

Т. В. Жукова¹, А. В. Белецкий², Л. М. Шевчук³,
Д. К. Тесаков⁴, А. В. Борисов⁵, К. А. Самочерных⁶,
Н. Е. Иванова⁶, Ю. М. Забродская⁶

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ ВРОЖДЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

Международный университет «МИТСО»¹
Клиника «Мерси», Минск Республика Беларусь²
УО «Белорусский государственный медицинский университет»³
РНПЦ травматологии и ортопедии⁴
4 ГКБ, Минск, Республика Беларусь⁵
Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт
им. А. Л. Поленова ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России г. Санкт Петербург, Россия⁶

Этиологическими факторами развития врожденных деформаций позвоночника, как и любой врожденной патологии могут являться воздействия неблагоприятных факторов и тератогенов в период эмбрионального развития (вальпроевая кислота, алкоголь, гипертермия, инсулин-зависимый диабет у матери и др.). Также есть наследственные формы, обусловленные наличием мутаций в генах, участвующих в закладке и развитии соединительной ткани.

Цели и задачи: обосновать прогностическое значение молекулярно-генетических и биохимических маркеров в диагностике врожденной патологии.

Материалы и методы. Исследования проведены у 52 пациентов с врожденными деформациями позвоночника. Изучены полиморфизмы генов детоксикации GSTT1, GSTM, GSTP1 (Ile105Val), GSTP1 (Ala114Val). Для изучения мутаций генов, отвечающих за темпы роста и структуру позвонков и межпозвонковых дисков – генов HOXA11, HOXD13, RUNX2, CHST3, DLL3, MESP2, LFNG, HES7 разработаны праймеры для амплификации и секвенирования кодирующих экзонов этих генов.

Одновременно у 52 пациентов изучены микроэлементный состав крови (Zn, P, Ca, Si), а также содержание Se, Ag, Pb, Cd. Для измерения содержания тяжелых металлов кадмия и свинца, а также микроэлементов серебра в биосубстратах использовали атомно-абсорбционный спектрометр Agilent 240Z AA с электротермической атомизацией, для измерения содержания селена – атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой Ultima-2. Исследовались также Zn, P, Ca, Si «макроэлементы», концентрация которых в организме превышает 0,01 %.

Результаты и обсуждение. При проведении генетического исследования выявлено две мутации в генах HOXA11 и LFNG у двух разных пациентов, которые отвечают за развитие соединительной ткани в целом. У пациентов, встречались полиморфизмы генов, а также делеции/инсерции, которые не являются патогенными и либо не приводят к замене аминокислоты в белке или являются вариантом нормы, встречающимся в нормальной популяции.

В результате анализа полученных данных при изучении микроэлементов и тяжелых металлов установлено, что диапазоны значений содержания микроэлементов в сыворотке крови детей с прогрессирующими врожденными деформациями позвоночника составляют, мкг/л: для свинца – 0,001–246,460; кадмия – 0,001–3,387; серебра – 0,001–165,786; селена – 0,001–52,26 с медианами соответственно 0,001;

0,001; 3,819 и 14,650. Анализ содержания свинца в сыворотке крови детей с костной патологией показал, что в 32,7 % образцов содержание этого элемента превышает «условную» норму в 2 раза. Содержание селена в сыворотке крови детей значительно ниже «условной» нормы, при этом даже максимальное значение (52,26 мкг/л) не достигает нижней границы референсного диапазона, концентрация кадмия соответствует норме, 86,4 % имеют повышенное содержание фосфора в крови. Серьезные мутации выявлены у детей с врожденными комбинированными пороками развития. Они сочетались с отсутствием генов детоксикации на фоне повышения содержания свинца и фосфора в крови исследуемых.

Выводы:

1. Наличие мутаций генов, отвечающих за развитие соединительной ткани как таковой, может повлечь за собой наличие множественной врожденной патологии.

2. Наиболее опасными являются варианты, имеющие корреляцию с повышением референсных значений тяжелых металлов, таких как свинец в сочетании с повышением концентрации фосфора при отсутствии генов дезинтоксикации.

3. Проведение исследований с использованием определения молекулярно-генетических и биохимических маркеров в диагностике врожденной патологии является перспективным направлением, так как может быть использовано для поиска врожденной патологии, наряду с лучевыми методами исследований.

Ключевые слова: молекулярно-генетические маркеры, биохимические маркеры, диагностика врожденной патологии.

T. V. Zhukova, A. V. Beleckij, L. M. Shevchuk, D. K. Tesakov,
A. V. Borisov, K. A. Samochernykh, N. E. Ivanova, Yu. M. Zabrodskaia

PROGNOSTIC VALUE OF MOLECULAR GENETIC AND BIOCHEMICAL MARKERS IN THE DIAGNOSIS OF CONGENITAL PATHOLOGY

Etiological factors in the development of congenital deformities of the spine, as well as any congenital pathology, may be the effects of adverse factors and teratogens during embryonic development (valproic acid, alcohol, hyperthermia, insulin-dependent diabetes in the mother, etc.). There are also hereditary forms due to the presence of mutations in the genes involved in the laying and development of connective tissue.

Materials and methods. *The studies were carried out in 52 patients with congenital spinal deformities. Polymorphisms of detoxification genes GSTT1, GSTM, GSTP1 (Ile105Val), GSTP1 (Ala114Val) were studied. To study mutations in the genes responsible for the growth rate and structure of the vertebrae and intervertebral discs – the HOXA11, HOXD13, RUNX2, CHST3, DLL3, MESP2, LFNG, HES7 genes, primers were developed for amplification and sequencing of the coding exons of these genes.*

At the same time, the microelement composition of the blood (Zn, P, Ca, Cu), as well as the content of Se, Ag, Pb, Cd were studied in 52 patients. To measure the content of heavy metals cadmium and lead, as well as trace elements of silver in biosubstrates, an Agilent 240Z AA atomic absorption spectrometer with electrothermal atomization was used; to measure the selenium content, an atomic emission spectrometer with an Ultima-2 inductively coupled plasma was used. We also studied Zn, P, Ca, Cu «macroelements», the concentration of which in the body exceeds 0.01 %.

Results and its discussion. *When conducting a genetic study, two mutations were identified in the HOXA11 and LFNG genes in two different patients, which are responsible for the development of connective tissue in general. In patients, there were gene polymorphisms, as well as deletions / insertions that are not pathogenic and either do not lead to an amino acid substitution in the protein or are a normal variant found in the normal population. As a result of the analysis of the data obtained in the study of trace elements and heavy metals, it was found that the ranges of values for the content of trace elements in the blood serum of children with progressive congenital spinal deformities are, ug/l: for lead – 0.001–246.460; cadmium – 0.001–3.387; silver – 0.001–165.786; selenium –*

0.001–52.26 with medians, respectively, 0.001; 0.001; 3.819 and 14.650. An analysis of the lead content in the blood serum of children with bone pathology showed that in 32.7 % of the samples the content of this element exceeded the “conditional” norm by 2 times. The content of selenium in the blood serum of children is significantly below the “conditional” norm, while even the maximum value (52.26 ug/l) does not reach the lower limit of the reference range, the concentration of cadmium corresponds to the norm, in 86.4 % there was an increased content of phosphorus in the blood. Serious mutations have been observed in children with combined congenital malformations. They were combined with the absence of detoxification genes against the background of an increase in the content of lead and phosphorus in the blood of the subjects.

Conclusions

1. The presence of mutations in the genes responsible for the development of connective tissue as such can lead to the presence of multiple congenital pathologies.
2. The most dangerous are the variants that correlate with an increase in the reference values of heavy metals such as lead and phosphorus in the absence of detoxification genes.
3. Conducting research using the determination of molecular genetic and biochemical markers in the diagnosis of congenital pathology is a promising direction, since it can be used to search for congenital pathology, along with radiation research methods.

Key words: molecular genetic markers, biochemical markers, diagnosis of congenital pathology.

Этиологическими факторами развития врожденных деформаций позвоночника, как и любой врожденной патологии могут являться воздействия неблагоприятных факторов и тератогенов в период эмбрионального развития (вальпроевая кислота, алкоголь, гипертермия, инсулин-зависимый диабет у матери и др.). Также есть наследственные формы, обусловленные наличием мутаций в генах, участвующих в закладке и развитии соединительной ткани.

На восприимчивость к тем или иным воздействиям окружающей среды (химическим, физическим и биологическим факторам, действующим извне и образующимся в процессе жизнедеятельности организма) влияет генотип человека. Полиморфизмы и мутации генов изменяют структуру, функциональную активность белков, а также влияют на их синтез и количество в клетке. Особую роль в организме играют белки-ферменты детоксикации, которые отвечают за метаболизм и выведение опасных соединений (ксенобиотиков, естественных метаболитов, лекарственных веществ) из организма. Полиморфизмы генов детоксикации могут приводить к изменению активности ферментов (однонуклеотидные полиморфизмы, single nucleotide polymorphism – SNP) или их количества вплоть до полного отсутствия в клетке (нулевые аллели, null-alleles). Следствием может явиться увеличение риска развития и тяжестью протекания широкого спектра заболеваний [1, 2].

Мы обратили внимание на существенное влияние полиморфизмов генов детоксикации на предрасположенность к врожденным заболеваниям.

Процесс детоксикации протекает в три фазы при участии сложной ферментативной системы.

Фаза I обуславливает присоединение к ксенобиотикам полярных функциональных групп (–ОН, –SH, –NH₂) с приданием токсическим соединениям гидрофильных свойств, которые облегчают их растворение. К ферментам I фазы биотрансформации относят цитохромы P450 и некоторые другие ферменты классов оксидаз, редуктаз и дегидрогеназ, которые участвуют в реакциях окисления и восстановления, а также гидролиза молекул ксенобиотика.

Фаза II – ковалентная конъюгация, ведущая к образованию транспортных форм ксенобиотиков и способствующая их выведению из организма. Сюда относятся ферменты конъюгации: глутатион S-трансферазы (GST), UDP-глюкуронозилтрансферазы (UDPGT), N-ацетил-(NAT) и сульфо-(ST)-трансферазы, эпиксид гидролазы (EPHX), метилтрансферазы и др.

Фаза III биотрансформации – фаза эвакуации при помощи специфических переносчиков экзогенных соединений – Р-гликопротеинов происходит перемещение ксенобиотиков в организме.

В настоящее время известно более 300 генов, ответственных за биотрансформацию ксенобиотиков (Жарин, 2013). Мы сосредоточили свое внимание на 3 хорошо изученных генах (GSTM1, GSTT1, GSTP1), роль которых доказана в развитии ряда заболеваний.

Ключевыми ферментами второй фазы детоксикации является глутатион S трансферазы (GST), которые присоединяют глутатион к различным алифатическим, ароматическим и гетероциклическим соединениям с образованием тиоэфиров и меркаптуровой кислоты. Эти ферменты обезвреживают продукты перекисного окисления липидов, свободные радикалы, тяжелые металлы и цито-

статики. У человека выделяют несколько классов глутатион-S-трансфераз: alpha (A), kappa (K), mu (M), omega (O), pi (P), theta (T) и zeta (Z).

Ген GSTM1 кодирует аминокислотную последовательность фермента тета-1 глутатион S-трансферазы, которая участвует в инактивации электрофильных органических веществ, включая канцерогены, лекарственные препараты, токсины и продукты оксидативного стресса, путем конъюгации с глутатионом. Наибольшая экспрессия гена GSTM1 наблюдается в печени, почках, надпочечниках и желудке. При делеции (отсутствии) гена GSTM1, так называемом «нулевом» варианте, фермент тета-1 глутатион S-трансфераза не образуется, в результате чего способность организма выводить некоторые токсичные соединения значительно снижается. Наличие нулевого аллеля в гомозиготном состоянии связано с увеличением риска развития онкологических заболеваний, вероятно, из-за повышенной восприимчивости к токсинам и канцерогенам.

Ген GSTT1 кодирует фермент тета-1 глутатион S-трансферазы, который содержится в эритроцитах и участвует в очистке организма от многих ксенобиотиков (в частности, хлорметанов и других промышленных канцерогенов). При «нулевом» варианте, т. е. отсутствии белка способность организма избавляться от ряда вредных соединений значительно снижается. Это приводит к повышению риска развития различных врожденных заболеваний.

Ген GSTP1 кодирует фермент пи-1 глутатион S-трансферазу, которая содержится в эритроцитах и участвует в метаболизме ксенобиотиков посредством присоединения глутатиона к субстратам. Однонуклеотидные полиморфизмы rs1695 (с. 313 A > G, p.Ile105Val) и rs1138272 (с.341C > T, p.Ala114Val) приводят к заменам аминокислот и снижению активности фермента, что в свою очередь может способствовать накоплению в организме токсичных веществ. За счет этого носители данных полиморфизмов имеют повышенный риск развития различных форм рака. При курении риск развития рака легких и рака ротовой полости значительно увеличивается. Полиморфизм также влияет на предрасположенность к лейкемии и болезни Паркинсона. Так же у них может быть повышена чувствительность к препаратам, используемым для химиотерапии онкологических заболеваний, и склонность к развитию токсических осложнений.

Наследственные формы пороков развития обусловлены мутациями генов, которые участвуют в закладке и формировании органов. К примеру, в основе сегментной структуры позвоночного столба лежит образование сомитов – структур эпителиальных блоков, расположенных по обе стороны эмбриональной средней линии, которые образуются в результате сегментации пресомитной ме-

зодермы. Формирование сомитов регулируется молекулярным осциллятором, часами сегментации. Этот часовый механизм основан на включении (экспрессии) генов, которые работают в течение точного периода, равного времени, которое требуется для образования одной сомитной пары. Многие гены, связанные с Notch, Fgf и Wnt путями: LFNG, HES7, DLL3 и Mesp2 необходимы для формирования соматической границы.

Ген MESP2 (mesoderm posterior 2 homolog) кодирует белок, который участвует в сегментации сомитов (отделении позвонков и ребер друг от друга). Этот белок связывается с определенными областями ДНК и включает гены сигнального пути Notch, который играет решающую роль в развитии позвонков (в частности, в отделении будущих позвонков друг от друга – сегментации сомитов).

DLL3 является геном DSL-семейства лигандов Notch-сигналинга. Продукт гена DLL3 является одним из лигандов Notch-сигнального пути.

В процессе сомитогенеза колебательная (oscillatory) экспрессия гена HES7 регулирует периодическую сегментацию пресоматической мезодермы. Нарушение этого процесса может стать причиной формирования пороков развития мышечной системы, нарушит выстилку вторичных полостей тела, формирование органов кровеносной, выделительной систем, а также скелета.

Ген LFNG (LUNATIC FRINGE) кодирует фукозилтрансферазу, которая модифицирует Notch-рецепторы и изменяет сигнальную активность Notch-пути. Предполагается, что активность гена LFNG зависит от функции гена DLL3.

Ген MESP2 относится к семейству helix-loop-helix (bHLH) белков регуляторов транскрипции. Включает гены сигнального пути Notch. Мутации в гене MESP2 приводят к образованию нефункционального белка, при этом белок NOTCH1 остается высокоактивным, а граница, разделяющая будущие позвонки друг от друга, не образуется. Это приводит к мальформации и слиянию костей позвоночника и ребер, наблюдаемых при спондилолиторакальном дизостозе [3–5].

При проведении статистического анализа частоты встречаемости аллелей полиморфных локусов отмечается достаточно сильное различие в разных популяциях, что может быть «эффектом основателя» либо следствием отбора против одного из аллельных вариантов. Этот вопрос до настоящего времени остается открытым. Однако данные по частотам встречаемости аллелей еще раз показывают, что все перечисленные полиморфные локусы являются маркерами не только врожденной деформации позвоночника, но и маркерами развития соединительной ткани как таковой, что приводит к возникновению множественных пороков развития.

Для каждой локальной популяции характерны свои частоты встречаемости аллелей, и эти частоты могут сильно отличаться от соседних популяций. Мы должны отрабатывать свои генетические особенности, характерные для народа, проживающего в нашем регионе. Такое исследование должно быть развернутым и самостоятельным, так как полученные результаты по отработанной группе заметно отличаются от приводимых данных, касающихся европейских исследований в этом направлении.

Zn, P, Ca, Cu «макроэлементы», концентрация которых в организме превышает 0,01 %. Селен, кадмий, свинец, серебро называют «органогенами» в связи с их ведущей ролью в формировании структуры тканей и органов. Согласно классификации В. И. Федорова, они отнесены к следующим группам: селен – третья, кадмий и свинец – четвертая, серебро – пятая. Объектами исследований могут являться биосубстраты (сыворотка крови) детей с тяжелыми врожденными пороками развития позвоночника, а также и другими врожденными пороками, выявленными в результате проведенного исследования. Они рассматриваются, как наиболее широко используемый наряду с кровью биоматериал для оценки элементного статуса человека.

Свинец, являющийся гемолитическим ядом широкого спектра действия, циркулирует в крови в виде высокодисперсного коллоидального фосфата и альбумината свинца, откладывается преимущественно в костях, затем в печени и почках. Свинец в костном депо может сохраняться многие годы, при нарушении кислотно-основного равновесия может выйти из него в виде легкорастворимого фосфата свинца и снова циркулировать в крови.

Установлено, что содержание этого элемента в сыворотке крови больных детей по сравнению со здоровыми детьми увеличено в 1,5–1,8 раза.

Физиологическая значимость серебра заключается в угнетении медьзависимых ферментов, таких как церулоплазмин, супероксиддисмутаза, дофамин-бета-гидроксилаза, тирозиназа, аминоксидаза и т. д. Серебро является антагонистом меди.

Однако использование статистических параметров средних величин или центильной шкалы могут быть расценены как статистическая характеристика исследованной группы, но не как отражение состояния здоровья. Понятие «нормального значения» содержания того или иного элемента лишь предполагается, однако в настоящее время не существует точной связи определения «нормальности» и здоровья населения.

Для формирования групп риска при интоксикации металлами использовались такие показатели, как биологически допустимый уровень и критический уровень содержания химических элементов в биосредах.

При значительном превышении допустимого уровня по одному из элементов у многих обследованных целесообразно использовать понятие критического уровня, при котором наблюдаются биохимические изменения, связанные с токсическим воздействием металла или дефицитом эссенциального элемента [6, 7].

Цели и задачи: обосновать прогностическое значение молекулярно-генетических и биохимических маркеров в диагностике врожденной патологии.

Материалы и методы

Исследования проведены у 52 пациентов с врожденными деформациями позвоночника. Изучены полиморфизмы генов детоксикации GSTT1, GSTM, GSTP1 (Ile105Val), GSTP1 (Ala114Val). Для определения полиморфизмов генов детоксикации GSTT1, GSTM, GSTP1 (Ile105Val), GSTP1 (Ala114Val) нами был разработан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и выявлены положительные и отрицательные контроли. Для изучения мутаций генов, отвечающих за темпы роста и структуру позвонков и межпозвонковых дисков – генов HOXA11, HOXD13, RUNX2, CHST3, DLL3, MESP2, LFNG, HES7 разработаны праймеры для амплификации и секвенирования кодирующих экзонов этих генов.

Для мутаций генов, отвечающих за темпы роста и структуру позвонков и межпозвонковых дисков – генов HOXA11, HOXD13, RUNX2, CHST3, DLL3, MESP2, LFNG, HES7 разработаны праймеры для амплификации и секвенирования кодирующих экзонов этих генов. Для выделения ядросодержащих клеток периферической крови в качестве исследуемого материала использовали образцы периферической крови пациентов и здоровых доноров. Для этого 10 мл образца периферической крови набирали в пробирку, содержащую калий-ЭДТА в качестве антикоагулянта. Для выделения ядросодержащих клеток и лизиса эритроцитов использовали RCLB (Red Cell Lysis Buffer), клетки затем отмывали PBS (Phosphate buffered saline – натрий-фосфатный буфер) дважды. Для последующего выделения ДНК или хранения клетки переносили в количестве 6 миллионов в эпепендорфы. При необходимости длительного хранения клетки помещали в морозильную камеру на –70 °С.

Одновременно у 52 пациентов изучены микроэлементный состав крови (Zn, P, Ca, Cu), а также содержание Se, Ag, Pb, Cd.

Для измерения содержания тяжелых металлов кадмия и свинца, а также микроэлементов серебра в биосубстратах атомно-абсорбционный спектрометр Agilent 240Z AA с электротермической атомизацией.

Для измерения содержания селена атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой Ultima-2. Общий вид атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно-связанной плазмой Ultima-2 (HoribaJobinYvon, Япония-Франция).

Объектами исследований являлись биосубстраты (сыворотка крови) детей с тяжелыми врожденными повреждениями позвоночника, как наиболее широко используемый наряду с кровью биоматериал для оценки элементного статуса человека. Ввиду ограниченности количества химических элементов, для которых показатели допустимого содержания в биосубстратах разработаны официально, при оценке распространенности дисбаланса химических элементов используются условно допустимые рабочие величины, основан-

ные на данных о верхнем и нижнем пределах физиологического содержания элементов, так называемые «референтные значения».

Определение границы между нормой и патологией при изучении микроэлементного баланса базировалось на изучении не только количественных параметров, но и соотношений элементов.

Обсуждение полученных результатов

Наличие полиморфизмов генов детоксикации было исследовано у 52 пациентов, результаты приведены в таблице 1.

Было также выявлено две мутации в генах HOXA11 и LFNG у двух разных пациентов, которые отвечают за развитие соединительной ткани в целом. У пациентов, встречались полиморфиз-

Таблица 1. Полиморфизмы генов детоксикации

№ пациента	GSTT1	GSTM1	GSTP1 rs1138272	GSTP1 rs1695	№ пациента	GSTT1	GSTM1	GSTP1 rs1138272	GSTP1 rs1695
	«+» – WT/WT; WT/null; «-» – null/null	«+» – WT/WT; WT/null; «-» – null/null				«+» – WT/WT; WT/null; «-» – null/null	«+» – WT/WT; WT/null; «-» – null/null		
1	+	-	WT/WT	WT/MT	27	+	+	WT/WT	WT/WT
2	-	-	WT/WT	WT/WT	28	+	-	WT/WT	WT/WT
3	-	+	WT/WT	WT/WT	29	+	-	WT/MT	WT/MT
4	+	-	WT/WT	WT/MT	30	+	-	WT/MT	WT/MT
5	+	-	WT/WT	WT/MT	31	+	-	WT/WT	WT/MT
6	+	+	WT/WT	WT/WT	32	+	+	WT/WT	WT/WT
7	+	-	WT/MT	WT/MT	33	+	+	WT/WT	WT/WT
8	+	-	WT/WT	WT/WT	34	+	+	WT/WT	WT/MT
9	+	-	WT/WT	WT/WT	35	+	-	WT/MT	MT/MT
10	-	-	WT/WT	WT/WT	36	+	+	WT/MT	WT/MT
11	+	-	WT/MT	WT/MT	37	-	+	WT/WT	WT/MT
12	-	-	WT/WT	WT/WT	38	+	+	WT/WT	WT/MT
13	-	-	WT/WT	WT/MT	39	+	+	WT/WT	WT/WT
14	+	+	WT/MT	WT/MT	40	-	-	WT/WT	WT/WT
15	+	+	WT/WT	WT/WT	41	-	+	WT/WT	WT/WT
16	+	-	WT/WT	WT/WT	42	+	-	WT/WT	WT/WT
17	+	-	WT/WT	WT/WT	43	+	+	WT/WT	WT/MT
18	+	-	WT/WT	WT/WT	44	+	-	WT/WT	WT/MT
19	+	+	WT/WT	WT/WT	45	+	-	WT/WT	WT/WT
20	+	-	WT/MT	WT/MT	46	+	+	WT/MT	WT/WT
21	+	-	WT/MT	WT/MT	47	+	+	WT/WT	WT/MT
22	+	+	WT/WT	WT/WT	48	+	+	WT/WT	MT/MT
23	+	-	WT/MT	WT/MT	49	+	+	WT/MT	WT/MT
24	+	+	WT/WT	WT/MT	50	-	-	WT/WT	WT/MT
25	-	+	WT/WT	WT/WT	51	-	-	WT/WT	WT/WT
26	+	-	WT/WT	WT/WT	52	+	+	WT/MT	WT/MT

Примечание:

для GSTT1 и GSTM1:

«+» – есть нормальный аллель гена в гомо или гетерозиготном состоянии, генотип WT/WT или WT/null, что предполагает наличие белка к клетке;

«-» – ген отсутствует (нулевой аллель в гомозиготном состоянии), генотип null/null, что предполагает отсутствие белка к клетке;

для GSTP1:

«WT/WT» – нормальный аллель гена в гомозиготном состоянии;

«WT/MT» – локус в гетерозиготном состоянии, то есть присутствует нормальный аллель и полиморфизм;

«MT/MT» – полиморфизм в гомозиготном состоянии, мутантный.

мы генов, а также делеции/инсерции, которые не являются патогенными и либо не приводят к замене аминокислоты в белке или являются вариантом нормы, встречающимся в нормальной популяции. В ходе исследования нами было найдено две мутации. Одна из них rs777829525 была выявлена у двух пациентов в гене HОXA11, которая представляет собой делецию одного нуклеотида Т в геноме в позиции chr7:27222462, согласно сборке GRCh37, в кодирующей части (экзоне). Данная мутация приводит к сдвигу рамки считывания и соответственно к замене аминокислоты изолейцина на лейцин (NP_005514.1:p.Ile299Leufs), в популяции встречаемость данной мутации 0 %, поэтому ее можно рассматривать, как патогенную.

Следующая мутация rs759062946 также найдена у двух других пациентов в гене LFNG, представляет собой инсерцию 8 нуклеотидов -/GGACAGAT, находится в экзоне в позиции chr7:2552882–2552890, приводит к сдвигу рамки считывания, частота встречаемости в популяции 0 %, поэтому данная замена должна рассматриваться, как патогенная.

Было выявлено 27 случаев отсутствия гена детоксикации GSTM1, и 11 случаев отсутствия гена GSTT1, что соответствовало 52,9 % и 21,2 % изученной группы пациентов. В 2 случаях среди 29 проведенных секвенирований по генам, отвечающим за развитие позвонков и, в целом, за развитие соединительной ткани были выявлены патологические мутации, что составило 6,9 %. Среди 29 пациентов отсутствие гена детоксикации GSTM1 в 7 случаях (24,1 %). Патологические мутации не выявлялись.

Для оценки воздействия имеющихся концентраций биоэлементов на организм имеет значение выявление, в первую очередь, количественных отклонений: избытка токсичных элементов; дефицита или избытка эссенциальных макро- и микроэлементов.

Элементы первой группы содержатся в сыворотке крови в наибольшем количестве – 80–3335 мг/л, второй группы – в диапазоне 0,5–40 мг/л.

Для элементов, отнесенных в третью группу, четкие нормативы их содержания в сыворотке крови отсутствуют. Приводятся данные различных авторов о границах физиологических значений содержания селена в сыворотке крови, где нижняя граница нормы здорового человека составляет от 46 до 110 мкг/л, верхняя – от 143 до 150 мкг/л. По данным института питания РАМН за норму принято содержание селена 115–120,0 мкг/л.

Нормативы элементов, отнесенных к четвертой группе, среди которых свинец и кадмий, являются условными и составляют 0,04–0,5 мкг/л. Так, приведенные данные по содержанию свинца

в сыворотке значительно различаются и оказываются выше установленных норм.

Содержание элементов, отнесенных к пятой группе, в сыворотке крови должно находиться в пределах 0,005–0,05 мкг/л.

Средний уровень серебра – элемента пятой группы, в плазме крови составляет 0,4–1,2 мкг/л.

За «условную норму» содержания свинца в сыворотке крови приняты значения, мг/л: 0,02–0,12; кадмия – 0,001–0,0054 (при определении методом ЭТТАС); 0,0001–0,002 (при определении методом АЭС-ИСП).

Микроэлементный состав крови пациентов отображен в таблице 2.

В результате анализа полученных данных установлено, что диапазоны значений содержания микроэлементов в сыворотке крови детей с прогрессирующими врожденными деформациями позвоночника составили мкг/л: для свинца – 0,001–246,460; для кадмия – 0,001–3,387; для серебра – 0,001–165,786; для селена – 0,001–52,26 с медианами соответственно 0,001; 0,001; 3,819 и 14,650.

Содержание селена в сыворотке крови детей было значительно ниже «условной» нормы, при этом даже максимальное значение (52,26 мкг/л) не достигло нижней границы референсного диапазона. Кроме того, в 19 % представленных образцов сыворотки крови детей с костной патологией не было обнаружено присутствие селена при чувствительности используемого метода.

Исследованием содержания серебра в биосубстратах детей с прогрессирующими врожденными деформациями позвоночника установлено, что в 53,8 % случаев при чувствительности данного метода этот микроэлемент не был обнаружен, в остальных образцах был выше «условной» нормы.

Концентрация кадмия в сыворотке крови детей не выходила за границы «условной» нормы. Следует отметить, что в 59,6 % образцов присутствие кадмия не обнаруживалось при чувствительности данного метода.

Анализ содержания свинца в сыворотке крови детей с костной патологией показал, что в 32,7 % образцов содержание этого элемента превышает «условную» норму в 2 раза, в 34,6 % свинец не был обнаружен при чувствительности используемого метода.

Анализ содержания цинка в сыворотке крови детей с костной патологией показал, что в 25,4 % образцов содержание этого элемента превышало «условную» норму, фосфора – в 42,3 %, Са – в 28,84 %. По показателям меди данная группа пациентов находилась в пределах средних значений.

Таким образом, в результате анализа оценки содержания исследуемых микроэлементов в сыворотке крови детей с прогрессирующими вро-

Таблица. 2. Микроэлементный состав крови у пациентов с врожденными деформациями позвоночника

№ п/п	Pb, мкг/л	Cd, мкг/л	Ag, мкг/л	Se, мкг/л	Zn, ммоль/л	P, ммоль/л	Ca, ммоль/л	Cu, мкг/л
1	24,609	1,877	1,481	14,370	16,30	1,65	3,33	15,00
2	4,378	2,473	1,006	17,170	18,70	1,21	6,10	11,00
3	0,000	0,000	1,016	10,110	13,57	1,76	1,66	15,00
4	36,503	0,282	1,275	8,830	11,76	1,66	1,64	17,00
5	0,000	0,242	0,967	4,560	15,80	1,83	4,02	14,00
6	0,000	0,129	1,997	7,500	11,12	1,52	1,70	6,00
7	0,000	0,000	2,837	8,100	16,03	1,65	3,33	15,00
8	14,370	0,810	165,786	0,000	11,76	1,66	2,73	15,00
9	0,000	0,096	1,389	0,000	11,75	1,19	1,48	13,00
10	0,000	0,104	5,165	0,000	15,00	1,69	3,69	18,00
11	0,000	0,000	0,000	19,970	16,11	1,12	3,09	13,00
12	0,000	0,000	0,590	12,260	11,19	1,34	2,50	16,00
13	0,000	0,000	51,203	0,000	17,18	1,79	4,51	19,00
14	0,000	0,196	0,000	0,000	15,52	1,79	2,93	11,00
15	0,000	0,000	0,000	2,820	18,30	1,31	3,88	12,00
16	0,000	0,092	0,111	0,000	15,32	1,76	2,06	11,00
17	3,378	0,000	0,000	19,540	13,50	1,57	1,86	11,00
18	0,000	0,000	0,216	21,110	24,63	1,50	7,46	22,00
19	0,000	0,000	0,000	0,000	39,21	1,86	9,97	16,00
20	0,000	0,125	0,000	26,690	12,58	1,01	1,52	10,00
21	0,515	0,000	14,277	49,49	14,70	1,95	2,13	15,00
22	0,000	0,000	4,391	25,66	14,86	1,77	1,87	13,00
23	0,000	0,000	2,223	20,24	12,39	1,85	2,19	12,39
24	25,699	0,000	0,935	10,15	12,18	1,39	2,19	14,00
25	55,150	0,000	24,108	25,9	19,58	1,84	6,17	13,00
26	55,688	0,000	1,238	33,01	10,08	1,76	2,52	18,00
27	74,957	0,000	49,067	26,79	12,71	1,25	2,32	15,00
28	29,704	0,000	0,348	20,3	13,04	1,63	1,75	13,00
29	8,399	0,000	0,000	44,8	11,87	1,39	1,70	10,00
30	54,821	0,000	0,000	39,39	10,36	1,05	2,29	8,00
31	75,200	0,000	0,000	31,16	18,08	1,34	4,01	16,00
32	41,961	0,000	0,000	31,75	10,73	1,71	2,58	11,00
33	56,268	0,000	0,000	14,04	10,67	1,60	2,54	16,00
34	28,125	0,000	0,000	14,93	17,99	1,63	2,58	17,99
35	246,46	0,000	0,000	11,15	9,44	1,62	2,52	13,00
36	151,330	0,000	0,000	4,58	11,55	1,70	2,65	17,00
37	91,772	0,000	0,000	14,16	12,11	1,80	2,73	11,00
38	0,000	0,000	0,000	15,77	10,56	1,31	2,00	12,00
39	108,411	0,000	0,000	48,58	10,64	1,71	2,56	16,00
40	127,335	0,000	0,000	15,83	9,60	1,62	2,43	11,00
41	143,792	2,704	6,238	0,000	17,33	1,69	2,63	18,00
42	9,284	0,000	0,000	35,38	32,97	1,99	2,59	18,00
43	6,650	0,064	3,412	52,26	36,52	2,22	2,55	22,00
44	4,260	0,222	0,000	37,57	11,23	1,75	2,56	13,00
45	1,160	0,053	0,000	0,000	26,02	2,13	2,72	12,00
46	11,440	2,97	0,000	0,000	17,78	1,85	2,52	19,00
47	60,800	3,387	0,000	26,52	12,50	1,25	3,04	10,00
48	2,410	0,000	0,000	14,01	21,58	1,32	2,18	10,00
49	1,310	0,000	0,000	22,36	17,01	1,37	2,18	11,45
50	3,170	0,335	0,000	13,78	21,23	1,50	3,26	14,00
51	0,730	0,000	0,000	9,41	23,11	1,07	2,14	12,14
52	0,800	0,205	0,000	20,28	11,36	1,12	2,16	7,00

денными деформациями позвоночника по сравнению с «условной» нормой было установлено, что концентрация кадмия соответствует, селена – ниже, а свинца в 33 % случаев – выше нормы, вместе с тем в 19–60 % образцов присутствие данных элементов не обнаружено при чувствительности используемых методов. В исследованной группе пациентов в 44,2 % случаев порок развития позвоночника требовал срочного оперативного вмешательства. В исследуемой группе пациентов в 86,4 % отмечалось повышенное содержание фосфора в крови, а также повышенное содержание свинца в 42,6 %. Было также обнаружено отсутствие селена у 67,4 % изученных случаев. Пациенты, находящиеся на консервативном лечении, имели показатели, находящиеся в области медианы по кадмию, фосфору и свинцу.

При проведенных секвенированиях по генам, отвечающим за развитие позвонков и, в целом, за развитие соединительной ткани были выявлены 2 патологические мутации, а также в этих же случаях было обнаружено отсутствие генов детоксикации GSTM1, GSTT1 и GSTP1 (Ile105Val), в этих случаях также было обнаружено, что содержание свинца и фосфора в сыворотке крови резко превышает «условную» норму, а селен (при чувствительности метода) не обнаруживался. В обоих случаях при рождении детей была выявлена тяжелая врожденная патология, заключающаяся в наличии множественных пороков развития, относящихся к развитию костно-суставной системы, сердечно-сосудистой системы, а также пороков развития кишечника, обнаруженных при рождении и далее подтверждены при проведении патологоанатомического вскрытия.

Выводы:

1. Наличие мутаций генов, отвечающих за развитие соединительной ткани как таковой, может повлечь за собой наличие множественной врожденной патологии, не совместимой с жизнью.
2. Наиболее опасными являются варианты, имеющие корреляцию с повышением референсных значений тяжелых металлов, таких как свинец и фосфор при отсутствии генов детоксикации.
3. Проведение исследований с использованием определения молекулярно-генетических и биохимических маркеров в диагностике врожденной патологии является перспективным направлением, так как может быть использовано для поиска врожденной патологии, наряду с лучевыми методами исследований.

Литература

1. Кузнецов, С. Б., Михайловский М. В. Анализ генетических маркеров и обоснование их использования в определении предрасположенности к идиопатическому сколиозу (обзор литературы) // Международный

журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – Т. 10, № 4, – С. 554–561.

2. Кузнецов, С. В. Генетические маркеры идиопатического и врожденного сколиозов и диагноз предрасположенности к заболеванию: обзор литературы / С. В. Кузнецов, М. В. Михайловский, М. А. Садовой, А. В. Корель, Е. В. Мамонова // Хирургия позвоночника. – 2015. – Т. 12, № 1. – С. 27–35.

3. Gregor, M. C. Common polymorphisms in human lysyl oxidase genes are not associated with the adolescent idiopathic scoliosis phenotype / M. C. Gurnett, C. A. Dobbs [et al.] // BMC Med Genet. – 2011. – Vol. 12, № 2. – P. 1186–1191.

4. Miller, N. H. Linkage analysis of genetic loci for kyphoscoliosis on chromosomes 5p13, 13q13.3 and 13q32 / N. H. Miller, B. C. Marosy, C. M. Justice [et al.] // Am J Med Genet A. – 2006. – № 1. – P. 1059–1068.

5. Miller, N. H. Genetic analysis of structural elastic fiber and collagen genes in familial adolescent idiopathic scoliosis / N. H. Miller, B. Mims, A. Child [et al.] // J Orthop Res. – 1996. – № 14. – P. 994–999.

6. Рябых, С. О. Варианты сегментарной спинальной дизгенезии: обзор литературы и собственный опыт лечения / С. О. Рябых, О. М. Павлова, В. С. Климов // Гений ортопедии. – 2017. – Т. 23, № 2. – С. 220–226.

7. Бейзель, Н. Ф. Атомно-абсорбционная спектрометрия: учеб. пособие. – Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2008.

References

1. Kuznecov, S. B., Mihajlovskij M. V. Analiz geneti-cheskih markerov i obosnovanie ih ispol'zovaniya v opredelenii predispolozhennosti k idiopaticeskomu skoliozu (obzor literatury) // Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij. – 2016. – Т. 10, № 4. – С. 554–561.

2. Kuznecov, S. V. Geneticheskie markery idiopaticeskogo i vrozhdennogo skoliozov i diagnoz predispolozhennosti k zabolevaniyu: obzor literatury / S. V. Kuznecov, M. V. Mihajlovskij, M. A. Sadovoj, A. V. Korel', E. V. Mamonova // Hirurgiya pozvonocnika. – 2015. – Т. 12, № 1. – С. 27–35.

3. Gregor, M. C. Common polymorphisms in human lysyl oxidase genes are not associated with the adolescent idiopathic scoliosis phenotype / M. C. Gurnett, C. A. Dobbs [et al.] // BMC Med Genet. – 2011. – Vol. 12, № 2. – P. 1186–1191.

4. Miller, N. H. Linkage analysis of genetic loci for kyphoscoliosis on chromosomes 5p13, 13q13.3 and 13q32 / N. H. Miller, B. C. Marosy, C. M. Justice [et al.] // Am J Med Genet A. – 2006. – № 1. – P. 1059–1068.

5. Miller, N. H. Genetic analysis of structural elastic fiber and collagen genes in familial adolescent idiopathic scoliosis / N. H. Miller, B. Mims, A. Child [et al.] // J Orthop Res. – 1996. – № 14. – P. 994–999.

6. Ryabyh, S. O. Varianty segmentarnoj spinal'noj dizgenezii: obzor literatury i sobstvennyj opyt lecheniya / С. О. Ryabyh, О. М. Pavlova, V. S. Klimov // Genij ortopedii. – 2017. – Т. 23, № 2. – С. 220–226.

7. Bejzel', N. F. Atomno-absorbcionnaya spektrometriya: Uchebnoe posobie. – Novosibirsk: Novosib. gos. un-t, 2008.

Поступила 06.09.2024 г.