

**Таблица 1.** Распределение аллелей и генотипов гена *clock* у здоровых и больных ССЗ людей в зависимости от пола

	Аллели		Генотипы		
	T	C	TT	TC	CC
Здоровые люди (n=171)	0.71	0.29	0.51	0.40	0.09
Больные ССЗ люди (n=209)	0.66	0.34	0.39	0.54	0.07
Критерий $\chi^2$	1.23 (p>0.05)		7.24* (p<0.05)		
Женщины здоровые (n=116)	0.69	0.31	0.48	0.41	0.11
Женщины больные (n=106)	0.73	0.27	0.50	0.46	0.04
Критерий $\chi^2$	0.56 (p>0.05)		4.45 (p>0.05)		
Мужчины здоровые (n=55)	0.77	0.23	0.58	0.38	0.04
Мужчины больные (n=103)	0.59	0.41	0.28	0.61	0.11
Критерий $\chi^2$	5.43 (p<0.05)		14.10* (p<0.05)		

**Выводы.** Таким образом, в исследованной нами популяции обнаружена ассоциация полиморфизма 3111TC 3'-нетранслируемой области гена *clock* с риском развития ССЗ. Нами обнаружено неравное распределение частот генотипов T3111C полиморфизма гена *clock* у больных и здоровых людей и показано, что у мужчин носителей генотипа CC повышен риск развития кардиоваскулярных расстройств.

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА ЦИТОХРОМА P-450 CYP1A1 У БОЛЬНЫХ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМИ АЛЛЕРГОДЕРМАТОЗАМИ С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕАКЦИИ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

Коляскина М.М., Кузьмина Л.П., Миронов К.О., Дедков В.Г., Дунаева Е.А., Шипулин Г.А.

НИИ медицины труда РАМН, Москва; ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

В публикациях ВОЗ по концепции оценки риска влияния на здоровье факторов окружающей и производственной среды широко обсуждается проблема выявления и использования показателей индивидуальной чувствительности (биомаркеры восприимчивости), пока-



зателей воздействия на организм (биомаркеры экспозиции) и показателей выявления эффектов воздействия (биомаркеры эффекта).

Профессиональные и зависимые от экологических факторов заболевания относят к болезням, предрасположенность к которым определяется сочетанием наследственных и внешних факторов. При этом, даже при одном и том же заболевании, относительное значение наследственности и среды у разных лиц может быть неодинаковым, влияя на возможность возникновения и сроки развития, клиническое течение и симптоматику, исход заболевания.

Данные многочисленных исследований, выполненных в России и за рубежом, позволяют утверждать, что одним из основных биохимических процессов, определяющих индивидуальный ответ организма на воздействие ксенобиотиков, в том числе и лекарственных веществ, является биотрансформация с преимущественным участием многочисленного семейства цитохромов P-450, ферментов конъюгации и транспортных белков.

Изоферменты цитохрома P-450 делят на детоксицирующие и активирующие. Одним из наиболее ярких представителей изоферментов цитохрома P-450 в печени человека, активирующих ксенобиотики, согласно современной классификации, является цитохром P-450 IA1. Подсемейство цитохрома IA принимает участие, главным образом, в активации до канцерогенных, мутагенных и токсических эффектов самых разнообразных ксенобиотиков. По современным представлениям, химические вещества, воздействующие на организм, в результате метаболической активации образуют продукты, способные взаимодействовать с биологическими макромолекулами и образовывать с ними комплексы-неоантигены, вызывая, таким образом, иммунотоксические реакции. Установлено, что 3-25 % токсических эффектов составляют анафилактические, астматические реакции, развитие дерматитов, гепатитов и нефритов.

Выявление мутации и установление взаимосвязей между индивидуальными мутациями является актуальной проблемой, имеющей существенное прикладное значение, так как выяснение клинического фенотипа, более или менее специфичного для конкретной генной мутации, дает возможность не только доклинической диагностики болезни, но и прогнозирования ее дальнейшего течения и соответственно – рационального планирования профилактических и лечебных мероприятий.

**Цель исследования:** разработать метод определения полиморфизмов гена цитохрома CYP1A1 с помощью реакции пиросеквенирования у больных профессиональными аллергодерматозами для оценки индивидуального риска их развития и прогноза клинического течения.

Объектом исследования явились 80 (59 женщины и 21 мужчины) больных профессиональными аллергодерматозами (профессиональный аллергический дерматит, профессиональная экзема). Все обследованные подвергались воздействию веществ раздражающего и сенсибилизирующего действия, а также металлов-аллергенов (хром, никель, кобальт).

Для определения генетического полиморфизма гена CYP1A1 совместно с лабораторией постгеномных технологий НИИ МТ РАМН (зав. лабораторией постгеномных технологий, академик РАМН В.В.Покровский) был разработан новый метод определения замены в нуклеотидной последовательности гена CYP1A1. Ген CYP1A1 расположен в 15-й паре хромосом, локусе 15q22-q24. Был определен характер полиморфизма (\*2C) замена аденазина на гуанин в положении в положении 4889 (A4889G) в промоторном участке гена CYP1A1 (с использованием базы данных NCBI). При экспрессии синтезируется белок, в котором в 462 положении изолейцин заменен на валин, отличающийся высокой индуцибельностью ПАУ. Встречается почти у 7% представителей европеоидной расы и рассматривается как фактор риска возникновения рака легких. Среди жителей Москвы она составляет 5,66%.

Определение генетических особенностей осуществляется с помощью различных молекулярно-генетических подходов. Традиционно используются методы, основанные на полиморфизме длин рестрикционных фрагментов, а также лигазная реакция, гетеродуплексный анализ, анализ полиморфизма одноцепочечных фрагментов и другие методы с электрофоретической детекцией ПЦР-фрагментов. Нашли свое применение методы аллель-специфичной ПЦР и ПЦР с терминацией синтеза, основанные на электрофоретической или флуоресцентной детекции ампликона. Метод прямого секвенирования по Сенгеру, основанный на терминации синтеза цепи ДНК, имеет существенное преимущество перед вышеописанными, заключающееся в однозначности полученных данных, поскольку позволяет получить в качестве результата непосредственно нуклеотидную последовательность исследуемого фрагмента ДНК. Данное свойство позволило методу секвенирования по Сенгеру стать «золотым стандартом» в молекулярно-генетических исследованиях, а также доминирующим среди использующихся в настоящее время.

Метод пиросеквенирования обладает преимуществами прямого секвенирования нуклеотидной последовательности, а также дополнительными характеристиками, обеспечивающими данный подход уникальным в практическом применении перед используемыми в настоящее время. Используемый в основе метода принцип пиросеквенирующего

синтеза обеспечивает надежность и точность полученных результатов, высокую пропускную способность, максимальную автоматизированность процесса, быстроту проведения анализа. Пиросеквенирование является новым поколением методик секвенирования, нашедшее свое применение, как в фундаментальных исследованиях, так и в диагностических целях. В качестве результата определяется генотип по исследуемому аллельному варианту, что заметно упрощает интерпретацию результатов по сравнению с методом прямого секвенирования, требующего специального программного обеспечения и опыта оператора. Высокая точность и однозначность полученных результатов, по сравнению с другими широко используемыми в молекулярно-биологической практике методами, наряду с высокой пропускной способностью и простотой в обращении делает пиросеквенирующий синтез идеальным для молекулярно-диагностического использования.

Используемый метод позволяет проанализировать большой объем клинического материала, не теряя при этом точности результатов. К тому же метод основывается на секвенировании, получение нуклеотидной последовательности, являющегося «золотым стандартом» в области молекулярной генетики. Метод не требует применения электрофоретической детекции продуктов амплификации, широко использующийся в молекулярной диагностике.

Принцип метода детекции генетических полиморфизмов с помощью методики пиросеквенирования: при последовательном добавлении к ДНК-полимеразному комплексу дезоксинуклеозидтрифосфатов их включение в синтезируемую нить зависит от нуклеотидной последовательности матрицы. Полимеразный синтез ДНК сопровождается выделением пирофосфата. Этот пирофосфат в присутствии сульфурилазы и аденозифосфосульфата преобразуется с АТФ и запускает окисление люциферина люциферазой, сопровождающееся билюминисценцией. Люминесценция регистрируется цифровой камерой прибора.

При анализе результатов распределения частоты полиморфного варианта гена  $CYP1A1*2C$  у 26% обследованных лиц обнаружен гетерозиготный генотип (A/G). Анализ особенностей клинического течения профаллергодерматозов в зависимости от генотипа  $CYP1A1$ , выявил у 52% лиц с наличием гетерозиготный генотип (A/G)  $CYP1A1*2C$  формирование заболевания при небольшом (до 5 лет) стаже работы в условиях воздействия вредных производственных факторов. У лиц, имеющих гетерозиготный генотип (A/G)  $CYP1A1*2C$  наблюдали более тяжелое течение (распространенные формы экземы и дерматита). Полученные результаты могут быть использованы как критерии

риска развития и прогноза клинического течения профессиональных аллергических заболеваний кожи.

## **ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ВАРФАРИНОМ ПАЦИЕНТОВ ЗАПАДНО–СИБИРСКОГО РЕГИОНА**

**Кох Н.В., Лифшиц Г.И., Цветовская Г.А., Новикова Я.В., Воронина Е.Н., Филипенко М.Л.**

*ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия*

**Введение.** Терапия Варфарином снижает вероятность рецидива венозного тромбоза на 90–95%, инсульта – на 68%; после пересадки механических клапанов уменьшает возникновение системных тромбозов на 75% (Козлова Т.В., 2008). Лечение больных с фибрилляцией предсердий варфарином может предотвратить около 40000 инсультов в год и сохранить 600 миллионов долларов (Gage V.F., 1996). Прием этого лекарства связан с возможностью развития различных осложнений, в первую очередь малых и больших кровотечений, а также с отсутствием эффекта от проводимого лечения, несмотря на повышение дозы препарата. Потенциально опасным для возникновения кровотечения считается уровень МНО более 4,0.

Варфарин метаболизируется в печени. Основными белками-ферментами, участвующими в процессе метаболизма варфарина, являются печеночные цитохромы системы P450 (CYP). Варфарин представляет собой рацемическую смесь двух изомеров, при этом терапевтическая активность S-варфарина намного выше. Основным катализатором метаболизма является цитохром CYP2C9: Изменение в его активности может значительно влиять на чувствительность пациента к лечению варфарином. В гене CYP2C9 известны однонуклеотидные замены (SNP), из которых две наиболее значимы. Аллель CYP2C9\*2 гена CYP2C9 представляет собой замену аминокислоты аргинина в положении 144 полипептидной цепи на цистеин (R144C), аллель CYP2C9\*3 – замену аминокислоты изолейцина на лейцин в положении 359 белка (I359L) (Daly AK, 2003). Оба полиморфных варианта характеризуются относительным снижением активности CYP2C9. Аллель CYP2C9\*1 является аллелем дикого типа, продуцирующий фермент с нормальной ферментативной активностью.

Точкой приложения варфарина является витамин-K-эпоксидредуктазный комплекс (VKORC), блокируя который, препарат осу-