

AVERAGE MOLECULAR PEPTIDES IN BLOOD PLASMA FOR EVALUATING THE DEGREE OF INTOXICATION IN PATIENTS WITH ACUTE STROKE

B.S. NAGOEV, M.A.-K. YELEEVA

Kabardino-Balkaria State University, Nalchik

The article evaluates the level of average molecular peptides in blood plasma in patients with acute as indices endogenous intoxication. 238 patients were examined. V.V. Nickolaichick's screening method (M.I. Gabrilovich's modification) was used.

Key words: average molecular peptides, blood plasma, acute cerebral circulation impairment, ischemic insult, hemorrhagic insult.

УДК 616006

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ BRCA1/2 И CHEK2 НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПАХ В РАМКАХ СКРИНИНГОВОЙ ПРОГРАММЫ ПО РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ХАНТЫ-МАНСИЙСКОМ АВТОНОМНОМ ОКРУГЕ – ЮГРЕ

Н.А. ЗАХАРОВА, М.В. ДОННИКОВ, А.В. ФИЛИМОНОВ*

В 2009 году в Окружной клинической больнице г. Ханты-Мансийска было проведено генетическое тестирование 130 женщин с отягощенным наследственным анамнезом по раку молочной железы. С помощью технологии биологических микрочипов (аллель-специфичная гибридизация) впервые получены данные о наличии/отсутствии генетических дефектов в так называемых генах предрасположенности к наследственным формам РМЖ (BRCA1, BRCA2, CHEK2) в выборке пациенток медицинского учреждения территории, приравненной к Крайнему Северу. Создан банк ДНК женщин, проживающих регионе, и имеющих отягощенный семейный анамнез по раку молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, генетическая мутация, биологический микрочип

Повышение риска развития рака молочной железы, ассоциированное с отягощенным семейным анамнезом по данному заболеванию было отмечено во многих исследованиях достаточно давно [7,8]. В среднем, риск удваивается при наличии родственников первой линии с установленным диагнозом [3].

К настоящему времени методами молекулярной генетики идентифицирован и охарактеризован ряд генов, мутации в которых ассоциированы с повышенным риском возникновения рака молочной железы. К ним, в первую очередь, относятся гены BRCA1 и BRCA2 (Breast CAncer Susceptibility genes), открытые в конце прошлого века [1]. Другие гены были обнаружены сравнительно позже - CHEK2 (Cell Cycle CHEK-point Kinase 2), NBS1, p53, ATM [12,13]. Роль генов BRCA1, BRCA2 изучена наиболее подробно.

BRCA1 является геном, состоящим из 22 кодирующих экзонов, кодирующих последовательность белка из 1863 аминокислот. Ген BRCA2 включает 26 экзонов и кодирует собой белок из 2329 аминокислот. Белковые продукты генов BRCA1 и BRCA2 вовлечены в поддержание стабильности генома путем репарации ДНК и таким образом, могут быть отнесены к классу онкосупрессоров. Полагают также, что гены BRCA являются супрессорами клеточной пролиферации при раке молочной железы, а также кодируют дополнительный рецептор, теоретически доступный для лекарственной терапии [5,9].

Наследственные мутации генов BRCA1, BRCA2 повышают риск развития рака молочной железы до 56-80% на протяжении всей жизни, кроме того, до 10-30% возрастает риск развития рака яичников, желудка и толстой кишки [4,6]. Наиболее распространенной мутацией гена BRCA1 в странах Восточной Европы является мутация 5382 insC в 20-м экзоне. При изучении спектра мутаций гена BRCA1 в российских семьях, отягощенных по раку молочной железы и/или раку яичников, показано, что 47% всех мутаций приходится на долю мутации 5382 insC [10].

В настоящее время гены BRCA1 и BRCA2 являются объектами генетического тестирования в большинстве европейских стран. Важность таких исследований определяется тем, что опухоли, ассоциированные с мутациями данных генов, имеют худший прогноз в сравнении со спорадическим раком молочной железы, заболевание развивается в более молодом возрасте [2,11].

Цель исследования. В 2009 году в Окружной клинической

больнице г. Ханты-Мансийска (Ханты-Мансийский Автономный округ – Югра) при финансовой поддержке руководства региона (Грант правительства) было проведено массовое тестирование женщин с отягощенным наследственным анамнезом по раку молочной железы.

Материалы и методы исследования. Основным методом для проведения анализа было использование биологических микрочипов, выявляющих семь наиболее распространенных в европейской части России мутаций в генах BRCA1/2 и CHEK2.

Было обследовано 130 женщин – жительниц Ханты-Мансийска и Ханты-Мансийского района. Со всеми обследованными перед процедурой забора крови проводилась беседа о роли генетической предрасположенности в развитии *рака молочной железы* (РМЖ). Также все женщины заполнили специальную анкету, характеризующую отягощенный наследственный анамнез.

Тотальная геномная ДНК была выделена из цельной венозной крови с использованием наборов PureLink Genomic DNA Mini Kit (“Invitrogen”). Генотипирование образцов ДНК на наличие мутаций проводили с использованием набора Биочип (РМЖ) («Биочип-ИМБ», Москва). Полиморфные участки генов BRCA1, BRCA2, CHEK2 амплифицированы с помощью «гнездовой» мультиплексной ПЦР в два этапа. На первом этапе получали двухцепочечный ПЦР – продукт для каждого из выбранных фрагментов исследуемых генов. На втором этапе (асимметричная ПЦР) в продукт вводили флуоресцентный краситель. Таким образом, синтезировались одноцепочечные флуоресцентно меченые фрагменты. Далее осуществлялась гибридизация флуоресцентно меченых ПЦР-продуктов на биочипе. Гибридизационную смесь полностью денатурировали при 95°C, быстро охлаждали до 4°C, вносили в гибридизационную камеру биочипа и инкубировали 12 часов при 37°C. Затем биочип отмывали в растворе SSPE в течение 10 минут при комнатной температуре.

Биочипы изготовлены методом фотоиндуцируемой кополимеризации олигонуклеотидных зондов и компонентов акриламидного геля [13].

Регистрация изображения проведена на портативном видеоанализаторе биочипов. Обсчет флуоресцентных изображений проводился с помощью программного обеспечения ImaGeWare («Биочип-ИМБ»).

Статистический анализ данных, полученных при анкетировании обследованных и при молекулярно-генетическом скрининге, был произведен с использованием пакетов Microsoft Excel и STATA 10.

Создан банк ДНК женщин, проживающих в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре (далее – Югре), и имеющих отягощенный семейный анамнез по раку молочной железы, в количестве 130 образцов. Группу женщин составили на основе данных канцер-регистра Югры и имеющейся группы диспансерного наблюдения у онколога. Из них, в количестве 20 образцов создан банк ДНК женщин с выявленным первичным раком молочной железы, запланированных на органосохраняющее хирургическое лечение. Анализ данных показал, что основную группу обследованных составил возрастной диапазон 26-45 лет – около 58% (рис. 1).

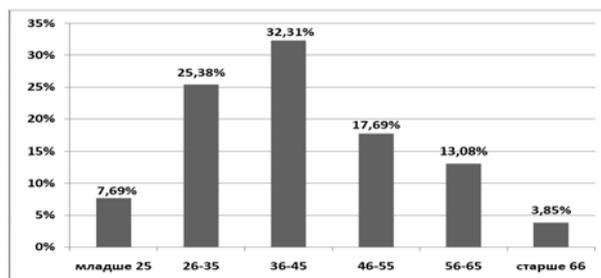


Рис. 1. Распределение обследованных женщин по возрастным группам.

Статистическая обработка данных по характеру отягощенного наследственного анамнеза представлена в табл. 1.

* 628012, Ханты-Мансийск, ул. Калинина 40, Окружная клиническая больница

Таблица 1

Характеристика отягощенного наследственного анамнеза

Локализация	Наследственность (отягощена - да/нет)	%	Std. Err.*	95% CI**
рак молочной железы	Нет	49,2%	4,4	40,5-57,9
	Да	50,8%	4,4	42,0-59,4
рак яичника	Нет	90,7%	2,5	85,7-95,9
	Да	9,3%	2,5	4,1-14,2
рак толстой кишки	Нет	88,4%	2,8	82,8-94,0
	Да	11,6%	2,8	5,9-17,1
рак молочной железы у мужчин	Нет	100%	-	-
	Да	0%	-	-
двусторонний рак молочной железы	Нет	96,1%	1,7	92,8-99,5
рак молочной железы	Нет	3,9%	1,7	0,5-7,2
	Да	31,5%	4,1	23,4-39,7
рак других локализаций	Нет	68,5%	4,1	60,4-76,5
	Да	31,5%	4,1	23,4-39,7

Примечание: * – St. Err – стандартная ошибка;
** – CI – доверительный интервал

Все обследованные женщины были подразделены на группы риска по следующим критериям:

1. низкий риск – наличие одного родственника со злокачественным новообразованием, за исключением двустороннего рака молочной железы,
2. средний риск – наличие двух родственников с установленным диагнозом злокачественного новообразования, одна из которых – близкой линии родства с раком молочной железы,
3. высокий риск – наличие трех и более родственников с выявленным злокачественным новообразованием (рак молочной железы – обязательно), либо случай двустороннего рака молочной железы.

Анализ данных по указанным категориям (табл. 2) показал, что средний возраст в группе высокого риска статистически достоверно меньше, чем в других группах (P=0,018). Все женщины в данной группе по национальной принадлежности являются русскими.

Таблица 2

Распределение обследованных женщин по группам риска

Группа риска	Абсолютное число.	%	Средний возраст	Стандартное отклонение
Низкий риск	86	66,2	43,7	12,5
Средний риск	31	23,8	40,5	10,3
Высокий риск	13	10,0	35,3	10,5

С помощью технологии биологических микрочипов был проведен скрининг образцов ДНК на предмет выявления мутаций в генах BRCA1, BRCA2 и CHEK2, характерных для европейской части России, а именно: для гена BRCA1: 185delAG, 300T>G, 4153delA, 4158A>G и 5382insC; для гена BRCA2: 695insT, 6174delT; для гена CHEK2: 1100delC.

Полученные данные по генотипам позволяют сделать вывод об отсутствии охарактеризованных выше мутаций в генах BRCA1, BRCA2, CHEK2 у подавляющего большинства пробандов в исследованной нами выборке (рис. 1). Обнаружен 1 образец с мутацией 5382insC в гене BRCA1 (рис. 2).

Наследственный анамнез участницы с выявленной при скрининге мутацией 5382insC в гене BRCA1 отягощен по онкологической патологии: два случая рака молочной железы у родственников 1 и 2 линии родства, рак легкого у родственника 1 линии родства, рак легкого и рак желудка у родственников 2 линии родства.

Для проверки достоверности проведенного скрининга у 10 женщин из группы высокого риска с отрицательным результатом на мутации в исследуемых генах анализ был проведен повторно методом секвенирования. Во всех случаях был подтвержден отрицательный результат.

Результаты и их обсуждение. В ходе проведенного исследования выявлено 0,7% случаев мутации BRCA1 (1 положительный тест). 99,3% обследованных с отрицательным результатом теста. Столь низкий процент выявленных случаев с изучаемыми мутациями возможно объясняется социально-демографическими особенностями, присущими северным территориям России – высокий уровень миграции населения, и, как следствие, наличие незначительной доли жителей округа, стабильно проживающей из поколения в поколение на данной территории. Всего, по данным статистических опросов, в целом в округе 80% населения являются мигрантами в 1-4 поколения (20% – мигранты в 1 поко-

лении) и всего 20% оседлого местного населения. Именно этот фактор может оказывать положительное влияние на генетический фон жителей региона.

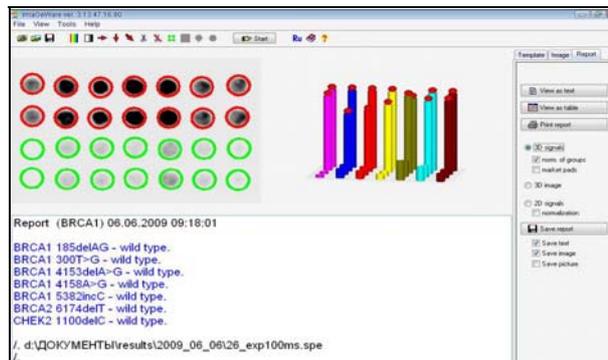


Рис. 1. Образец без патологических генетических мутаций.

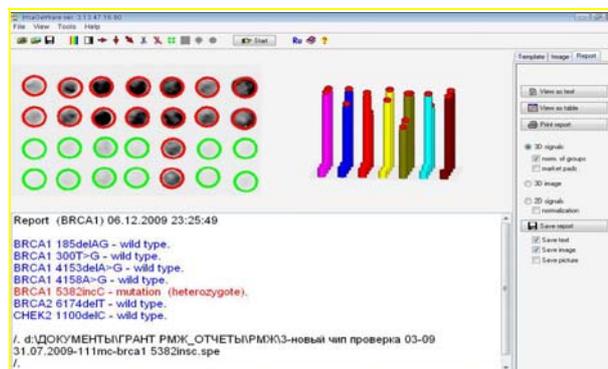


Рис. 2. Образец с генетической мутацией 5382insC в гене BRCA1

Потенциальная выгода от отрицательного результата - это чувство облегчения для женщин, имеющих родственников со злокачественными новообразованиями (особенно с раком молочной железы), поскольку хронический стресс сам по себе является фактором риска для развития злокачественных новообразований.

В настоящее время для быстрой и точной диагностики мутаций в исследуемых генах предпочтительно использование методики аллель-специфичной гибридизации на биологическом микрочипе. Этот подход имеет важное преимущество – возможность определять несколько мутаций в одном образце, что снижает трудоемкость и позволяет автоматизировать анализ. Используемая методика достаточно проста и хорошо воспроизводима, что позволило использовать ее в клиническом медицинском учреждении.

Впервые получены данные о наличии/отсутствии генетических дефектов в так называемых генах предрасположенности к наследственным формам РМЖ (BRCA1, BRCA2, CHEK2) в выборке пациентов медицинского учреждения Югры. Поскольку наличие генетической предрасположенности к раку молочной железы является несомненным фактором риска при мастопатиях, эти данные играют важную роль в профилактике у женщин с отягощенным семейным анамнезом по данной нозологии. Таким образом, результаты данного исследования имеют практическое значение для врачей-онкологов Югры.

Литература

1. Создание биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации / Готов А.С. [и др.] / Молекуляр. Биология, 2006.– 39.– С. 403–412
2. Анализ точечных мутаций в гене BRCA1 методом гибридизации с гидрогелевыми микрочипами / Федорова О.Е. [и др.] / Молекуляр. Биология, 2006.– 40.– С. 31–36
3. Predicting breast cancer risk: implications of a “weak” family history. Fam. Cancer. / Anderson E. [et al.] / 2008.– 4.– P. 361–366
4. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. Am. J. Hum. Genet.

/ A. Antoniou [et al.].– 2003.– 72.– P. 1117–1130

5. Recent advances in cancer therapy targeting proteins involved in DNA double-strand break repair. Clin. Cancer Res. / E. Bolderson [et al.].– 2009.– 20.– P. 6314–6320

6. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am. J. Hum. Genet / D. Ford [et al.].– 1998.– P. 676–689

7. Goodwin, P.J. Management of familial breast cancer risk. Breast Cancer Res. Treat / P.J. Goodwin.– 2000.– P. 19–33

8. Harris, R.E. Familial breast cancer: risk to the contralateral breast. J. Natl. Cancer Inst. / R.E. Harris, H.T. Lynch, H.A. Guirgis. – 1978.– P. 955–960

9. Huen, M.S. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol / M.S. Huen, S.M. Sy, J. Chen.– 2010.– P. 138–148

10. Spectrum of mutations in BRCA1 gene in hereditary forms of breast and ovarian cancer in Russian families. Bull. Exp. Biol. Med. / A.N. Loginova [et al.]. – 2003.– 136.– 276–278

11. Population-based study of the risk of second primary contralateral breast cancer associated with carrying a mutation in BRCA1 or BRCA2. J. Clin. Oncol / K.E. Malone [et al.].– 2010, 14: 2404–2410

12. Nathanson, K.L. “Other” breast cancer susceptibility genes: searching for more holy grail. Hum. Mol. Genet / K.L. Nathanson, B.L. Weber.– 2001, 7: 715–720

13. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in families at high risk of breast cancer. JAMA / Walsh T. [et al.].– 2006, 12: 1379–1388

ANALYSIS OF BRCA1 / 2 AND CHEK2 GENES MUTATIONS USING BIOLOGICAL MICROARRAY METHOD AS A PART OF THE BREAST CANCER SCREENING PROGRAM IN THE KHANTY-MANSIYSKY AUTONOMOUS OKRUG -UGRA

N.A. ZAKHAROVA, M.V. DONNIKOV, A.V. FILIMONOV

Khanty-Mansiysk Okrug Clinical Hospital

In 2009, in the Khanty-Mansiysk Okrug Clinical Hospital genetic testing of 130 women with hereditary breast cancer anamnestic record was conducted. Applying the technology of biological microchips a database of presence/absence of genetic defects in the BRCA1, BRCA2, CHEK2 genes among the women from the Far Northern territory of Russia was obtained for the first time. A DNA bank was created dealing with the women with breast cancer anamnestic record living in the region.

Key words: breast cancer, genetic mutation, microarray.

УДК 616-053.1-071-003.96:616.89

ФАКТОРЫ РИСКА РОЖДЕНИЯ ДЕТЕЙ С ЗАДЕРЖКОЙ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ

Д.В. ИЛАТОВСКАЯ*

Проведен анализ соматической, гинекологической и акушерской патологии у 244 женщин, из них у 201 женщины родились дети с задержкой внутриутробного развития, у 43 – новорожденные с нормальным физическим развитием. Для выявления прогностических критериев задержки внутриутробного развития плода был использован метод построения классификационных деревьев. Наиболее значимыми предикторами задержки внутриутробного развития явились проживание матери в сельской местности, возраст матери старше 30 лет в сочетании с акушерской и соматической патологией, её рост менее 160 см, патология пуповины и маловодие во время беременности.

Ключевые слова: новорожденный, факторы риска, задержка внутриутробного развития.

Задержка внутриутробного развития плода (ЗВУР) занимает третье место в структуре причин перинатальной заболеваемости и смертности, а репродуктивные потери и затраты на комплексное лечение детей с ЗВУР наносят значительный социальный и экономический ущерб.

Известно, что ЗВУР является универсальной реакцией плода в ответ на неблагоприятные условия в периоде внутриутробного развития, связанное с факторами риска у матери, патологией плаценты или патологией самого плода [6]. Поскольку малые размеры при

рождении и диспропорции между размерами окружности головы, длиной и массой тела являются косвенными маркерами факторов, программирующих развитие человеческого плода, изучение детерминант фетального роста имеет большое значение [5].

Одной из главных задач антенатальной помощи является своевременное выявление факторов, которые являются основанием для внесения матери, ее плода или новорожденного в группу повышенного риска перинатальных осложнений в целях профилактики или снижения тяжести подобных осложнений.

Цель исследования – выявление факторов риска задержки внутриутробного развития с целью проведения своевременной и эффективной профилактики данной патологии.

Материалы и методы исследования. Нами было обследовано 244 ребенка. Из них у 201 ребенка вес при рождении был ниже десятого перцентиля для данного гестационного возраста и имелись признаки задержки внутриутробного развития, у 43 детей были нормальные весовые показатели при рождении и отсутствие проявлений ЗВУР. Все дети родились доношенными в сроке 38 – 41 неделя. Дети были распределены на 5 групп:

I группа (n=97) – дети с гипотрофическим вариантом задержки внутриутробного развития 1 степени;

II группа (n=47) – дети с гипотрофическим вариантом задержки внутриутробного развития 2 степени;

III группа (n=30) – дети с гипопластическим вариантом задержки внутриутробного развития 1 степени;

IV группа (n=27) – дети с гипопластическим вариантом задержки внутриутробного развития 2 степени;

V группа (n=43) – дети с нормальным физическим развитием при рождении.

Был проведен анализ социально-биологических, экономических показателей, соматической, инфекционной, гинекологической заболеваемости и особенностей течения беременности и родов у матерей всех исследуемых детей (n=244).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием математического пакета программ Statistica 6,1 и BIOSTAT. Анализ данных проводился методом дескриптивной статистики: определялись среднее, ошибка среднего, дисперсия, доверительный интервал. Сравнение двух групп проводилось с использованием t-критерия Стьюдента, а если гипотеза нормальности распределения групп была отвергнута, использовался критерий Манна-Уитни. Для сравнения нескольких групп использовался непараметрический критерий Краскела-Уоллиса. Критический уровень значимости (p) был равен 0,05.

Для выявления прогностических критериев задержки внутриутробного развития был использован алгоритм «Деревья классификации». Этот метод позволяет выполнить одномерное ветвление для анализа вклада отдельных переменных, что дает возможность работать с предикторами переменных различных типов.

Применяя алгоритм «Деревья классификации», задача стояла не только в том, чтобы получить прогноз, но и сделать его адаптированным для практического применения. Именно поэтому был выбран данный метод, он не требует ни специальных программ, ни математических расчетов, на графе дерева вся информация представлена в простом для восприятия виде.

Результаты и их обсуждение. Причины возникновения задержки внутриутробного развития мультифакториальны. На раннее развитие организма может влиять целый комплекс негативных факторов – биологических, экологических, инфекционных, социально-экономических.

Отмечено, что у женщин, проживающих в сельской местности, чаще рождались дети с гипотрофическим вариантом ЗВУР I и 2 степени и гипопластическим вариантом 2 степени по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

У матерей, чья работа была связана с производственными вредностями, такими как лаки, красители, кислоты, бензин, минеральные удобрения, пары спирта, высокие температуры, чаще рождались дети с гипопластическим вариантом задержки внутриутробного развития 2 степени (33,3%) в сравнении со II, III и V группами (p<0,05).

Была выявлена закономерность рождения детей с задержкой внутриутробного развития от матерей с низкими значениями веса и роста до беременности. При гипопластическом варианте 2 степени вес матерей до беременности был 60,03±1,43, тогда как в контрольной (V) и I группах этот параметр был достоверно выше и составил 64,88±1,05 кг (p<0,05). Отмечено, что детей с задержкой внутриутробного развития рожали женщины с достоверно более низким

* ГОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», 394000 г. Воронеж, ул. Студенческая, 10, ГОУ ВПО ВГМА им. Н.Н. Бурденко, тел. 8 (473) 296-17-82