: 10.1007/s00251-002-0498-9.
 21. Bondar C, Araya RE, Guzman L, Rua EC, Chopita N, Chirido FG. Role of CXCR3/CXCL10 axis in immune cell recruitment into the small intestine in celiac disease. *PLoS One*. 2014;9(2):e89068. doi: 10.1371/journal.pone.0089068.
 22. Bragde H, Jansson U, Fredrikson M, Grodzinsky E, Söderman J. Celiac disease biomarkers identified by transcriptome analysis of small intestinal biopsies. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(23):4385–401. doi: 10.1007/s00018-018-2898-5.
 23. Tersigni C, Castellani R, de Waure C, Fattorosi A, De Spirito M, Gasbarrini A, Scambia G, Di Simone N. Celiac disease and reproductive disorders: meta-analysis of epidemiologic associations and potential pathogenic mechanisms. *Hum Reprod Update*. 2014;20(4):582–93. doi: 10.1093/humupd/dmu007.
 24. Khashan AS, Henriksen TB, Mortensen PB, McNamee R, McCarthy FP, Pedersen MG, Kenny LC. The impact of maternal celiac disease on birthweight and preterm birth: a Danish population-based cohort study. *Hum Reprod*. 2010;25(2):528–34. doi: 10.1093/humrep/dep409.
 25. Farthing MJ, Rees LH, Edwards CR, Dawson AM. Male gonadal function in coeliac disease: 2. Sex hormones. *Gut*. 1983;24(2):127–35. doi: 10.1136/gut.24.2.127.
 26. Farthing MJ, Rees LH, Dawson AM. Male gonadal function in coeliac disease: III. Pituitary regulation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1983;19(6):661–71. doi: 10.1111/j.1365-2265.1983.tb00043.x.
 27. Ebisch IM, Pierik FH, DE Jong FH, Thomas CM, Steegers-Theunissen RP. Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in men? *Int J Androl*. 2006;29(2):339–45. doi: 10.1111/j.1365-2605.2005.00598.x.
 28. Wallock LM, Tamura T, Mayr CA, Johnston KE, Ames BN, Jacob RA. Low seminal plasma folate concentrations are associated with low sperm density and count in male smokers and non-smokers. *Fertil Steril*. 2001;75(2):252–9. doi: 10.1016/S0015-0282(00)01697-6.
 29. Ebisch IM, Thomas CM, Peters WH, Braat DD, Steegers-Theunissen RP. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update*. 2007;13(2):163–74. doi: 10.1093/humupd/dml054.
 30. Zugna D, Richiardi L, Akre O, Stephansson O, Ludvigsson JF. A nationwide population-based study to determine whether coeliac disease is associated with infertility. *Gut*. 2010;59(11):1471–5. doi: 10.1136/gut.2010.219030.
 31. Ciacci C, De Rosa A, de Michele G, Savino G, Squillante A, Iovino P, Sabbatini F, Mazzacca G. Sexual behaviour in untreated and treated coeliac patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1998;10(8):649–51.
 32. Kotze LM. Gynecologic and obstetric findings related to nutritional status and adherence to a gluten-free diet in Brazilian patients with celiac disease. *J Clin Gastroenterol*. 2004;38(7):567–74. doi: 10.1097/01.mcg.0000131720.90598.6a.
 33. Брагина ЕЮ, Фрейдин МБ, Бабушкина НП, Гараева АФ, Колоколова ОВ, Жалсанова ИЖ, Пузырев ВП. Анализ генов цитокиновой сети в развитии «обратной» коморбидности для бронхиальной астмы и туберкулеза. Медицинская генетика. 2017;16(1):20–4.
 34. Самгина ТА, Бушуева ОЮ, Иванов ВП, Солодилова МА, Назаренко ПМ, Полоников АВ. Связь промоторного полиморфизма -308G/A гена фактора некроза опухоли с тяжестью течения острого панкреатита у русской популяции жителей Курской области. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2014;(9):17–20.
 35. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10(3):564–7. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
 36. Khan S, Mandal RK, Jawed A, Dar SA, Wahid M, Panda AK, Areeshi MY, Ahmed Khan ME, Haque S. TNF-α -308 G>A (rs1800629) polymorphism is associated with celiac disease: A meta-analysis of 11 case-control studies. *Sci Rep*. 2016;6:32677. doi: 10.1038/srep32677.
 37. Fan W, Maoqing W, Wangyang C, Fulan H, Dandan L, Jiaojiao R, Xinshu D, Binbin C, Yashuang Z. Relationship between the polymorphism of tumor necrosis factor-α-308 G>A and susceptibility to inflammatory bowel diseases and colorectal cancer: a meta-analysis. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(4):432–7. doi: 10.1038/ejhg.2010.159.



38. Lahat N, Shapiro S, Karban A, Gerstein R, Kinar-ty A, Lerner A. Cytokine profile in coeliac disease. *Scand J Immunol.* 1999;49(4):441–6. doi: 10.1046/j.1365-3083.1999.00523.x.
39. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res.* 1985;13(17):6361–73. doi: 10.1093/nar/13.17.6361.
40. Suh JH, Gong EY, Hong CY, Park E, Ahn RS, Park KS, Lee K. Reduced testicular steroidogenesis in tumor necrosis factor-alpha knockout mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;112(1–3):117–21. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.09.003.
41. Масленникова СО, Концевая ГВ, Золотых МА, Анисимова МВ, Феофанова НА, Мошкин МП, Недоспасов СА, Герлинская ЛА. Репродуктивные эффекты нокаута гена фактора некроза опухолей (TNF) у мышей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):404–9. doi: 10.18699/VJ15.052.
42. Eisermann J, Register KB, Strickler RC, Collins JL. The effect of tumor necrosis factor on human sperm motility in vitro. *J Androl.* 1989;10(4):270–4. doi: 10.1002/j.1939-4640.1989.tb00100.x.
43. Koçak I, Yenisey C, Dündar M, Okyay P, Sert-er M. Relationship between seminal plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels with semen parameters in fertile and infertile men. *Urol Res.* 2002;30(4):263–7. doi: 10.1007/s00240-002-0269-y.
44. Tronchon V, Vialard F, El Sirkasi M, Dechaud H, Rollet J, Albert M, Bailly M, Roy P, Mauduit C, Fenichel P, Selva J, Benahmed M. Tumor necrosis factor-alpha -308 polymorphism in infertile men with altered sperm production or motility. *Hum Reprod.* 2008;23(12):2858–66. doi: 10.1093/humrep/den277.
45. Khademi Bami M, Dehghan Tezerjani M, Montazeri F, Ashrafzadeh Mehrjardi HR, Ghase-mi-Esmailabad S, Sheikhha MH, Kalantar SM. Tumor Necrosis Factor Alpha -308 G/A Single Nucleotide Polymorphism and Risk of Sperm Abnormalities in Iranian Males. *Int J Fertil Steril.* 2017;11(2):112–6. doi: 10.22074/ijfs.2017.4830.
46. Mauduit C, Besset V, Caussanel V, Benahmed M. Tumor necrosis factor alpha receptor p55 is under hormonal (follicle-stimulating hormone) control in testicular Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;224(3):631–7. doi: 10.1006/bbrc.1996.1077.
47. Liu RX, Wang Y, Wen LH. Relationship between cytokine gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(6):9786–92.
48. Lee BE, Jeon YJ, Shin JE, Kim JH, Choi DH, Jung YW, Shim SH, Lee WS, Kim NK. Tumor necrosis factor-α gene polymorphisms in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *Reprod Sci.* 2013;20(4):408–13. doi: 10.1177/1933719112459237.
49. Li S, Wang L, Xing Z, Huang Y, Miao Z. Expression level of TNF-α in decidual tissue and peripheral blood of patients with recurrent spontaneous abortion. *Cent Eur J Immunol.* 2017;42(2):156–60. doi: 10.5114/cej.2017.69357.
50. Куртанов ХА, Данилова АЛ, Яковлева АЕ, Герасимова ВВ, Саввина АД, Максимова НР. Молекулярно-генетическое исследование генов HLA II класса у больных целиакией в Якутии. Якутский медицинский журнал. 2015;(4):5–7.
51. Penn DJ. The scent of genetic compatibility: sexual selection and the major histocompatibility complex. *Ethology.* 2002;108(1):1–21. doi: 10.1046/j.1439-0310.2002.00768.x.
52. Wedekind C, Furi S. Body odour preferences in men and women: do they aim for specific MHC combinations or simply heterozygosity? *Proc Biol Sci.* 1997;264(1387):1471–9. doi: 10.1098/rspb.1997.0204.
53. Болдырева МН, Барцева ОБ, Курило ЛФ, Ткаченко ЭР, Алексеев ЛП, Адамян ЛВ. Связь HLA-DRB1-генотипа с репродуктивными неудачами. Проблемы репродукции. 2010;(6):59–63.
54. Carp HJ, Selmi C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J Autoimmun.* 2012;38(2–3):J266–74. doi: 10.1016/j.jaut.2011.11.016.
1. Paskar SS, Boyarsky KY. The epidemiological aspects of infertile marriage (a review). *Russian Journal of Human Reproduction.* 2017;23(5):23–6. Russian. doi: 10.17116/repro201723523-26.
2. Health care in Russia. 2017. Statistical compendium. Moscow: Rosstat; 2017. 170 p. Russian.
3. El Hachem H, Crepau V, May-Panloup P, Descamps P, Legendre G, Bouet PE. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. *Int J Womens Health.* 2017;9:331–45. doi: 10.2147/IJWH.S100817.
4. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2012;98(5):1103–11. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.048.
5. Gupta B, Singh P. The evolving role of genetics in recurrent pregnancy loss. In: Mehta S, Gupta B, editors. *Recurrent pregnancy loss.* Singapore: Springer; 2018. p. 67–77.
6. Robberecht C, Pexsters A, Deprest J, Fryns JP, D'Hooghe T, Vermeesch JR. Cytogenetic and morphological analysis of early products of conception following hystero-embryoscopy from couples with recurrent pregnancy loss. *Prenat Diagn.* 2012;32(10):933–42. doi: 10.1002/pd.3936.
7. Tur-Torres MH, Garrido-Gimenez C, Alijotas-Reig J. Genetics of recurrent miscarriage and fetal loss. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017;42:11–25. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.03.007.
8. Baranov VS, editor. Genetic pass as a background of personalized and predictive medicine. Saint Petersburg: N-L; 2009. 528 p. Russian.
9. Perez N, Ostojić S, Kapović M, Peterlin B. Systematic review and meta-analysis of genetic association studies in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril.* 2017;107(1):150–9.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.10.007.
10. Shi X, Xie X, Jia Y, Li S. Maternal genetic polymorphisms and unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Clin Genet.* 2017;91(2):265–84. doi: 10.1111/cge.12910.
11. Tersigni C, D'Ippolito S, Di Nicuolo F, Marana R, Valenza V, Masciullo V, Scaldaferrì F, Malatascia F, de Waure C, Gasbarrini A, Scambia G, Di Simone N. Recurrent pregnancy loss is associated to leaky gut: a novel pathogenic model of endometrium inflammation? *J Transl Med.* 2018;16(1):102. doi: 10.1186/s12967-018-1482-y.
12. D'Ippolito S, Gasbarrini A, Castellani R, Rocchetti S, Sisti LG, Scambia G, Di Simone N. Human leukocyte antigen (HLA) DQ2/DQ8 prevalence in recurrent pregnancy loss women. *Autoimmun Rev.* 2016;15(7):638–43. doi: 10.1016/j.autrev.2016.02.009.
13. Saccone G, Berghella V, Sarno L, Maruotti GM, Cetin I, Greco L, Khashan AS, McCarthy F, Martinelli D, Fortunato F, Martinelli P. Celiac disease and obstetric complications: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;214(2):225–34. doi: 10.1016/j.ajog.2015.09.080.
14. Lazebnik LB, Tkachenko Yel, Oreshko LS, Sitkin SI, Karpov AA, Nemtsov VI, Osipenko MF, Radchenko VG, Fedorov ED, Medvedeva OI, Seliverstov PV, Solov'yeva YeA, Shabanova AA, Zhuravleva MS. Guidelines for diagnosis and treatment of celiac disease. *Experimental and Clinical Gastroenterology Journal.* 2015;(5):3–12. Russian.
15. Admou B, Essaadouni L, Krati K, Zaher K, Sbihi M, Chabaa L, Belaabidia B, Alaoui-Yazidi A. Atypical celiac disease: from recogniz-



- ing to managing. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:637187. doi: 10.1155/2012/637187.
16. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology*. 1993;105(3):910–22. doi: 10.1016/0016-5085(93)90912-V.
 17. Polvi A, Arranz E, Fernandez-Arquero M, Collin P, Mäki M, Sanz A, Calvo C, Maluenda C, Westman P, de la Concha EG, Partanen J. HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol*. 1998;59(3):169–75. doi: 10.1016/S0198-8859(98)00008-1.
 18. Barisani D, Ceroni S, Meneveri R, Cesana BM, Bardella MT. IL-10 polymorphisms are associated with early-onset celiac disease and severe mucosal damage in patients of Caucasian origin. *Genet Med*. 2006;8(3):169–74. doi: 10.109701.gim.0000204464.87540.39.
 19. de la Concha EG, Fernández-Arquero M, Vigil P, Rubio A, Maluenda C, Polanco I, Fernandez C, Figueredo MA. Celiac disease and TNF promoter polymorphisms. *Hum Immunol*. 2000;61(5):513–7. doi: 10.1016/S0198-8859(99)00187-1.
 20. Garrote JA, Arranz E, Tellería JJ, Castro J, Calvo C, Blanco-Quirós A. TNF alpha and LT alpha gene polymorphisms as additional markers of celiac disease susceptibility in a DQ2-positive population. *Immunogenetics*. 2002;54(8):551–5. doi: 10.1007/s00251-002-0498-9.
 21. Bondar C, Araya RE, Guzman L, Rua EC, Chopita N, Chirido FG. Role of CXCR3/CXCL10 axis in immune cell recruitment into the small intestine in celiac disease. *PLoS One*. 2014;9(2):e89068. doi: 10.1371/journal.pone.0089068.
 22. Bragde H, Jansson U, Fredrikson M, Grodzinsky E, Söderman J. Celiac disease biomarkers identified by transcriptome analysis of small intestinal biopsies. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(23):4385–401. doi: 10.1007/s00018-018-2898-5.
 23. Tersigni C, Castellani R, de Waure C, Fattorosi A, De Spirito M, Gasbarrini A, Scambia G, Di Simone N. Celiac disease and reproductive disorders: meta-analysis of epidemiologic associations and potential pathogenic mechanisms. *Hum Reprod Update*. 2014;20(4):582–93. doi: 10.1093/humupd/dmu007.
 24. Khashan AS, Henriksen TB, Mortensen PB, McNamee R, McCarthy FP, Pedersen MG, Kenny LC. The impact of maternal celiac disease on birthweight and preterm birth: a Danish population-based cohort study. *Hum Reprod*. 2010;25(2):528–34. doi: 10.1093/humrep/dep409.
 25. Farthing MJ, Rees LH, Edwards CR, Dawson AM. Male gonadal function in coeliac disease: 2. Sex hormones. *Gut*. 1983;24(2):127–35. doi: 10.1136/gut.24.2.127.
 26. Farthing MJ, Rees LH, Dawson AM. Male gonadal function in coeliac disease: III. Pituitary regulation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1983;19(6):661–71. doi: 10.1111/j.1365-2265.1983.tb00043.x.
 27. Ebisch IM, Pierik FH, DE Jong FH, Thomas CM, Steegers-Theunissen RP. Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in men? *Int J Androl*. 2006;29(2):339–45. doi: 10.1111/j.1365-2605.2005.00598.x.
 28. Wallock LM, Tamura T, Mayr CA, Johnston KE, Ames BN, Jacob RA. Low seminal plasma folate concentrations are associated with low sperm density and count in male smokers and non-smokers. *Fertil Steril*. 2001;75(2):252–9. doi: 10.1016/S0015-0282(00)01697-6.
 29. Ebisch IM, Thomas CM, Peters WH, Braat DD, Steegers-Theunissen RP. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update*. 2007;13(2):163–74. doi: 10.1093/humupd/dml054.
 30. Zugna D, Richiardi L, Akre O, Stephansson O, Ludvigsson JF. A nationwide population-based study to determine whether coeliac disease is associated with infertility. *Gut*. 2010;59(11):1471–5. doi: 10.1136/gut.2010.219030.
 31. Ciacci C, De Rosa A, de Michele G, Savino G, Squillante A, Iovino P, Sabbatini F, Mazzacca G. Sexual behaviour in untreated and treated coeliac patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1998;10(8):649–51.
 32. Kotze LM. Gynecologic and obstetric findings related to nutritional status and adherence to a gluten-free diet in Brazilian patients with celiac disease. *J Clin Gastroenterol*. 2004;38(7):567–74. doi: 10.1097/01.mcg.0000131720.90598.6a.
 33. Bragina EY, Freidin MB, Babushkina NP, Garaeva AF, Kolokolova OV, Zhalsanova IZ, Puzyrev VP. Analysis of cytokine network's genes in the development of "inverse" comorbidity between asthma and tuberculosis. *Medical Genetics*. 2017;16(1):20–4. Russian.
 34. Samgina TA, Bushueva OYu, Ivanov KP, Solodilova MA, Nazarenko PM, Polonikov AV. The association study of the promoter polymorphism -308G>A of tumor necrosis factor gene with the development and severity of acute pancreatitis in Russian population of Kursk region. *Experimental and Clinical Gastroenterology Journal*. 2014;(9):17–20. Russian.
 35. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10(3):564–7. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
 36. Khan S, Mandal RK, Jawed A, Dar SA, Wahid M, Panda AK, Areeshi MY, Ahmed Khan ME, Haque S. TNF- α -308 G>A (rs1800629) polymorphism is associated with celiac disease: A meta-analysis of 11 case-control studies. *Sci Rep*. 2016;6:32677. doi: 10.1038/srep32677.
 37. Fan W, Maoqing W, Wangyang C, Fulan H, Dandan L, Jiaojiao R, Xinshu D, Binbin C, Yashuang Z. Relationship between the polymorphism of tumor necrosis factor- α -308 G>A and susceptibility to inflammatory bowel diseases and colorectal cancer: a meta-analysis. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(4):432–7. doi: 10.1038/ejhg.2010.159.
 38. Lahat N, Shapiro S, Karban A, Gerstein R, Kinaraty A, Lerner A. Cytokine profile in coeliac disease. *Scand J Immunol*. 1999;49(4):441–6. doi: 10.1046/j.1365-3083.1999.00523.x.
 39. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res*. 1985;13(17):6361–73. doi: 10.1093/nar/13.17.6361.
 40. Suh JH, Gong EY, Hong CY, Park E, Ahn RS, Park KS, Lee K. Reduced testicular steroidogenesis in tumor necrosis factor-alpha knockout mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;112(1–3):117–21. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.09.003.
 41. Maslennikova SO, Kontsevaya GV, Zolotykh MA, Anisimova MV, Feofanova NA, Moshkin MP, Nedospasov SA, Gerlinskaya LA. Reproductive effects of the tumor necrosis factor (TNF) deficiency in mice. *Vavilov Journal of genetics and breeding*. 2015;19(4):404–9. Russian. doi: 10.18699/VJ15.052.
 42. Eisermann J, Register KB, Strickler RC, Collins JL. The effect of tumor necrosis factor on human sperm motility in vitro. *J Androl*. 1989;10(4):270–4. doi: 10.1002/j.1939-4640.1989.tb00100.x.
 43. Koçak I, Yenisey C, Dündar M, Okay P, Sertmer M. Relationship between seminal plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels with semen parameters in fertile and infertile men. *Urol Res*. 2002;30(4):263–7. doi: 10.1007/s00240-002-0269-y.
 44. Tronchon V, Vialard F, El Sirkasi M, Dechaud H, Rollet J, Albert M, Bailly M, Roy P, Mauduit C, Fenichel P, Selva J, Benahmed M. Tumor necrosis factor-alpha -308 polymorphism in infertile men with altered sperm production or motility. *Hum Reprod*. 2008;23(12):2858–66. doi: 10.1093/humrep/den277.
 45. Khademi Bami M, Dehghan Tezerjani M, Montazeri F, Ashrafzadeh Mehrjardi HR, Ghaseemi-Esmailabad S, Sheikhha MH, Kalantar SM. Tumor Necrosis Factor Alpha -308 G/A Single Nucleotide Polymorphism and Risk of Sperm Abnormalities in Iranian Males. *Int J Fertil Steril*. 2017;11(2):112–6. doi: 10.22074/ijfs.2017.4830.
 46. Mauduit C, Besset V, Caussanel V, Benahmed M. Tumor necrosis factor alpha receptor p55 is under hormonal (follicle-stimulating hormone) control in testicular Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;224(3):631–7. doi: 10.1006/bbrc.1996.1077.
 47. Liu RX, Wang Y, Wen LH. Relationship between cytokine gene polymorphisms and recurrent



- spontaneous abortion. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(6):9786–92.
48. Lee BE, Jeon YJ, Shin JE, Kim JH, Choi DH, Jung YW, Shim SH, Lee WS, Kim NK. Tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *Reprod Sci*. 2013;20(4):408–13. doi: 10.1177/1933719112459237.
49. Li S, Wang L, Xing Z, Huang Y, Miao Z. Expression level of TNF- α in decidual tissue and peripheral blood of patients with recurrent spontaneous abortion. *Cent Eur J Immunol*. 2017;42(2):156–60. doi: 10.5114/ceji.2017.69357.

50. Kurtanov HA, Danilova AL, Yakovleva AE, Gerasimova VV, Savvina AD, Maksimova NR. Molecular and genetic testing of HLA II class genes in celiac disease patients in Yakutia. *Yakut Medical Journal*. 2015;(4):5–7. Russian.
51. Penn DJ. The scent of genetic compatibility: sexual selection and the major histocompatibility complex. *Ethology*. 2002;108(1):1–21. doi: 10.1046/j.1439-0310.2002.00768.x.
52. Wedekind C, Furi S. Body odour preferences in men and women: do they aim for specific MHC combinations or simply heterozygosity? *Proc Biol Sci*. 1997;264(1387):1471–9. doi: 10.1098/rspb.1997.0204.

53. Boldyreva MN, Bartseva OB, Kurilo LF, Tkachenko ÉR, Alekseev LP, Adamian LV. Association between reproductive failures and HLA-DRB1-genotype. *Russian Journal of Human Reproduction*. 2010;(6):59–63. Russian.
54. Carp HJ, Selmi C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J Autoimmun*. 2012;38(2–3):J266–74. doi: 10.1016/j.jaut.2011.11.016.

Association of celiac disease genetic markers with reproduction disorders

L.I. Minaycheva¹ • E.Yu. Bragina¹ • I.Zh. Zhalsanova¹ •
N.A. Chesnokova¹ • A.V. Marusin¹

Background: Numerous studies have shown a link between genes involved in the immune response and infertility and miscarriage. The most significant associations have been established for the cytokine genes (*IL1B*, *IL6*, *IL10*, *IL18*), chemokine genes (*CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*), and genes of the major histocompatibility complex HLA II class (*DQA1*, *DQB1*, *DRB1*). HLA genes are associated with celiac disease, a genetically determined autoimmune disorder, where male and female reproduction impairment is one of the symptoms. **Aim:** To assess the prevalence of polymorphic variants of the immune response genes (HLA: *DQA1*, *DQB1*, *DRB1*; *TNF*, *IL10*, *CXCL10*) in patients with reproduction disorders. **Materials and methods:** This pilot study involved assessment of the following gene polymorphisms: *IL10* (rs1800872), *TNF* (rs1800629), *CXCL10* (rs4386624), and HLA class II (*DQA1*, *DQB1*, *DRB1*) in couples (n=220) with reproduction disorders (infertility and miscarriage). Genotyping was performed by real-time polymerase chain reaction (PCR) and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) methods. The genotypes and alleles population data were used for comparison with the studied variants of the genes *IL10* (rs1800872), *TNF* (rs1800629), and *CXCL10* (rs4386624). Differences in the prevalence of alleles and genotypes were assessed by

χ^2 test. The differences were considered significant at $p < 0.05$. Haplotype diversity was calculated by the Arlequin software, version 3.5.x. **Results:** Compared to the populational data, there was significant re-distribution of the genotypes and alleles to the *TNF* gene (rs1800629) variant in men with impaired reproductive functions. No differences were found for other gene variants studied. The frequency of HLA class II gene (*DQA1*, *DQB1*, *DRB1*) haplotypes associated with celiac disease (DQ2 and DQ8) in the study sample was 23.8%. **Conclusion:** The results indicate the important role of genes associated with celiac disease in the development of reproduction disorders.

Key words: reproduction function, miscarriage, infertility, celiac disease, immune response genes, polymorphism

For citation: Minaycheva LI, Bragina EYu, Zhalsanova IZh, Chesnokova NA, Marusin AV. Association of celiac disease genetic markers with reproduction disorders. *Almanac of Clinical Medicine*. 2019;47(1):72–82. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-006.

Received 04 November 2018; accepted 31 January 2019; published 15 February 2019

Larisa I. Minaycheva – MD, PhD, Geneticist¹

✉ 3 Moskovskiy trakt ul., Tomsk, 634040, Russian Federation. Tel.: +7 (913) 864 61 71.
E-mail: larisa.minaycheva@medgenetics.ru

Elena. Yu. Bragina – PhD (in Biol.), Senior Research Fellow, Population Genetics Laboratory¹

Irina Zh. Zhalsanova – Postgraduate Student, Population Genetics Laboratory¹

Natalia A. Chesnokova – Resident¹

Andrey V. Marusin – PhD (in Biol.), Research Fellow, Evolutionary Genetics Laboratory¹

Funding

The study was done under the State project by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 075-00603-19-00 (Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences).

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; 10 Naberezhnaya reki Ushayki ul., Tomsk, 634050, Russian Federation



Клиническое наблюдение

Трудности дифференциальной диагностики подтипов пограничного типа буллезного эпидермолиза: описание двух клинических наблюдений

Коталевская Ю.Ю.¹ • Марычева Н.М.²

Коталевская Юлия Юрьевна – канд. мед. наук, врач-генетик, заведующая консультативным отделением медико-генетического центра¹

✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2–8, Российская Федерация.
Тел.: +7 (915) 167 35 83.
E-mail: kotalevskaya@mail.ru

Марычева Наталья Михайловна – врач-дерматовенеролог²

Обоснование. Буллезный эпидермолиз (БЭ) – редко встречающееся наследственное заболевание кожи. Выделяют простой тип, пограничный (ПоБЭ), дистрофический и синдром Киндлера. ПоБЭ встречается с частотой 2 случая на 1 млн населения. В литературе мало описаний клинических наблюдений ПоБЭ. Вместе с тем клиническая диагностика как самого типа ПоБЭ, так и его подтипов – сложная задача, особенно в раннем возрасте. В статье приводится **описание 2 клинических случаев ПоБЭ** у пациентов восточнославянского происхождения. *Клиническое наблюдение 1.* Девочка, этнически украинка, с установленным окончательным диагнозом «ПоБЭ, тяжелый генерализованный подтип». При молекулярно-генетическом исследовании выявлены ранее не описанные в литературе мутации в гене *LAMA3*. Умерла в возрасте 24 месяцев от острой дыхательной недостаточности. В течение жизни ребенку не могли идентифицировать тип и подтип БЭ, так как имелось сочетание клинических проявлений, патогномоничных для разных подтипов ПоБЭ. Несмотря на наличие таких признаков, как осипший голос, стенозы, образование грануляционной ткани типичной локализации, образование грануляций в гортани, девочка имела стабильную прибавку в весе, отмечались периоды относительной стабилизации кожного процесса в течение заболевания, пациентка была старше средней продолжительности жизни, обычной для пациентов с тяжелым генерализованным подтипом ПоБЭ, – все это вызывало затруднения в определении точного диагноза. *Клиническое наблюдение 2.* Мальчик, этнически русский, диагноз «ПоБЭ, неклассифицированный подтип». При молекулярно-генетическом исследовании выявлена ранее не описанная в литературе гомозиготная мутация в гене *LAMA3*, достоверно определить подтип не представляется возможным. Пациент

имеет смешанную клиническую картину, схожую как с тяжелым генерализованным подтипом ПоБЭ, так и с ларинго-онихо-кутаным (ЛОК) синдромом. В течение жизни пациенту были установлены клинические диагнозы акродерматита Аллопо и ЛОК синдрома. Трудности в дифференциальном диагнозе основаны на присутствии в клинической картине признаков, не типичных для каждого из подтипов. Для тяжелого генерализованного подтипа ПоБЭ нехарактерна значительная продолжительность жизни пробанда (на момент публикации статьи возраст пациента – 13 лет), а для ЛОК синдрома нехарактерно отсутствие вовлечения в патологический процесс органа зрения, а также тяжелый патологический процесс в гортани в подростковом возрасте. **Заключение.** Детальные описания фенотипических признаков подтипов БЭ, включая данные о редких и минимально выраженных клинических проявлениях, могут быть полезны для изучения клинической картины и естественного течения заболевания, в том числе с целью дифференциальной диагностики.

Ключевые слова: пограничный буллезный эпидермолиз, пограничный буллезный эпидермолиз тяжелый генерализованный, буллезный эпидермолиз, ларинго-онихо-кутанный синдром, ген *LAMA3*

Для цитирования: Коталевская ЮЮ, Марычева НМ. Трудности дифференциальной диагностики подтипов пограничного типа буллезного эпидермолиза: описание двух клинических наблюдений. Альманах клинической медицины. 2019;47(1):83–93. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-009.

Получена 07.02.2019; принята к публикации 18.02.2019; опубликована 22.02.2019

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

² ГБУЗ «Московский научно-практический Центр дерматологии и косметологии Департамента здравоохранения города Москвы»; 119071, г. Москва, Ленинский проспект, 17, Российская Федерация



Пограничный буллезный эпидермоллиз (ПоБЭ) (OMIM #226650) – наследственное заболевание кожи из группы буллезных дерматозов с аутосомно-рецессивным типом наследования. Пограничный БЭ наряду с простым, дистрофическим БЭ и синдромом Киндлера относится к основным типам БЭ [1]. Каждый тип БЭ имеет разное количество подтипов (всего их описано около 30), которые различаются клиническими проявлениями и, как правило, имеют характерные специфические симптомы [2].

БЭ входит в группу редких генодерматозов. Его распространенность варьирует в зависимости от популяции. В США этот показатель составляет 8,22 на 1 млн населения [3]. В Европе он колеблется от 3,8 до 49 на 1 млн населения в Дании и Шотландии соответственно [4, 5].

Частота встречаемости БЭ в России достоверно не известна. В единственном опубликованном исследовании А.А. Кубанова и соавт. (2015) [6] распространенность этого заболевания в 70 из 85 субъектов Российской Федерации в среднем равна 3,64 на 1 млн населения, разброс – от 0 до 19,73 на 1 млн населения. У большинства больных подтип БЭ не указан.

По данным разных регистров, распространенность ПоБЭ всех подтипов составляет 2 человека на 1 млн населения [7], а тяжелого генерализованного подтипа ПоБЭ (ранее – подтип Херлитца) оценивается в 0,4 на 1 млн населения. Но, как полагают, эта цифра не отражает реальной ситуации, поскольку в данной группе пациентов отмечается высокий уровень смертности в неонатальный период, следовательно, значительное количество случаев не удается зафиксировать [8].

Согласно классификации БЭ, принятой международным консенсусом экспертов в 2008 г. и дополненной в 2014 г. [1, 2], есть 2 главных подтипа ПоБЭ – генерализованный и локализованный, подразделяющиеся, в свою очередь, на клинические варианты. В рамках генерализованного ПоБЭ различают тяжелый (ранее – подтип Херлитца), средней тяжести (ранее – подтип не-Херлитца), ПоБЭ с атрезией привратника, ПоБЭ с поздним началом, ПоБЭ с поражением органов дыхания и почек; в составе локализованного подтипа выделяют собственно локализованный ПоБЭ, инверсный и ларинго-онихо-кутанный синдром (ЛОК синдром) [1, 2].

Основными клиническими проявлениями ПоБЭ считаются образование пузырей и эрозий, возникающих спонтанно или после незначительной травмы, поражение слизистых оболочек,

а также образование грануляционной ткани, которая чаще локализуется на коже в области рта, носа, вокруг пальцев рук и ног и в верхних дыхательных путях. Подтипы ПоБЭ имеют патогномоничные признаки, например, при тяжелом генерализованном подтипе пузыри и эрозии возникают сразу при рождении или в неонатальный период, быстро образуется грануляционная ткань в типичных местах, характерна высокая летальность [2, 9].

Все подтипы ПоБЭ наследуются по аутосомно-рецессивному типу. При ПоБЭ описаны мутации в генах ламинина-332, коллагена 17-го типа, интегринов альфа-3, альфа-6, бета-4; в основном это нонсенс-мутации, делеции, мутации сайта сплайсинга [2, 10, 11].

Дифференциальная диагностика подтипов ПоБЭ осуществляется в том числе на основе результатов молекулярно-генетических исследований. Так, при тяжелом генерализованном подтипе в 70% случаев мутации встречаются в гене *LAMB3*, при среднетяжелом генерализованном и других подтипах – в генах *LAMA3*, *LAMC2*, *COL17A1*, *ITGB4*, *ITGA3*, *ITGA6* с разной частотой (например, мутации в гене *ITGB4* чаще ассоциированы с фенотипом ПоБЭ с атрезией привратника) [12].

ЛОК синдром (OMIM #245660; ранее – синдром Шаббира) – самостоятельный подтип ПоБЭ, сходный по клинической картине с тяжелым генерализованным подтипом ПоБЭ [13]. Впервые был описан в 1986 г. G. Shabbir и соавт. [14] как серия клинических наблюдений 22 пациентов из 12 пакистанских семей. Характерная особенность заболевания – аномальное разрастание грануляционной ткани на голове и шее, в области верхних дыхательных путей, гортани, конъюнктивы, на околоногтевых участках, локтях, коленях. У всех пациентов имеются внекожные проявления: как частый симптом отмечают слабый хриплый крик у новорожденных, позже происходит прогрессирующее разрастание грануляционной ткани в гортани, которое может приводить к внезапной обструкции, требующей трахеостомии. Следствием поражения слизистой оболочки глаз может быть формирование симблефарона, полное закрытие глазной щели и слепота. У всех пациентов наблюдается гипоплазия эмали зубов [14]. По данным литературы, отмечается высокая распространенность заболевания в провинции Пенджаб (Пакистан), а также в Индии; тем не менее общее число известных случаев не превышает 50, в основном от близкородственных браков [15]. В других географических регионах – Европе и Австралии – описаны случаи ЛОК синдрома у пациентов – выходцев с Ближнего Востока и из Индии [16, 17].



В настоящем сообщении представлены два клинических наблюдения ПоБЭ пациентов восточнославянского происхождения. Схожесть фенотипических проявлений и неоднозначность результатов молекулярно-генетического исследования вызвали трудности дифференциальной диагностики в определении подтипа ПоБЭ и установлении окончательного диагноза.

Клиническое наблюдение 1

Нами проконсультирована семья, которая обратилась в медико-генетический центр ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского за прогнозом потомства и с целью определения возможности проведения пренатальной диагностики. В анамнезе у семьи было рождение ребенка с наследственным заболеванием «буллезный эпидермолиз, пограничный тип».

Приводим описание данного случая, основываясь на медицинской документации, предоставленной родителями.

Пробанд 1, девочка, 2012 года рождения, умерла в 2014 г. в возрасте 24 месяцев, этнически украинка. Брак некровнородственный, родители, бабушки и дедушки родились в различных областях Украины, наследственность не отягощена.

Ребенок от 2-й беременности (1-я беременность – замершая в сроке 11–12 недель), протекала на фоне угрозы преждевременных родов в сроке 34–35 недель. Роды 1-е, в сроке 39–40 недель, вес при рождении – 3060 г, длина – 50 см. Диагноз при рождении: буллезный эпидермолиз, неуточненный тип.

Состояние кожных покровов при рождении: кожа на теле чистая, имелись эрозии на больших пальцах обеих рук, эрозии в области ногтевых пластин, ногтевые пластины на руках отсутствовали. На вторые сутки после рождения в результате механического воздействия на ягодицах появились пузыри диаметром до 3 см, наполненные прозрачной жидкостью, затем эрозии. Новые пузыри появились на 5–7-й день жизни на локтях, под коленями, в местах трения от подгузника. Эрозии имелись также на слизистой оболочке рта.

С 2 месяцев появился хриплый голос и «беззвучный» плач, в течение жизни голос никогда не был звонким.

Динамика кожного процесса: в течение жизни постоянно образовывались пузыри на коже лица, головы, тела, конечностях. Возникновение пузырей часто было связано с механическим воздействием. В течение первых 3 месяцев жизни пузыри появлялись, в том числе в области носогубного треугольника, но эпителизировались в среднем в течение 1,5 месяцев. Эрозии в области ногтевых пластин имелись постоянно. Ногти на ногах отслоились на 3-м месяце жизни, ногтевое ложе заместились кожей, однако имелась постоянная травматизация пальцев при ходьбе с образованием эрозий. До 1 года отмечалось

Рис. 1. Эрозии и участки грануляционной ткани в ногтевых ложах на руке. Отсутствие ногтевых пластин. Утолщение концевых фаланг пальцев (клиническое наблюдение 1, девочка, 3 месяца)



регулярное появление эрозий в области носа, что в итоге привело к сужению носовых ходов (рис. 1).

В возрасте 9 месяцев впервые возник стеноз гортани, далее тяжелые стенозы развивались с частотой примерно 1 раз в месяц. С 9 месяцев отмечалось затрудненное дыхание, которое усугублялось в холодное время года. В лечении применяли кортикостероиды.

В 1 год и 2 месяца проведена ларинго- и трахеоскопия, удалено полиповидное образование одной из голосовых связок. Через 2 недели после вмешательства жалобы возобновились, повторно проведена ларинго- и трахеоскопия, отмечено отслоение слизистой оболочки в месте другой голосовой связки.

В 1 год 4 месяца развилось септическое состояние, пациентка была госпитализирована в отделение реанимации, получала интенсивную медикаментозную терапию. В этот период появились обширные эрозии около носа и рта с образованием грануляционной ткани, в носовых ходах обильное образование слизи, стридорозное дыхание. Эрозии в области носа и рта постепенно имели склонность к эпителизации, в носовых ходах разрасталась грануляционная ткань, носовые ходы критично сужались. Кроме того, наблюдалось поражение слизистой оболочки глаз в виде образования грануляционной ткани на верхнем веке (рис. 2).

Весь первый год жизни отмечалась задержка в прибавке веса, после септического состояния в 1 год и 4 месяца масса тела была 7,5 кг. Вес ребенка к двум годам составлял 8,2 кг (ниже 3-го перцентиля).

В 24 месяца пациентка скончалась. Причина смерти – острая обструкция дыхательных путей. Предположительный клинический диагноз: БЭ, пограничный тип, тяжелый генерализованный подтип (ранее – подтип Херлитца).

В течение жизни пациентка наблюдалась по месту жительства у дерматолога с диагнозом «БЭ, неуточненный тип». Ребенок был неоднократно консультирован по фото- и медицинской документации несколькими европейскими экспертами в области БЭ,



Рис. 2. Обширные эпителизирующиеся эрозии в области лица: на носогубном треугольнике, кончике носа, в щечной области, на губах, в углах рта, на подбородке. Узкие наружные носовые ходы (клиническое наблюдение 1, девочка, 1 год 4 месяца)



Рис. 3. Участок грануляционной ткани в области носогубного треугольника в форме «бабочки». Эрозия на локте и обрывки эпителия (клиническое наблюдение 2, мальчик, 6 лет)

предположительный диагноз: ПоБЭ, без уточнения подтипа.

В Австрийском центре буллезного эпидермолиза (EB House Austria, Зальцбург) ребенку были проведены следующие диагностические мероприятия для уточнения типа БЭ:

- биопсия кожи с иммуногистохимическим картированием: выявлено отсутствие белка ламинина-332 в области пузырей и значительное его уменьшение в участках видимо здоровой кожи. Полученный результат соотносится с пограничным типом БЭ;
- молекулярно-генетическое исследование: методом прямого секвенирования по Сэнгеру проведено исследование кодирующих областей генов и экзон/интрон-областей генов *LAMB3*, *LAMA3*. У пациентки обнаружены 2 новые ранее не описанные мутации в гене *LAMA3* в компаунд-гетерозиготном состоянии. Первая мутация с.222delG (p.C75VfsX64) – во 2-м экзоне в гетерозиготном состоянии, вторая мутация с.4346-4347insG (p.S1450KfsX6) – в 32-м экзоне в гетерозиготном состоянии, обе мутации приводят к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона. Результат молекулярно-генетического исследования подтверждает диагноз ПоБЭ, тяжелого генерализованного подтипа. У родителей обнаружены данные мутации в гетерозиготном состоянии.

Таким образом, ребенку установлен окончательный диагноз: буллезный эпидермолиз, пограничный тип, тяжелый генерализованный подтип.

В ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского родителям проведено медико-генетическое консультирование. По результатам генетического исследования ребенка и самих родителей определен риск повторного рождения больного ребенка в семье в 25%, а также обсуждены вопросы по дальнейшим возможностям пренатальной диагностики.

Клиническое наблюдение 2

Пробанд 2, мальчик, 2006 года рождения, этнически русский. Впервые был осмотрен и проконсультирован нами в возрасте 6 лет. Основные жалобы – наличие эрозий и ран в околоносовой области, в ушных раковинах, в области околоногтевых пластин, локтей, колен и ягодич. Пациент наблюдался дерматологом с диагнозом ЛОК синдрома.

Пробанд от некровнородственного брака, родители этнически русские, сами родители, а также их родители родились в пределах одной области Российской Федерации. Наследственность не отягощена.

Пробанд от 2-й беременности (1-я беременность – внутриутробная гибель плода в сроке 28 недель, со слов матери пробанда, причина не установлена), протекавшей на фоне угрозы прерывания, токсикоза в I триместре, отеков во II триместре. По данным ультразвукового исследования плода в III триместре отмечалось маловодие. Роды 1-е, в сроке 39–40 недель, самопроизвольные. Вес ребенка при рождении – 3670 г, длина – 50 см. Оценка по шкале АПГАР 8/8 баллов. Сразу после рождения при крике отмечался осипший голос. При осмотре ребенка после рождения в ушных раковинах обнаружены эрозии, на указательном пальце правой руки лопнувший пузырь с обрывками эпителия. Установлен диагноз внутриутробной инфекции.

Анамнез заболевания: клинические проявления заболевания далее прогрессировали, на первом месяце жизни появились пузыри, затем эрозии в околоногтевых областях на руках и ногах, с отслоением ногтевых пластин и последующим замещением их грануляционной тканью к 2-месячному возрасту. Наблюдался дерматологом с диагнозом акродерматита Аллопо.

На первом году жизни у пробанда постоянно образовывались эрозии на слизистой оболочке рта, кровавистые корочки в носовых ходах с последующими эрозиями в местах их отделения с мокнутием. Позже появился пузырь около левого, а затем и правого носового хода с образованием эрозий и впоследствии грануляционной ткани. В результате носовые ходы постепенно сужались.

Кроме того, в возрасте до 6 месяцев у пробанда схожие проявления заболевания возникли на локтях, коленях и в ягодичной области. Голос и плач были осипшими.

К 6 месяцам жизни появился выраженный храп во сне, приступы удушья, которые сопровождались стенозом гортани. Ребенок часто доставлялся по скорой



Рис. 4. На руках отмечается отсутствие на всех пальцах ногтевых пластин, которые замещены грануляционной тканью, дистальные фаланги изменены по типу «барабанных палочек» (клиническое наблюдение 2, мальчик, 6 лет)



Рис. 5. На локтях эрозии с участками грануляционной ткани и геморрагическими корками. Милиумы (клиническое наблюдение 2, мальчик, 11 лет)



Рис. 6. Участок грануляционной ткани на лице. Зубы стерты, деформированы, выраженная гипоплазия эмали (клиническое наблюдение 2, мальчик, 11 лет)



Рис. 7. Участки грануляционной ткани на ладонной поверхности с корками (клиническое наблюдение 2, мальчик, 11 лет)

помощи в стационар с приступами удушья, где получал терапию кортикостероидами. Перенес пневмонию. Был установлен диагноз анемии. С 8 месяцев жизни отмечались нарастающие явления стеноза гортани, и в 1 год 7 месяцев пациент госпитализирован в отделение отоларингологии Российской детской клинической больницы, где ему была установлена трахеостома. Затем наблюдался отоларингологом по месту жительства. До 2 лет перенес 2 пневмонии.

Был проконсультирован в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», где установлен клинический диагноз синдрома Шаббиров (в настоящее время – ЛОК синдром). Там же была проведена ДНК-диагностика (2008): «методом прямого автоматического секвенирования проведено исследование экзона 39 гена *LAMA3*, изменения нуклеотидной последовательности экзона 39 гена *LAMA3*, включая наиболее частую мутацию 151insG, *LAMA3*, не обнаружено. На основании полученных результатов молекулярно-генетического исследования невозможно подтвердить или исключить диагноз». Заключение генетика МГНЦ: «ларинго-онихо-кутанный синдром, диагноз установлен клинически. Технически невозможно провести дополнительное молекулярно-генетическое исследование».

Пациент неоднократно находился на госпитализации в дерматологическом отделении РДКБ, где в 3 года клинически подтвержден диагноз ЛОК синдрома.

В 6 лет госпитализирован для контрольной трахеоскопии и замены трахеоканюли. В ходе госпитализации проведена ларингоскопия: при осмотре вестибулярный отдел деформирован, черпаловидные хрящи и ложные складки отечные, голосовые складки не дифференцируются. Голосовая щель не определяется. В межголосовом отделе визуализируется рубцовая ткань, полностью изолирующая просвет гортани. При нижней трахеоскопии: просвет трахеи несколько сужен, кольца трахеи не дифференцируются, ткани гиперемизированы, отечны. Края трахеостомы инфильтрированы и воспалены.

Состояние кожного процесса: при осмотре обращает на себя внимание участок патологического кожного процесса с образованием грануляционной ткани, по форме напоминающий «бабочку», с четкими границами, ярко-малиновым дном, на поверхности серо-желтоватые наслоения, незначительное количество геморрагических корок, расположенный в области носогубного треугольника с захватом кончика и крыльев носа, верхней губы до красной каймы, с переходом на щечную область. Поверхность мокнущая. Отмечается сращение наружных носовых ходов. Отмечается наличие грануляционной ткани в области ушных раковин, ярко-малинового цвета, поверхность мокнет. Схожие участки грануляционной ткани имеются на теле в области ягодич, на локтях, на ладонной поверхности кистей, на подошвах. На руках на всех пальцах отмечается



отсутствие ногтевых пластин, которые замещены грануляционной тканью, дистальные фаланги изменены по типу «барабанных палочек». На ногах ониходистрофия, частичное отсутствие ногтей на пальцах стоп. Единичные милиумы на теле. Кожа на остальных участках лица и тела не изменена. Волосы в патологический процесс не вовлечены. Зубы – множественный кариес (рис. 3, 4).

В 11 лет и 3 месяца по месту жительства удален полип наружного слухового прохода справа. При контрольном обследовании в отделении отоларингологии РДКБ в 11 лет 5 месяцев проведена замена трахеотомической трубки, ларингоскопия, трахеоскопия: голосовая щель не определяется из-за рубцовой мембраны, надгортанник рубцово изменен, подпаян к передней комиссуре. Кольца трахеи не дифференцируются из-за выраженного отека и инфильтрации слизистой трахеи. Определяются фиброзные наложения и рост множественных грануляций на стенках в средней и нижней трети трахеи. Проведена баллонная дилатация просвета трахеотомического канала и трахеи.

Повторно ребенок нами осмотрен в возрасте 11 лет 5 месяцев, со стороны кожного процесса наблюдалась отрицательная динамика в виде увеличения площади участка с разрастанием грануляционной ткани на лице слева с захватом периорбитальной области и переходом на подбородок. На теле увеличилось количество очагов грануляций в ягодичной области, возросла площадь очагов на ладонях, стопах, на локтях. На коленях – участки атрофической рубцовой ткани, милиумы. Ногти на руках и ногах отсутствовали. По сравнению с предыдущим осмотром обращало на себя внимание замещение очагов грануляционной ткани в области ногтевых пластин на руках неповрежденной кожей. В области трахеостомы имелся обширный очаг грануляций. Большинство зубов стерты, остальные деформированы, выраженная гипоплазия эмали (рис. 5–7).

По результатам осмотра рекомендовано провести полноэкзомное секвенирование.

Проведено полноэкзомное секвенирование (МГНЦ, 2017), заключение: «был проведен поиск патогенных вариантов, ассоциированных с ЛОК синдромом, а также с другими наследственными заболеваниями со сходными фенотипическими проявлениями. Выявлен не описанный ранее как патогенный вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 14 гена *LAMA3* (chr18:21484654TCCAGGT/T), приводящий к изменению канонического донорного сайта сплайсинга (c.1785_1788+2delCCAGGT) и сдвигу рамки считывания (p.Leu595fs, NM_000227.3), в гомозиготном или гемизиготном состоянии. По совокупности сведений данный вариант нуклеотидной последовательности следует расценивать как патогенный». Верификация выявленной мутации методом секвенирования по Сэнгеру – в работе.

Таким образом, пробанду молекулярно-генетическими методами подтвержден ПоБЭ, но не уточнен подтип.

Данному пациенту для уточнения подтипа ПоБЭ необходимо провести дополнительные обследования, молекулярно-генетические исследования и более детальный анализ клинической картины в анамнезе.

Обсуждение

БЭ относится к орфанным заболеваниям, и хотя общее число таких пациентов в мире относительно невелико, среди них многие имеют тяжелые прогрессирующие фенотипы, что сопряжено с медицинскими и социальными проблемами. Поиск радикальных методов лечения тяжелых социально значимых заболеваний ведется многими научными группами, в том числе занимающимися БЭ. В результате к настоящему времени есть реальные успехи в области лечения пациентов с БЭ методами генной терапии [18]. Именно поэтому накопление клинических данных, данных молекулярно-генетических исследований и изучение естественного течения заболевания вносят важный вклад в изучение проблемы БЭ в целом. Для повышения эффективности диагностики и определения точного диагноза необходимо детальное описание фенотипических проявлений различных типов и подтипов БЭ, а также проведение генотип-фенотип корреляций.

Описанные нами случаи не только редко встречаются в практике врача-генетика и врача-дерматовенеролога, но и представляют собой сложную клиническую задачу. Низкая популяционная частота БЭ, клиническая гетерогенность заболевания, наличие значительного количества нозологических форм во всей группе БЭ, сложности дифференциальной диагностики, особенно в раннем возрасте, в ряде случаев труднодоступность генетических методов диагностики – все это затрудняет точную постановку диагноза и, как результат, определение прогноза жизни пациента.

ПоБЭ, его тяжелый генерализованный подтип – заболевание с высокой летальностью. Большинство пациентов умирают в возрасте до 1 года вследствие прекращения развития, в частности прибавки в весе, сепсиса, пневмонии или обструкции гортани и трахеи [19]. Отличительными признаками данного подтипа являются спонтанное образование пузырей, эрозий с большим процентом поражения кожи тела, тяжелое поражение слизистой оболочки ротовой полости и верхних дыхательных путей, поражение околоногтевой области. Патогномичным симптомом считается образование обильной грануляционной ткани, симметрично располагающейся



в области носогубного треугольника, а также средней части лица, ногтевых валиков. К частым внешним проявлениям относят плохую прибавку веса, задержку физического развития, образование стриктур и стенозов верхних дыхательных путей. У некоторых пациентов имеется вовлечение в патологический процесс слизистой оболочки глаз. По данным Американского национального регистра БЭ, пузыри или эрозии были отмечены у 48% пациентов с тяжелым генерализованным подтипом ПоБЭ, при этом конъюнктив в патологический процесс вовлечена не была [9, 20].

Образование грануляционной ткани – патогномоничный симптом не только для тяжелого генерализованного подтипа ПоБЭ, но и ЛОК синдрома.

В табл. 1 дана сравнительная характеристика клинических проявлений подтипов ПоБЭ – тяжелого генерализованного подтипа, ЛОК синдрома и описываемых случаев. Из нее видно, что для тяжелого генерализованного подтипа ПоБЭ свойственны более выраженные фенотипические проявления в сравнении с ЛОК синдромом. Описанные нами наблюдения имеют клинические признаки обоих подтипов, в том числе и патогномоничного симптома – образование грануляционной ткани. Особенностью наших случаев является осмотр и фиксация клинических проявлений заболевания в разном возрасте пациентов, что значительно затрудняет достоверное сравнение клинических проявлений и точное определение принадлежности к конкретной нозологии.

Кроме того, важной и неоднозначной клинической характеристикой в случае 2 считаем значительную продолжительность жизни пациента (на февраль 2019 г. пациенту 13 лет), что вносит диагностическую трудность в интерпретацию данного показателя в отношении определения пациента к конкретной нозологии.

По данным литературы, несмотря на высокую смертность в раннем возрасте (в среднем в возрасте 5–6 месяцев) пациентов с тяжелым генерализованным подтипом ПоБЭ, описаны случаи длительного выживания [21]. Так, по данным Датского регистра БЭ, среди 22 пациентов с тяжелым генерализованным подтипом ПоБЭ, рожденных с 1988 по 2011 г., все пациенты умерли в возрасте до 3 лет, из них только 3 пациента прожили 14, 15 и 32 месяца соответственно. Основными причинами смерти были полиорганная недостаточность в результате прекращения прибавки массы тела и остановки развития в целом (41%), дыхательная недостаточность (27%), пневмония (9%) и др. [22].

В табл. 2 приведены данные литературы по продолжительности жизни ряда пациентов с тяжелым генерализованным подтипом ПоБЭ, у которых выявлены различные мутации в гене *LAMA3* [23–28].

При ЛОК синдроме отмечается высокая вероятность смерти от осложнений в раннем возрасте, при этом описаны пациенты с клиническим улучшением на втором десятилетии жизни [29].

Несмотря на наличие международного консенсусного документа [1, 2], говорить о существовании четких и однозначных клинических диагностических критериев для того или иного подтипа ПоБЭ не приходится, поэтому в качестве наиболее достоверного метода диагностики следует рассматривать молекулярно-генетическое исследование.

При тяжелом генерализованном подтипе ПоБЭ описаны мутации только в генах ламинина-332 – *LAMB3*, *LAMA3*, *LAMC2*. Более того, мутации в гене *LAMC2* ассоциированы только с фенотипом ПоБЭ. Так как в 70% случаев при тяжелом генерализованном подтипе ПоБЭ мутации описаны в гене *LAMB3*, именно он является первой линией тестирования при клиническом подозрении на данный подтип. Мутации в генах *LAMA3*, *LAMC2* встречаются у 9% пациентов с ПоБЭ для каждого из этих генов [7].

Генетическая основа ЛОК синдрома была определена в 2003 г. W.H. McLean и соавт. [30]. Они предположили, что кандидатным геном, отвечающим за развитие ЛОК синдрома, выступает ген *LAMA3*. При обследовании 15 пациентов были выявлены 2 патогенных варианта в 39-м экзоне, кодирующем альфа-цепь гена *LAMA3* [30]. В 2008 г. данная нозология была внесена в классификацию БЭ как один из подтипов ПоБЭ [2]. Результаты, полученные в 2003 г., подтверждены последующими публикациями описаний пациентов с ЛОК синдромом, у которых генетическая диагностика выявила мутации в участке гена, кодирующем альфа-цепь *LAMA3* [11].

При этом имеются случаи описания пациентов со смешанными проявлениями как тяжелого генерализованного ПоБЭ, так и ЛОК синдрома, у которых обнаружены сложные гетерозиготные мутации в *LAMA3* и его изоформе *LAMA3A* [11, 30].

Недавно С. Prodinger и соавт. [31] опубликовали клиническое наблюдение пациента с проявлениями ЛОК синдрома, у которого определена мутация в гене плектина (*PLEC*). Мутации в гене плектина описаны при простом типе БЭ, подтипах с мышечной дистрофией и атрезией привратника. Авторы предполагают, что речь идет о ЛОК-подобном заболевании или новом кандидатном

**Таблица 1.** Основные клинические проявления подтипов пограничного буллезного эпидермолиза у обследованных пациентов в сравнении с классификацией буллезного эпидермолиза (2014) [2]

Признак	ПоБЭ тяжелый генерализованный [2]	ПоБЭ локализованный, ЛОК синдром [2]	Пациент 1	Пациент 2
Тип наследования	АР	АР	АР	АР
Возраст начала заболевания	С рождения	С рождения	С рождения	С рождения
Преобладающая локализация кожного процесса	Генерализованный	Особенно лицо и шея	Лицо, ушные раковины, шея, ногтевые пластины, плечи, локти, колени, ягодицы	Лицо, ушные раковины, шея, ногтевые пластины, конечности, ягодицы
Кожные проявления*				
пузыри	4+	2+, эрозии	3+, мелкие	1+ (в настоящее время) 3+ (по данным анамнеза, в раннем возрасте)
милиумы	2+	1+	Нет	1+
атрофические рубцы	3+	2+	Нет	1+
дистрофические или отсутствующие ногти	4+	4+	4+	4+
грануляционная ткань	4+	3+	3+	4+
аномалии кожи головы	2+	Нет	Нет	Нет
кератодермия	Нет	Нет	Нет	Нет
возникновение индуцируемых пузырей	4+	1+	2+	1+
Внекожные проявления*				
анемия	4+	1+	1+	1+
задержка роста	4+	1+	1+	Нет
ротовая полость				
аномалии мягких тканей	4+	4+, поражение глотки	4+	4+
гипоплазия эмали	4+	3+	2+	4+
кариес	Выраженный	2+	1+	Выраженный
желудочно-кишечный тракт	3+	Нет	Нет	Нет
мочеполовой тракт	2+	1+	Нет	Нет
глаза	3+	4+, поражение конъюнктивы, гранулемы век, симблефарон	1+	Нет
псевдосиндактилии	1+	Нет	Нет	Нет
дыхательный тракт	3+	4+	4+	4+
Риск в возрасте 30 лет				
плоскоклеточный рак	Редко	Нет		Нет
злокачественная меланома	Нет	Нет		Нет
базальноклеточная карцинома	Нет	Нет		Нет
смерть, связанная с БЭ	4+	Общий риск	Острая обструкция дыхательных путей	

БЭ – буллезный эпидермолиз, ПоБЭ – пограничный буллезный эпидермолиз, ЛОК синдром – ларинго-онихо-кутанный синдром, АР – аутосомно-рецессивный

* Шкала оценки [2]: «нет» – признак отсутствует, встречается «редко», степень выраженности признака – «1+», «2+», «3+», «4+»



Таблица 2. Продолжительность жизни пациентов с тяжелым генерализованным подтипом пограничного буллезного эпидермолиза, имеющих мутации в гене *LAMA3* [23–28]

Мутации	Средняя продолжительность жизни, месяцы	Количество случаев, абс.	Источник
c.335delG/335delG	18	1	Vidal F. и соавт., 1995 [23]
c.841G>T/841G>T	4	1	Schneider H. и соавт., 2007 [24]
c.1129insA/1129insA	1	1	Hammersen J. и соавт., 2016 [25]
c.1200G>A/1200G>A	4	1	Hammersen J. и соавт., 2016 [25]
c.1214delA/1214delA	5,2	3	Hammersen J. и соавт., 2016 [25]
c.2827C>T/3475C>T	Жив на момент публикации (ребенок школьного возраста)	1	Pacho F. и соавт., 2011 [26]
c.3895A>T/3895A>T	6	2	Mühle C. и соавт., 2005 [27]
c.4335insA/4335insA	15,8	2	Ayoub N. и соавт., 2005 [28]

гене для ЛОК синдрома, и делают вывод, что накопление генетических данных позволит в перспективе прояснить данный вопрос.

В представленных нами случаях в результате молекулярно-генетических исследований у обоих пациентов были выявлены ранее не описанные в литературе генетические варианты в гене *LAMA3*, которые по совокупности данных были расценены как патогенные. Верификация выявленных мутаций проводилась секвенированием по Сэнгеру.

В случае 2 обнаруженная у пробанда мутация локализуется в области гена *LAMA3*, не ассоциированной с ЛОК синдромом по данным литературы (на февраль 2019 г.) [27].

Очевидно, что несмотря на тщательный анализ клинической картины и имеющиеся результаты молекулярно-генетических исследований, во 2-м клиническом наблюдении не получено однозначного генетического подтверждения конкретного подтипа ПоБЭ. Возможно, данный случай представляет собой тяжелый генерализованный

подтип ПоБЭ с длительной выживаемостью пациента либо, вероятнее, ЛОК синдром с неполным фенотипом и ранее не описанным генетическим вариантом, который и выступает причиной имеющих у пробанда фенотипических проявлений. Для подтверждения данной гипотезы необходимы дополнительные исследования.

Предполагаем, что в представленных нами случаях клиническая гетерогенность, вариабельность проявлений заболевания, наличие ряда трудно интерпретируемых в отношении принадлежности к конкретной нозологии клинических признаков, продолжительность жизни одного из пробандов обусловлены в том числе локализацией мутаций в гене и их влиянием на функцию белка.

Заключение

Описанные нами случаи представляют пример сложности дифференциальной диагностики подтипа ПоБЭ и характеризуются следующими особенностями:

- *клиническое наблюдение 1:* течение заболевания, продолжительность жизни пациентки были теми признаками, которые затрудняли установление подтипа ПоБЭ, несмотря на характерное образование грануляционной ткани в типичной локализации, поражение гортани;
- *клиническое наблюдение 2:* наличие у пациента неполного симптомокомплекса, характерного для ЛОК синдрома (отсутствие вовлечения слизистой оболочки глаз в процесс, тяжесть изменений гортани), а также для тяжелого генерализованного подтипа (значительная по сравнению со средней продолжительностью жизни, неоднозначность для определения диагноза результатов молекулярно-генетической диагностики) затруднили точную диагностику.

Дальнейшие детальные описания фенотипических признаков (в том числе минимально выраженных) различных подтипов БЭ могут быть полезными для понимания клинической картины и естественного течения заболевания, а вкупе с данными молекулярно-генетических исследований позволят сформировать полное описание подтипов БЭ и улучшить их дифференциальную диагностику. ☺

Дополнительная информация

Информированное согласие

Родители обоих пациентов дали письменное информированное согласие на публикацию фотографий.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторы являются консультантами в Благотворительном фонде помощи детям, страдающим заболеванием буллезный эпидермолиз, «БЭЛА. Дети-бабочки» (DEBRA Russia).

Участие авторов

Оба автора внесли равный вклад в работу над статьей, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.



Литература / References

1. Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Bruckner-Tuderman L, Heagerty A, Hintner H, Hovnanian A, Jonkman MF, Leigh I, McGrath JA, Mellerio JE, Murrell DF, Shimizu H, Uitto J, Vahlquist A, Woodley D, Zambruno G. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58(6):931–50. doi: 10.1016/j.jaad.2008.02.004.
2. Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Has C, Heagerty A, Hintner H, Hovnanian A, Jonkman MF, Leigh I, Marinkovich MP, Martinez AE, McGrath JA, Mellerio JE, Moss C, Murrell DF, Shimizu H, Uitto J, Woodley D, Zambruno G. Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(6):1103–26. doi: 10.1016/j.jaad.2014.01.903.
3. Fine JD, Bauer EA, McGuire J, Moshell A, editors. *Epidermolysis bullosa: Clinical, epidemiologic, and laboratory advances and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry*. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press; 1999.
4. Vahlquist A, Tasanen K. Epidermolysis bullosa care in Scandinavia. *Dermatol Clin*. 2010;28(2):425–7, xv. doi: 10.1016/j.det.2010.02.018.
5. Horn HM, Priestley GC, Eady RA, Tidman MJ. The prevalence of epidermolysis bullosa in Scotland. *Br J Dermatol*. 1997;136(4):560–4. doi: 10.1046/j.1365-2133.1997.d011235.x.
6. Кубанов АА, Альбанова ВИ, Карамова АЭ, Чикин ВВ, Мелехина ЛЕ, Богданова ЕВ. Распространенность врожденного буллезного эпидермолиза у населения Российской Федерации. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2015;(3):21–30. doi: 10.25208/0042-4609-2015-0-3-21-30. [Kubanov AA, Albano-va VI, Karamova AE, Chikin VV, Melekhina LY, Bogdanova YV. Prevalence of hereditary epidermolysis bullosa in the Russian Federation. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2015;(3):21–30. Russian. doi: 10.25208/0042-4609-2015-0-3-21-30].
7. Pfendner EG, Lucky AW. Junctional epidermolysis bullosa. *GeneReviews* [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1125/>.
8. Kelly-Mancuso G, Kopelan B, Azizkhan RG, Lucky AW. Junctional epidermolysis bullosa incidence and survival: 5-year experience of the Dystrophic Epidermolysis Bullosa Research Association of America (DeBRA) nurse educator, 2007 to 2011. *Pediatr Dermatol*. 2014;31(2):159–62. doi: 10.1111/pde.12157.
9. Файн Дж.-Д., Хинтнер Х, ред. Буллезный эпидермолиз. Пер. с англ. под ред. Ю.Ю. Коталевской. М.: Практика; 2014. 358 с. [Fine JD, Hintner H, editors. *Life with epidermolysis bullosa (EB). Etiology, diagnosis, multidisciplinary care and therapy*. Wien: Springer-Verlag; 2009. 338 p. doi: 10.1007/978-3-211-79271-1].
10. Kowalewski C, Bremer J, Gostynski A, Wertheim-Tysarowska K, Wozniak K, Bal J, Jonkman MF, Pasmooij AM. Amelioration of junctional epidermolysis bullosa due to exon skipping. *Br J Dermatol*. 2016;174(6):1375–9. doi: 10.1111/bjd.14374.
11. Barzegar M, Mozafari N, Kariminejad A, Asadikani Z, Ozoemena L, McGrath JA. A new homozygous nonsense mutation in LAMA3A underlying laryngo-onycho-cutaneous syndrome. *Br J Dermatol*. 2013;169(6):1353–6. doi: 10.1111/bjd.12522.
12. Salvestrini C, McGrath JA, Ozoemena L, Husain K, Buhamrah E, Sabery N, Leichtner A, Rufo PA, Perez-Atayde A, Orteu CH, Torrente F, Heuschkel RB, Thomson MA, Murch SH. Desquamative enteropathy and pyloric atresia without skin disease caused by a novel intracellular beta4 integrin mutation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008;47(5):585–91. doi: 10.1097/MPG.0b013e31817af98d.
13. Fine JD. Epidemiology of Inherited Epidermolysis Bullosa Based on Incidence and Prevalence Estimates From the National Epidermolysis Bullosa Registry. *JAMA Dermatol*. 2016;152(11):1231–8. doi: 10.1001/jamadermatol.2016.2473.
14. Shabbir G, Hassan M, Kazmi A. Laryngo-onycho-cutaneous syndrome – a study of 22 cases. *Biomedica*. 1986;2:15–25.
15. ЛОК (ларинго-онихо-кутанный) синдром. ORPHA:2407 [Интернет]. Доступно на: <https://www.orpha.net/data/patho/RU/LOC-syndrome-RUrusAbs2233.pdf>. [LOC syndrome. ORPHA:2407 [Internet]. Available from: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=en&Expert=2407].
16. Kadyan A, Aralikatti A, Shah S, Jewell R, Paul L, Darling J, Wood M, Gooi J, Morrell AJ, Newton Bishop JA, Marr JE. Laryngo-onycho-cutaneous syndrome. *Ophthalmology*. 2010;117(5):1056–1056.e2. doi: 10.1016/j.optha.2009.11.019.
17. Cohn HI, Murrell DF. Laryngo-onycho-cutaneous syndrome. *Dermatol Clin*. 2010;28(1):89–92. doi: 10.1016/j.det.2009.10.010.
18. Hirscht T, Rothoeft T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, Scaglione D, Reichelt J, Klausegger A, Kneisz D, Romano O, Secone Seconetti A, Contin R, Enzo E, Jurman I, Carulli S, Jacobsen F, Luecke T, Lehnhardt M, Fischer M, Kueckelhaus M, Quagliano D, Morgante M, Biccato S, Bondanza S, De Luca M. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature*. 2017;551(7680):327–32. doi: 10.1038/nature24487.
19. Fine JD, Johnson LB, Weiner M, Suchindran C. Cause-specific risks of childhood death in inherited epidermolysis bullosa. *J Pediatr*. 2008;152(2):276–80. doi: 10.1016/j.jpeds.2007.06.039.
20. Fine JD, Johnson LB, Weiner M, Stein A, Cash S, Deleoz J, Devries DT, Suchindran C. Eye involvement in inherited epidermolysis bullosa: experience of the National Epidermolysis Bullosa Registry. *Am J Ophthalmol*. 2004;138(2):254–62. doi: 10.1016/j.ajo.2004.03.034.
21. Pearson RW, Potter B, Strauss F. Epidermolysis bullosa hereditaria letalis. Clinical and histological manifestations and course of the disease. *Arch Dermatol*. 1974;109(3):349–55. doi: 10.1001/archderm.1974.01630030009001.
22. Yuen WY, Duipmans JC, Molenbuur B, Herpertz I, Mandema JM, Jonkman MF. Long-term follow-up of patients with Herlitz-type junctional epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*. 2012;167(2):374–82. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.10997.x.
23. Vidal F, Baudoin C, Miquel C, Galliano MF, Christiano AM, Uitto J, Ortonne JP, Meneguzzi G. Cloning of the laminin alpha 3 chain gene (LAMA3) and identification of a homozygous deletion in a patient with Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Genomics*. 1995;30(2):273–80. doi: 10.1006/geno.1995.9877.
24. Schneider H, Mühle C, Pachó F. Biological function of laminin-5 and pathogenic impact of its deficiency. *Eur J Cell Biol*. 2007;86(11–12):701–17. doi: 10.1016/j.ejcb.2006.07.004.
25. Hammersen J, Has C, Naumann-Bartsch N, Stachel D, Kiritsi D, Söder S, Tardieu M, Metzler M, Bruckner-Tuderman L, Schneider H. Genotype, Clinical Course, and Therapeutic Decision Making in 76 Infants with Severe Generalized Junctional Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol*. 2016;136(11):2150–7. doi: 10.1016/j.jid.2016.06.609.
26. Pachó F, Zambruno G, Calabresi V, Kiritsi D, Schneider H. Efficiency of translation termination in humans is highly dependent upon nucleotides in the neighbourhood of a (premature) termination codon. *J Med Genet*. 2011;48(9):640–4. doi: 10.1136/jmg.2011.089615.
27. Mühle C, Jiang QJ, Charlesworth A, Bruckner-Tuderman L, Meneguzzi G, Schneider H. Novel and recurrent mutations in the laminin-5 genes causing lethal junctional epidermolysis bullosa: molecular basis and clinical course of Herlitz disease. *Hum Genet*. 2005;116(1–2):33–42. doi: 10.1007/s00439-004-1210-y.
28. Ayoub N, Tomb R, Charlesworth A, Meneguzzi G. Junctional epidermolysis bullosa. Identification of a new mutation in two Lebanese families. *Ann Dermatol Venereol*. 2005;132(6–7 Pt 1):550–3.
29. Laryngoonycho-cutaneous syndrome; LOCS. OMIM # 245660 [Internet]. Available from: <http://omim.org/entry/245660#1>.
30. McLean WH, Irvine AD, Hamill KJ, Whittock NV, Coleman-Campbell CM, Mellerio JE,



Ashton GS, Dopping-Hepenstal PJ, Eady RA, Jamil T, Phillips R, Shabbir SG, Haroon TS, Khurshid K, Moore JE, Page B, Darling J, Atherton DJ, Van Steensel MA, Munro CS, Smith FJ, McGrath JA. An unusual N-terminal deletion

of the laminin alpha3a isoform leads to the chronic granulation tissue disorder laryngo-onycho-cutaneous syndrome. *Hum Mol Genet.* 2003;12(18):2395–409. doi: 10.1093/hmg/ddg234.

31. Proding C, Klausegger A, Diem A, Bauer JW, Laimer M. Laryngo-onycho-cutaneous (-like) syndrome due to mutated Plectin. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31(8):e373–4. doi: 10.1111/jdv.14173.

Challenges of the differential diagnosis between the subtypes of the junctional epidermolysis bullosa: presentation of two clinical cases

Yu.Yu. Kotalevskaya¹ • N.M. Marycheva²

Background: Epidermolysis bullosa (EB) is a rare hereditary skin disease. It is subdivided into EB simplex (EBS), junctional EB (JEB), dystrophic EB (DEB) and Kindler syndrome. JEB is diagnosed in 2 per 1,000,000 of the population. There are few descriptions of clinical JEB cases in the literature. Clinical diagnosis of JEB and its subtypes is a challenge, especially in the early age. The paper presents **2 clinical cases of JEB** in patients of the West Slavonic origin. *Clinical case No. 1* was a girl of Ukrainian ethnicity, with confirmed definitive diagnosis of severe generalized JEB. Molecular genetic tests identified mutations of the *LAMA3* gene that had not been described previously. The patient died at the age of 24 months from acute respiratory failure. When the patient was alive, her EB type and subtype was not possible to identify, because she had a combination of clinical manifestations typical for various JEB subtypes. Despite such symptoms as hoarse voice, stenoses, granulation tissue of typical location, laryngeal granulations, the girl was steadily gaining weight, with some periods of relative stabilization of the skin disease; she also had longer life longevity than was common for patients with severe generalized JEB. All this made a precise diagnosis difficult. *Clinical case No. 2:* an ethnic Russian boy with non-classified JEB. Molecular genetic testing helped to identify a homozygote mutation in the *LAMA3* gene that had not been previously described; reliable determination of the subtype was not possible. The patient had mixed clinical manifestation

similar both to generalized severe JEB and to laryngo-onycho-cutaneous (LOC) syndrome. During his lifetime, the patient was clinically diagnosed with Hallopeau acrodermatitis and LOC syndrome. The differential diagnostic problems were associated with the presence of signs not typical for each of the subtypes. Significant life longevity of the proband is not characteristic for severe generalized JEB (at the time of the publication the patient is 13 years old), whereas for LOC syndrome the absence of eye involvement is not typical, as well as severe laryngeal involvement at adolescence. **Conclusion:** Detailed descriptions of phenotype of JEB subtypes including rare and minimal clinical signs can be useful to study the clinical manifestations and natural course of the disease, including its differential diagnosis.

Key words: junctional epidermolysis bullosa, severe generalized junctional epidermolysis bullosa, epidermolysis bullosa, laryngo-onycho-cutaneous syndrome, *LAMA3* gene

For citation: Kotalevskaya YuYu, Marycheva NM. Challenges of the differential diagnosis between the subtypes of the junctional epidermolysis bullosa: presentation of two clinical cases. *Almanac of Clinical Medicine.* 2019;47(1):83–93. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-009.

Received 7 February 2019; accepted 18 February 2019; published 22 February 2019

Informed consent statement

Parents of both patients have given informed, written consent for publication of clinical details and images.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

The authors are consulting physicians at the Charitable Foundation Supporting Children with Epidermolysis Bullosa "BELA. Butterfly Children" (DEBRA Russia).

Author contributions

Both authors have contributed equally to the paper. All authors have read and approved the final manuscript.

Yuliya Yu. Kotalevskaya – MD, PhD, Geneticist, Head of the Consultative Department, Center for Medical Genetics¹

✉ 61/2–8 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (915) 167 35 83.

E-mail: kotalevskaya@mail.ru

Nataliya M. Marycheva – MD, Dermatovenerologist²

¹ Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

² Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology; 17 Leninskiy prospekt, Moscow, 119071, Russian Federation

