© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2002

УДК 616.379-008.64-092:612.6.05]-07

В. В. Носиков, Ю. А. Серегин, Е. В. Титович, К. В. Савостьянов, Л. И. Зильберман, Д. А. Чистяков, Т. Л. Кураева, И. И. Дедов

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ, СЦЕПЛЕННЫХ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ТИПА 1¹

Государственный научный центр РФ "ГосНИИгенетика" (дир. — член-корр РАН В. Г. Дебабов), Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Для картирования областей сцепления с сахарным диабетом (СД) типа 1 обследовали 2 группы семей русских жителей Москвы и Самары с конкордантными (33 семьи) и дискордантными (65 семей) парами сибсов. Для анализа сцепления с СД типа 1 гена *CTLA4*, кодирующего один из поверхностных антигенов Т-лимфоцитов и расположенного в локусе *IDDM12* (2q32.1-q33), использовали полиморфный микросателлит (АТ)n в 3'-нетранслируемой области этого гена и полиморфный мононуклеотидный полиморфизм в положении 49 экзона 1 (А49G). Для обоих полиморфных маркеров показано сильное сцепление с СД типа 1. Таким образом, можно сделать вывод о том, что данная область хромосомы 2, содержащая локус *IDDM12*, сильно сцеплена с СД типа 1 в русской популяции. При анализе сцепления нескольких групп полиморфных маркеров, расположенных в локусах *IDDM8* (6q25-q27), *IDDM9* (3q21-q25) и *IDDM10* (10p12.2), для некоторых из использованных маркеров показано сильное сцепление с СД типа 1, что позволяет сделать вывод о том, что данные локусы сцеплены с СД типа 1 в русской популяции. При комплексном анализе ассоциации и сцепления с СД типа 1 ряда полиморфных маркеров, расположенных в хромосомной области 11p13, с использованием групп случай/контроль и 2 групп семей обнаружен новый локус сцепления с СД типа 1, расположенный около гена каталазы (*CAT*), для которого предложено обозначение *IDDM16*.

Two groups of Russian families in Moscow and Samara with concordant (33 families) and discordant sibs pairs (65 families) were examined for mapping type 1 diabetes mellitus (DM1) coupling domains. Polymorphic microsatellite (AT)n in the 3'-nontranslated domain of gene *CTLA4*, coding for one of T lymphocyte surface antigens and situated in locus *IDDM12* (2q32.1-q33), and polymorphic mononucleotide polymorphism in exon 1 position 49 (A49G) were used for analysis of this gene coupling with DM1. Strong coupling with DM1 was shown for both polymorphic markers. We therefore conclude that this region of chromosome 2, containing locus *IDDM12*, is strongly coupled with DM1 and in the Russian population. Analysis of coupling of several groups of polymorphic markers located in locuses *IDDM8* (6q25-q27), *IDDM9* (3q21-q25), and *IDDM10* (10p12.2) showed strong coupling of some of the markers with DM1, which means that these locuses are coupled with DM1 and in the Russian population. Complex analysis of association and coupling of polymorphic markers located in 11p13 chromosomal region with DM1, using the accident/control groups and 2 groups of families, showed a new locus of coupling with DM1, located near the catalase gene (*CAT*), which is suggested to be denoted as *IDDM16*.

Сахарный диабет (СД) типа 1 — одно из наиболее серьезных эндокринных заболеваний человека. Для него характерно прогрессирующее разрушение β-клеток поджелудочной железы, ответственных за синтез инсулина в организме человека. СД типа 1 относится к полигенным, многофакторным заболеваниям. В отличие от моногенных синдромов, сочетающихся с различными нарушениями углеводного обмена, при аутоиммунном СД типа 1 причина заболевания лежит не в мутациях отдельных генов. Генетическая предрасположенность к СД типа 1 связана с наследованием определенных аллелей обычных "здоровых" генов. Иногда эти аллели, которые определяют предрасположенность к СД типа 1 и сцеплены с заболеванием, называют этиологическими мутациями или вариантами.

Большинство этиологических вариантов широко распространены в популяциях, но наличие у индивида какой-либо этиологической мутации само по себе не приводит к развитию СД типа 1. Только наличие определенной комбинации этиологических вариантов в генах, предрасполагающих к заболеванию, потенциально может приводить к физиологическим нарушениям, находящим свое вы-

ражение в развитии СД типа 1. Однако даже такая наследственная отягощенность сама по себе недостаточна для развития СД типа 1. У генетически предрасположенных индивидов СД типа 1 развивается только вследствие взаимодействия между не изученными до конца генетическими факторами и совсем не известными факторами внешней среды.

В настоящее время для выявления локусов, содержащих гены, предрасполагающие к СД типа 1, используется подход, основанный на анализе наследования аллелей полиморфных маркеров в ядерных семьях с двумя сибсами, больными СД типа 1 (семьи с конкордантными сибсами). Несмотря на трудности при подборе семей, несколько групп исследователей провели изучение сцепления большого числа полиморфных локусов генома человека с СД типа 1. Дополняющий подход основан на использовании полных семей с дискордантными сибсами.

В первой работе по полному геномному поиску, направленной на выявление локусов, предрасполагающих к развитию СД типа 1, использовали коллекцию из 96 ядерных семей (Великобритания) и панель из 290 высокополиморфных микросателлитных маркеров, более или менее равномерно расположенных на всех хромосомах человека. Это исследование позволило обнаружить в геноме человека 18 локусов возможной предрасположенности к СД типа 1 на разных хромосомах [5]. Парал-

¹ Данное исследование финансировалось Федеральной программой РФ "Сахарный диабет" и подпрограммой "Геном человека" Государственной научно-технической программы РФ

лельно был проведен еще один геномный поиск, при котором удалось найти область сцепления с СД типа 1 на хромосоме 11 [6].

Несколько позже с использованием большего количества семей было проведено еще 2 полных геномных поиска "второго поколения" [4, 9] и 1 частичный поиск [7], что позволило уточнить положение ряда ранее обнаруженных локусов и выявить дополнительные локусы сцепления с СД типа 1. Данные обо всех потенциальных локусах предрасположенности к СД типа 1 суммированы в табл. 1. Часть из потенциальных локусов сцепления с СД типа 1 была обнаружена только с использованием подхода ген-кандидат. К ним относятся локус IDDM18 (ген IL12B) и гены CD4 и NOS2.

Целью настоящего исследования было изучение сцепления с СД типа 1 ряда полиморфных маркеров, расположенных в локусах IDDM8, IDDM9, IDDM10 и IDDM12 с использованием семей с конкордантными и дискордантными парами sibсов из русской популяции. Эти локусы были выбраны потому, что именно для этих локусов было показано сильное сцепление с СД типа 1 в семьях из популяций Великобритании и США [4, 5, 9]. Кроме того, нами проведено изучение сцепления области хромосомы 11p13 рядом с геном каталазы (CAT) с СД типа 1, для которой ранее была показана ассоциация с СД типа 1 с использованием подхода, основанного на сравнении частот аллелей в группах здоровых индивидов и пациентов с СД типа 1 [2].

Материалы и методы

Пациенты. Обследовали 2 группы ядерных семей русских жителей Москвы и Самары с конкордантными (33 семьи) и дискордантными (65 семей) парами sibсов.

Выделение ДНК и идентификация аллелей полиморфных маркеров. Геномную ДНК выделяли из крови пациентов методом экстракции фенолом и хлороформом после инкубации образцов крови с протеиназой К в 0,1% растворе SDS [8]. Термостабильная ДНК-полимераза Taq получена от фирмы "Ферментас" (Вильнюс, Литва), протеиназа К — от фирмы "Merck" (Германия). Синтез использованных в работе олигонуклеотидных праймеров выполнен ЗАО "Синтол" (Москва).

Последовательности праймеров рассчитывали с использованием программы "Олиго" на основании известных нуклеотидных последовательностей. ДНК амплифицировали методом ПЦР на термоциклерах РНС-2 ("Technie", Великобритания) и "Терцик" (Россия) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей буфер 1, 0,2 мМ каждого dNTP, по 10 пмоль каждого из праймеров, 100—200 нг геномной ДНК и 1,0 ед. ДНК-полимеразы Taq. Буфер 1 содержал 67 мМ трис-НСl (рН 8,8), 16,6 мМ сульфата аммония и 0,1% твин-20. Концентрация хлорида магния зависела от амплифицируемого локуса. В реакционную смесь вносили ДМСО в конечной концентрации 10%.

На начальной стадии ПЦР денатурировали ДНК при 94°C в течение 3 мин, на конечной — проводили синтез второй цепи при 72°C в течение 7 мин. В промежутке между данными стадиями

Таблица 1

Значения λ_c и MLS, полученные на европейских семьях из Великобритании, для локусов, определяющих генетическую предрасположенность к СД типа 1 [5, 9]

Локус	Ген-кандидат	Хромосомная локализация	λ_c	MLS
IDDM1	MHC	6q21,3	2,60	34
IDDM2	INS	11p15,5	1,29	2,8
IDDM3	—	15q26	—	2,5 ^a
IDDM4	LRP5	11q13	1,07	2,5
IDDM5	—	6q25	1,15	4,5 ^a
IDDM6	DCC	18q	1,10	3,2
IDDM7	—	2q31	1,13	1,5
IDDM8	—	6q27	1,17	3,4 ^a
IDDM9	—	3q21—25	1,26	2,4
IDDM10	—	10p11,2	1,56	4,7
IDDM11	—	14q24—q31	—	4,0 ^a
IDDM12	CTLA4	2q33	1,61	3,4 ^a
IDDM13	—	2q33	1,60	3,3 ^a
IDDM15	TNDM	6q21	1,34	4,2 ^a
IDDM17	AIRE1	21q22,3	—	—
IDDM18	IL12B	5q31—q33	—	—
DXS1068	—	Xp11,4—p21,1	—	—
GCK	GCK	7p	—	—
NOS2	NOS2	17q11,2	—	—
CD4	CD4	12p12-pter	—	—

Примечание. а — значения MLS получены другими группами исследователей [4, 6—7]. λ_c — уровень семейной ассоциации с СД типа 1 (degree of familial clustering of type 1 diabetes mellitus). Для европейских популяций суммарное значение λ_c для всех локусов, определяющих предрасположенность к СД типа 1, равно 15.

осуществляли 25—35 циклов ПЦР в зависимости от маркера и количества исходной ДНК по трехступенчатой программе, включающей в себя денатурацию ДНК (94°C/1 мин), отжиг праймеров в течение 1 мин и синтез второй цепи (72°C/1 мин).

Статистический анализ. Анализ наследования аллелей полиморфных маркеров в конкордантных и дискордантных семьях проводили с использованием объединенного теста TDT (Transmission Disequilibrium Test) [11] и S-TDT (Sib Transmission Disequilibrium Test) [12].

Результаты и их обсуждение

Для картирования областей сцепления с СД типа 1 обследовали 2 группы семей русских жителей Москвы и Самары, с конкордантными (33 семьи) и дискордантными (65 семей) парами sibсов. Анализ сцепления с СД типа 1 в русской популяции был проведен на 5 районах хромосом 2, 3, 6, 10 и 11.

При анализе сцепления области 2q33 с СД типа 1 использовали два полиморфных маркера. Один из них представляет собой микросателлит (AT)_n, который расположен в 3'-нетранслируемой области гена CTLA4 [10]. Другой полиморфный маркер расположен внутри кодирующей области гена CTLA4 и представляет собой мононуклеотидный полиморфизм в положении 49 экзона 1 (A49G), которому соответствует аминокислотный полиморфизм Thr17Ala, расположенный в лидерном пептиде антигена CTLA-4 [10]. В настоящее время ген

Таблица 2

Значения MLS и Z', полученные с использованием конкордантных и дискордантных семей и 2 полиморфных маркеров гена CTLA4, расположенного в локусе IDDM12 на хромосоме 2q33

Поли-морфный маркер	Тип полиморфизма	Число аллелей	Конкордантные семьи	Дискордантные семьи		
				MLS	χ^2	Z'
Ala17Thr (AT)n	SNP	2	4,11	15,68	4,07	< 0,0001
	STR	17	3,84	15,70	3,96	< 0,0001

CTLA4, кодирующий один из поверхностных антигенов цитотоксических Т-лимфоцитов, является одним из наиболее вероятных генов-кандидатов, определяющих предрасположенность к СД типа 1.

Обследование как конкордантных, так и дискордантных семей позволило установить, что оба полиморфных маркера гена CTLA4 сцеплены с СД типа 1 в русской популяции (табл. 2). Величины MLS, рассчитанные с использованием конкордантных семей, достигают значений 4,11 в случае маркера Thr17Ala и 3,84 в случае полиморфного микросателлита, а величины Z', рассчитанные с использованием дискордантных семей, составляют 4,07 и 3,98 соответственно, что позволяет сделать вывод о том, что данная область хромосомы 2, содержащая локус IDDM12 и ген CTLA4, определяет предрасположенность к СД типа 1 и в русской популяции.

При анализе сцепления локуса IDDM9 с СД типа 1 использовали 2 полиморфных микросателлита D3S1769 и D3S4015. Данный локус расположен на хромосоме 3 (3q21-q25), и величины MLS и Z', рассчитанные с использованием обеих групп семей, приведены в табл. 3. Эти значения находятся в интервале 1,73-2,19, что позволяет сделать вывод о том, что оба маркера сцеплены с СД типа 1 в русской популяции.

При анализе сцепления с СД типа 1 локуса IDDM8, расположенного на хромосоме 6 (6q25-q27), использовали 2 полиморфных маркера: микросателлит D6S503 и мононуклеотидный полиморфизм C1183T в гене SOD2, который кодирует супероксиддисмутазу митохондрий, зависящую от ионов Mn²⁺. Полиморфизму C1183T соответствует аминокислотный полиморфизм: остатки аланина или валина в положении 9 сигнального пептида — Ala(-9)Val [3]. Величины MLS и Z', рассчитанные с использованием обеих групп семей для этих маркеров, приведены в табл. 4. Для 1 из 2 использованных маркеров (Ala(-9)Val) обнаружено сцепление с СД типа 1.

Таблица 3

Значения MLS и Z', полученные с использованием конкордантных и дискордантных семей и двух полиморфных маркеров, расположенных в локусе IDDM9 на хромосоме 3q21-25

Поли-морфный маркер	Тип полиморфизма	Число аллелей	Конкордантные семьи	Дискордантные семьи		
				MLS	χ^2	Z'
D3S1769	STR	7	1,73	4,36	2,06	0,02
D3S4015	STR	6	1,91	4,91	2,19	0,01

Таблица 4

Значения MLS и Z', полученные с использованием конкордантных и дискордантных семей и 3 полиморфных маркеров, расположенных в локусе IDDM8 на хромосоме 6q25-q27

Поли-морфный маркер	Тип полиморфизма	Число аллелей	Конкордантные семьи	Дискордантные семьи		
				MLS	χ^2	Z'
Ala(-9)Val	SNP	2	2,06	8,70	2,25	0,003
D6S503	STR	4	0,81	3,00	0,93	NS

Для анализа сцепления с СД типа 1 локуса IDDM10, расположенного на хромосоме 10 (10p12.2), использовали 4 полиморфных микросателлита, обозначения которых, а также величины MLS и Z', рассчитанные с использованием обеих групп семей для всех этих маркеров, приведены в табл. 5. Выявленное сцепление было показано для 2 полиморфных маркеров (D10S1243 и D10S2326), расположенных в данной области хромосомы 10.

Для проверки предположения о том, что ген CAT может быть ассоциирован с развитием диабетической нефропатии (ДН) при СД типа 1, нами были разработаны полиморфные микросателлиты D11S907 и D11S2008, расположенные рядом с этим геном [1, 2]. Однако при анализе ассоциации этих полиморфных микросателлитов с ДН при СД типа 1 с использованием групп случай/контроль мы обнаружили ассоциацию этих полиморфных маркеров не с ДН, а с собственно СД типа 1. В связи с этим нами был разработан полиморфный мононуклеотидный маркер C1167T, расположенный внутри кодирующей последовательности гена CAT, анализ ассоциации которого подтвердил, что данная область хромосомы 11 ассоциирована с СД типа 1 [2].

Для проверки полученных данных мы использовали полиморфные микросателлиты D11S2008, D11S1392 и D11S1977, расположенные рядом с геном CAT, и маркер C1167T внутри этого гена, а также коллекцию конкордантных и дискордантных семей (табл. 6). Анализ полученных данных показал, что из 4 использованных маркеров 3 полиморфных маркера выражено сцеплены с СД типа 1 в русской популяции (см. табл. 6). Наибольшие величины MLS и Z' получены в случае маркера D11S2008 и составляют 4,93 и 5,62 соответственно, что позволяет сделать вывод о сильном сцеплении данной области хромосомы 11p13, расположенной рядом с геном CAT, с СД типа 1 в русской популяции.

Таблица 5

Значения MLS и Z' полученные с использованием конкордантных и дискордантных семей и 4 полиморфных маркеров, расположенных в локусе IDDM10 на хромосоме 10p11.2

Поли-морфный маркер	Тип полиморфизма	Число аллелей	Конкордантные семьи	Дискордантные семьи		
				MLS	χ^2	Z'
D10S1243	STR	15	3,20	15,12	3,83	<0,0001
D10S507	STR	6	1,06	2,44	1,49	NS
D10S2326	STR	12	1,62	5,40	2,07	0,02
D10S1426	STR	7	0,97	2,69	1,49	NS

Таблица 6

Значения MLS и Z' , полученные с использованием конкордантных и дискордантных семей и 4 полиморфных маркеров, расположенных рядом с геном CAT и внутри него, на хромосоме 11p13

Поли-морфный маркер	Тип полиморфизма	Число аллелей	Конкордантные семьи		Дискордантные семьи		
			MLS	χ^2	Z'	p	
C1167T	SNP	2	3,50	11,95	3,37	<0,0001	
D11S1392	STR	6	3,71	16,13	4,02	<0,0001	
D11S1977	STR	5	0,93	3,00	1,44	NS	
D11S2008	STR	5	4,93	31,1	5,62	<0,0001	

лляции. На основании полученных в данном исследовании данных можно сделать вывод о том, что нами обнаружен новый локус сцепления с СД типа 1, для которого предложено обозначение IDDM16.

Выводы

1. Проведено картирование областей сцепления с СД типа 1 на хромосомах 2, 3, 6, 10 и 11 с использованием 2 групп семей, собранных среди русских жителей Москвы и Самары, с конкордантными (33 семьи) и дискордантными (65 семей) парами сиблингов.

2. Обнаружено, что в русской популяции Москвы и Самары полиморфные маркеры, расположенные в локусах IDDM8, IDDM9, IDDM10 и IDDM12, сцеплены с СД типа 1.

3. На хромосоме 11p13 обнаружено сильное сцепление 3 полиморфных маркеров, расположенных рядом с геном CAT , с СД типа 1, что расценивается как новый локус сцепления с СД типа 1, для второго предложено обозначение IDDM16.

ЛИТЕРАТУРА

1. Туракулов Р. И., Чистяков Д. А., Чугунова Л. А. и др. // Пробл. эндокринолог. — 1999. — Vol. 45, № 5. — P. 13—17.
2. Чистяков Д. А., Савостьянов К. В., Титович Е. В. и др. // Сборник отчетов за 2000 год подпрограммы "Геном человека". — М., 2001. — С. 137—138.
3. Chistyakov D. A., Savost'yanov K. V., Zotova E. V., Nosikov V. V. // BMC Medical Genetics. — 2001. — Vol. 2, N 4. — P.
4. Concannon P., Gogolin-Ewens K. J., Hinds D. A. et al. // Nature Genet. — 1998. — Vol. 19. — P. 292—296.
5. Davies J. L., Kawaguchi Y., Bennett S. T. et al. // Nature. — 1994. — Vol. 371. — P. 130—136.
6. Hashimoto L., Habita C., Beresli J. P. et al. // Ibid. — P. 161—164.
7. Luo D. F., Buzzetti R., Rotter J. I. et al. // Hum. Mol. Genet. — 1996. — Vol. 5. — P. 693—698.
8. Mathew C. G. P. // Methods of Molecular Biology / Ed. J. Totowa; New Jersey, 1984. Vol. 2. — P. 31—34.
9. Mein C. A., Esposito L., Dunn M. G. et al. // Nature Genet. — 1998. — Vol. 19. — P. 297—300.
10. Nistico L., Buzzetti R., Pritchard L. E. et al. // Hum. Mol. Genet. — 1996. — Vol. 5. — P. 1075—1080.
11. Spielman R. S., McGinnis R. E., Ewens W. J. // Am. J. Hum. Genet. — 1993. — Vol. 53. — P. 506—516.
12. Spielman R. S., Ewens W. J. // Ibid. — 1998. — Vol. 62. — P. 450—558.

Поступила 15.10.01

© С. В. ЯЙЦЕВ, В. А. ПРИВАЛОВ, 2002

УДК 616.441-006.6-036.22(470.55)

С. В. Яйцев, В. А. Привалов

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Кафедра общей хирургии (зав. — проф. В. А. Привалов) Челябинской государственной медицинской академии

Рак щитовидной железы (РЩЖ) является самой распространенной злокачественной опухолью эндокринных желез. Существенное влияние на онкологическую заболеваемость оказывает радиационный фактор. Целью настоящего исследования явилось изучение распространенности РЩЖ в Челябинской области и выявление факторов риска в зависимости от географии проживания, эндемичности зоба, радиационного фактора, уровня техногенного загрязнения.

Проведен анализ частоты рака за 30-летний период (3761 случай); осуществлены скрининговые обследования 18 620 человек, проживающих в различных регионах Челябинской области. Изучен опыт хирургического лечения 19 465 больных с заболеваниями щитовидной железы.

Проведенные комплексные многофакторные обследования жителей Челябинской области выявили значительный рост числа больных как среди взрослого населения, так и среди детей. Уровень заболеваемости в области превышает общероссийские показатели и не имеет тенденции к снижению.

Риск заболеть РЩЖ выше у жителей крупных индустриальных городов; у облученных в детстве ^{131}I , у лиц женского пола, при наличии "рисковых" иммуногенетических маркеров.

Thyroid cancer is the most prevalent malignant tumor of endocrine glands. Radiation is an important factor affecting cancer incidence. We evaluated the prevalence of thyroid cancer in the Chelyabinsk region and detected the risk factors depending on the place of residence, endemic goiter, radiation exposure, and level of technogenic pollution.

The incidence of cancer was analyzed for 30 years (3761 cases). A total of 18620 residents of various parts of the Chelyabinsk region were screened. Experience gained in surgical treatment of 19465 patients with thyroid diseases is summed up.

Complex multifactorial examinations of residents of the Chelyabinsk region showed a notable increase in the disease incidence both among adults and children. The morbidity in the region is higher than in Russia in general and has no trend to decrease.

The risk of thyroid cancer is higher for residents of large industrial cities, in subjects with a history of exposure to ^{131}I in childhood, in females, and in subjects with the immunogenetic markers of disease risk.

В большинстве стран мира заболеваемость раком щитовидной железы (РЩЖ) ежегодно возрастает на 4% [3] и, несмотря на разработку современных методов диагностики и лечения, внедрение

новых технологий, эффективность борьбы со злокачественными новообразованиями остается недостаточной. Изучение распространенности заболеваний щитовидной железы (ЩЖ) в последнее