

На правах рукописи

МАНДЕЛЬШТАМ
Михаил Юрьевич

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОНОГЕННЫХ
ФОРМ АТЕРОСКЛЕРОЗА И РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
У ЖИТЕЛЕЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА**

03.00.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург
2005

Работа выполнена в Отделе молекулярной генетики ГУ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Научные консультанты:

член-корреспондент РАМН,
профессор, доктор медицинских наук
Владимир Соломонович Гайцхоки

доктор медицинских наук
Вадим Борисович Васильев

Официальные оппоненты:

член-корреспондент РАМН,
профессор, доктор медицинских наук
Владислав Сергеевич Баранов

доктор биологических наук, профессор
Андрей Петрович Перевозчиков

доктор биологических наук
Владимир Иванович Евтушенко

Ведущая организация

ГУ Научно-исследовательский
институт медицинской генетики
Томского научного центра СО РАМН

Защита состоится 22 декабря 2005 г. в 11
часов на заседании диссертационного совета Д.001.022.03 при ГУ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН по адресу: 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, д. 12.

Автореферат разослан "25" октября 2005 г.
Ученый секретарь

диссертационного совета Д.001.022.03
доктор биологических наук, профессор



Л. В. Пучкова

2006-4
18086

2190763₁

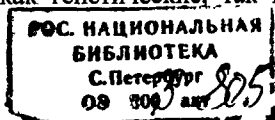
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Сердечно-сосудистые и онкологические заболевания являются ведущей причиной смертности в развитых странах мира, в том числе и в России. По статистике, приведенной в "Государственном докладе о состоянии здоровья населения Российской Федерации в 2002 году" (доклад опубликован в 2004 году), в стране за двенадцать месяцев от сердечно-сосудистых заболеваний умерло 1,3 миллиона человек, из них – 47,2% или более 600 тысяч человек от ишемической болезни сердца (ИБС). В соответствии с тем же официальным документом, рак молочной железы регистрировался как самая часто встречающаяся онкопатология у женщин. В 2002 году по стране в целом заболеваемость раком молочной железы составила 39,2 случая на 100 тысяч женщин. В абсолютном значении приведенная цифра означает, что за год появилось более 30 тысяч пациенток с этой формой злокачественных новообразований. Имеется устойчивая тенденция к росту распространенности ИБС и рака молочной железы в стране из года в год и к снижению возраста, в котором проявляются эти заболевания.

В Санкт-Петербурге отмечается один из самых высоких в России уровней заболеваемости как сердечно-сосудистыми, так и онкологическими заболеваниями (Государственный доклад, 2004). Распространенность сердечно-сосудистых заболеваний в городе в 1,6 раза выше, чем в целом по стране. Санкт-Петербург является "неблагополучным" районом России также и в отношении собственно рака молочной железы. В России максимальные показатели заболеваемости раком молочной железы (43,2 на 100 тыс. населения) и смертности от него (20,3 на 100 тыс. человек) зарегистрированы именно в Северо-Западном регионе (Аксель, Двойрин, 1992; Бармина, Трапезников, 1997; Трапезников, Аксель, 1997).

Сердечно-сосудистая и онкологическая патологии в целом относятся к мультифакториальным заболеваниям, в генезе которых имеют значение как наследственный компонент, так и факторы среды. Однако ряд достаточно широко распространенных форм этих заболеваний может быть объяснен преимущественно дефектами в одном гене. К таким формам относятся семейная гиперхолестеринемия (СГ), вызванная мутациями в гене рецептора липопротеинов низкой плотности (ЛНП), и семейные формы рака молочной железы, обусловленные дефектами в гене *BRCA1*. Эти формы рассматриваются в диссертации как моногенные по причине наличия ведущего генетического фактора риска развития ИБС у пациентов с СГ или рака у носителей мутаций гена *BRCA1*. Модифицирующее влияние на риск развития и тяжесть проявления этих заболеваний оказывают другие факторы, как генетические, так и средовые. Тем не



менее, эти патологии, характеризующиеся ранней манифестацией и тяжелым течением, наследуются как аутосомно-доминантные признаки (Пузырев, 2003). Дисфункция рецептора ЛНП при СГ вследствие мутаций в одноименном гене приводит к снижению скорости удаления липопротеинов из кровотока, развитию атеросклероза и существенному повышению риска ИБС. Наследуемые дефекты в гене опухолевого супрессора *BRCA1* многократно увеличивают вероятность инактивации его второго аллеля в клетках молочной железы из-за соматических мутаций или гиперметилирования, что ведет к нарушению репарации ДНК и канцерогенезу. Знание мутаций, вызывающих заболевания, позволяет оценить их роль для структуры и функции белков и осуществлять ДНК-диагностику обсуждаемых патологий.

СГ среди людей белой расы встречается с частотой 1 случай на 500 обследованных (Goldstein et al., 2001). Более чем у 80% мужчин с этим наследственным недугом в возрасте до 60 лет развивается инфаркт миокарда (Slack, 1969). Еще более существенно, что СГ повышает в 100 раз риск гибели от ИБС мужчин в возрасте между 20 и 39 годами (Scientific Steering Committee, 1991).

По разным оценкам одна женщина из 800 является носителем мутации в гене *BRCA1* (Antonioni et al., 2000; Баранов и др., 2000). Вероятность развития рака молочной железы или яичника у женщин, имеющих наследуемые мутации гена *BRCA1*, достигает более 80% в течение их жизни (King et al., 2003). При этом у них в возрасте до 50 лет заболеваемость данной онкопатологией оказывается в 8-10 раз выше, чем в общей популяции (Struwing et al., 1997).

Представляется актуальным изучение мутаций в гене рецептора ЛНП и в гене *BRCA1*, поскольку они приводят к рано проявляющимся, тяжелым и одновременно с этим часто встречающимся формам сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Особенно важно то, что раннее выявление носителей мутаций как в гене рецептора ЛНП, так и в гене *BRCA1* обеспечивает своевременное начало лечения пациентов с наследственными заболеваниями и существенно продлевает им жизнь. Спектры мутаций обсуждаемых локусов сильно различаются между отдельными странами и этническими группами. Этим обусловлена необходимость провести отдельное исследование гена рецептора ЛНП и гена *BRCA1* в российской популяции.

Цель исследования:

На основе данных о спектре мутаций гена рецептора ЛНП у больных СГ и гена *BRCA1* у больных раком молочной железы в Санкт-Петербурге разработать подходы к ДНК-диагностике социально значимых моногенных форм атеросклероза и рака молочной железы.

Задачи работы:

1. Изучить спектр мутаций гена рецептора ЛНП у больных СГ и спектр мутаций гена *BRCA1* у больных семейными формами рака молочной железы из числа жителей Санкт-Петербурга;
2. Определить наличие преобладающих и повторно встречающихся мутаций в гене рецептора ЛНП и в гене *BRCA1*;
3. Провести сравнение спектра мутаций в гене рецептора ЛНП и в гене *BRCA1* у жителей Санкт-Петербурга и стран Европы;
4. На основании экспериментальных и литературных данных обосновать роль обнаруженных мутаций в генах рецептора ЛНП и *BRCA1* для развития гиперхолестеринемии и рака молочной железы.
5. Оценить частоту встречаемости мутации R3500Q в гене *APOB*, вызывающей первичную гиперхолестеринемию, у пациентов с СГ – жителей Санкт-Петербурга;
6. Разработать быстрые и эффективные методы идентификации обнаруженных мутаций для диагностики в семьях пробандов и дальнейшего проведения скрининговых исследований.

Научная новизна результатов.

В результате исследования впервые в России охарактеризовано 33 мутации гена рецептора ЛНП, из которых 18 были обнаружены впервые в мире. Продемонстрирована большая вариабельность гена рецептора ЛНП и практически полное отсутствие эффекта основателя применительно к мутациям этого гена в популяции Санкт-Петербурга, за исключением субпопуляции евреев-ашкенази. Показано, что мутация R3500Q в гене *APOB* не представлена у больных первичной гиперхолестеринемией из Санкт-Петербурга. У пациентов с семейными формами рака молочной железы в Санкт-Петербурге идентифицировано 8 мутаций в гене *BRCA1*, из них 6 – являются новыми для России, а одна была ранее не известна в мире. Показано наличие преобладающей мутации 5382insC в гене *BRCA1* в Российской популяции, что существенно облегчает ДНК-диагностику заболевания. При сравнении спектров мутаций гена рецептора ЛНП и гена *BRCA1* в Санкт-Петербурге, в России и в странах Европы сделаны обобщения, которые могут иметь значение при изучении мутационных спектров новых локусов, ответственных за моногенные патологии.

Научно-практическое значение работы.

Определен спектр мутаций гена рецептора ЛНП и гена *BRCA1* в ранее не изучавшейся популяции Санкт-Петербурга, что представляет интерес для сравнительной популяционной генетики. Показано, что в отношении спектра мутаций гена рецептора ЛНП российская популяция занимает свое, достаточно обособленное место среди других изученных популяций. В то же время продемонстрировано, что у онкологических

больных Санкт-Петербурга преобладают широко распространенные в Европе мутации гена *BRCA1*. На основании оригинальных экспериментальных данных сделано теоретически важное обобщение, что в пределах одной популяции эффект основателя может быть выражен применительно к одним генам и отсутствовать применительно к другим. Обосновано, что из числа 33 идентифицированных мутаций гена рецептора ЛНП 30 могут вести к развитию СГ, а из числа 8 мутаций гена *BRCA1* - 7 являются вероятной причиной развития рака молочной железы. Разработаны быстрые методы обнаружения охарактеризованных мутаций гена рецептора ЛНП и гена *BRCA1*, которые могут быть внедрены в практическое здравоохранение. Непосредственно осуществлена ДНК-диагностика СГ в семьях 41 пробанда, включая 69 кровных родственников, а также в семьях 11 пробандов с мутациями в гене *BRCA1*. Показано отсутствие вклада мутаций гена *APOB* в развитие первичных гиперхолестеринемий в Санкт-Петербурге. Выявлена наиболее распространенная мутация гена *BRCA1* 5382insC, тестирование которой в первую очередь должно быть рекомендовано родственникам больных с семейными формами рака молочной железы или яичника.

Положения, выносимые на защиту:

1. Спектр мутаций гена рецептора ЛНП у больных СГ Санкт-Петербурга существенно отличается от такового в сопредельных странах Европы и в других регионах России.

2. В популяции Санкт-Петербурга отсутствуют мажорные мутации гена рецептора ЛНП. Исключение составляет субпопуляция евреев-ашкенази, в которой распространена мажорная мутация G197del.

3. Среди мутаций гена *BRCA1*, идентифицированных у Санкт-Петербургских пациентов с раком молочной железы и семейной историей заболевания, преимущественно встречаются варианты последовательности, уже известные в странах Восточной Европы.

4. Мажорной мутацией в гене *BRCA1* в Санкт-Петербурге, и, по-видимому, во всей России в силу эффекта основателя или других причин является инсерция 5382insC.

5. Абсолютное большинство идентифицированных мутаций гена рецептора ЛНП и гена *BRCA1* является причиной семейной гиперхолестеринемии и семейной предрасположенности к раку молочной железы соответственно.

6. Мутация R3500Q гена *APOB*, являющаяся частой причиной первичной гиперхолестеринемии в Европе, крайне редко встречается или отсутствует в Санкт-Петербурге.

7. Учитывая характер преобладающих мутаций в гене *BRCA1* (инсерции и делеции), можно рекомендовать гетеродуплексный анализ для их эффективного выявления и обнаружения новых мутаций. Для поиска

мутаций в гене рецептора ЛНП из-за преобладания в нем нуклеотидных замен предпочтительно применение других методов.

Личный вклад автора.

Автором создана коллекция ДНК больных СГ и семейными формами рака молочной железы, лично проведены все опыты по клонированию мутантных аллелей в плазмидных векторах, выполнено большинство опытов по первичной идентификации мутаций и секвенированию ДНК, осуществлен анализ наследования мутаций в семьях пробандов. Часть работы проделана совместно с Ф. М. Захаровой, Ю. А. Татищевой, Н. А. Грудининой и В. И. Голубковым. Несколько опытов по секвенированию ДНК произведено Х. Шакиром и С. П. Шевцовым в лаборатории профессора Е. И. Шварца (Санкт-Петербургский Институт ядерной физики РАН), что оговорено в соответствующих местах текста. Сотрудниками лаборатории профессора Е. И. Шварца также определены генотипы локуса *APOE* у пациентов с мутацией deltaG197. Отбор пациентов для исследования гена рецептора ЛНП выполнен профессором Б. М. Липовецким (НИИЭМ АМН СССР, Институт мозга РАН) и профессором В. О. Константиновым (НИИЭМ РАМН), а для исследования гена *BRCA1* – осуществлен врачом-генетиком Т. В. Брежневой (НИИ онкологии имени профессора Н. Н. Петрова). При создании автором Интернет-ресурса по СГ и раку молочной железы на сайте ГУ НИИЭМ РАМН компьютерный дизайн обеспечила А. А. Дзенiskeвич (Научная библиотека ГУ НИИЭМ РАМН).

Апробация работы.

Результаты работы докладывались на 36 международных, всероссийских и региональных конференциях и опубликованы в 50 тезисах материалов конференций. Из числа важнейших форумов, на которых были представлены материалы диссертации, следует назвать: Первый /третий/ Российский съезд медицинских генетиков, Москва (14 – 16 декабря 1994 г.), Симпозиум, посвященный 110-летию со дня рождения академика Н. Н. Аничкова, Санкт-Петербург (21 – 23 ноября 1995 г.), 66-th European Atherosclerosis Society Congress, Флоренция, Италия (13 – 17 июля 1996 г.), Региональное научное совещание “Генофонд населения Санкт-Петербурга и прогнозирование его динамики”, Санкт-Петербург (3 – 4 декабря 1996 г.), Второй съезд Биохимического общества Российской Академии Наук, Москва (19 – 23 мая 1997 г.), Международный симпозиум “Protein Structure, Stability and Folding. Fundamental and Medical Aspects”, Москва (22 – 26 июня 1998 г.), Международную конференцию “Рецепция и внутриклеточная сигнализация”, Пущино (21 – 25 сентября 1998 г.), Восьмую научно-практическую конференцию врачей “Актуальные вопросы современной медицины”, Новосибирск (1998 г.),

II Международный семинар РФФИ “Результаты фундаментальных исследований в медицине и биотехнологии для инвестиций” Москва (1 – 3 декабря 1998 г.), 71-st Congress of the European Atherosclerosis Society, Афины, Греция (26 – 29 мая 1999 г.), Международный научный форум “Онкология на рубеже XXI века. Возможности и перспективы”, Москва (19 – 22 октября 1999 г.), 1-ую Всероссийскую конференцию по проблемам атеросклероза, посвященную 100-летию со дня рождения А. Л. Мясникова, Москва (8 – 9 июня 1999 г.), Юбилейную научно-практическую конференцию, посвященную 10-летию Государственного Новосибирского областного диагностического центра и 30-летию Медико-генетической службы Новосибирской области, Новосибирск (1999 г.), II съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, Санкт-Петербург (1 – 5 февраля 2000 г.), Второй (четвертый) Российский съезд медицинских генетиков, Курск (17 – 19 мая 2000 г.), Симпозиум “Экспериментальные и клинические проблемы атеросклероза”, Москва (1 июня 2000 г.), Итоговую конференцию “Геном человека – 2000”, Черногловка (18 – 21 декабря 2000 г.), Научную конференцию, посвященную 110-летию Института экспериментальной медицины “Актуальные проблемы фундаментальных исследований в области биологии и медицины”, Санкт-Петербург (18 – 20 декабря 2000 г.), V Всероссийскую научно-практическую конференцию “Современные методы диагностики заболеваний сердечно-сосудистой системы”, Новосибирск (28 – 29 мая 2001 г.), VI Международную конференцию РФФИ “Результаты фундаментальных исследований для инвестиций”, Пущино (12 – 14 сентября 2001 г.), Научно-практический симпозиум “Технологии генодиагностики в практическом здравоохранении” в рамках Международной конференции “Геномика, протеомика и биоинформатика для медицины”, Москва (20 – 21 июня 2002 г.), Третий съезд биохимического общества, Санкт-Петербург (20 июня – 1 июля 2002 г.), Всероссийскую научно-практическую конференцию “Современные достижения клинической генетики”, Москва (25 – 27 ноября 2003 г.), Третий съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров “Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития”, Москва (6 – 12 июня 2004 г.), V съезд Российского общества медицинских генетиков, Уфа (24 – 27 мая 2005 г.), Российскую конференцию по фундаментальной онкологии “Петровские чтения – 2005”, Санкт-Петербург (15 апреля 2005 г.), I Российско-американскую конференцию “Биотехнология и онкология”, Санкт-Петербург (29 – 31 мая 2005 г.).

В более полном виде материалы диссертации были заслушаны на научных семинарах Института экспериментальной медицины РАМН (Санкт-Петербург), Института медицинской генетики ТНЦ РАН (Томск), Российского кардиологического научно-производственного комплекса РАМН (Москва), Тартусского университета (Эстония).

По теме диссертации, помимо тезисов конференций, опубликовано 22 статьи. Из числа 22 статей четыре опубликованы в зарубежных рецензируемых журналах, 18 – в отечественных, преимущественно реферируемых, журналах и сборниках. Из числа опубликованных статей 15 (четыре зарубежных и 11 в изданиях, выпускаемых в Российской Федерации) напечатаны в журналах, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 241 странице машинописного текста, содержит 37 таблиц и 37 рисунков. Диссертация содержит разделы “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы исследования”, “Результаты”, “Обсуждение результатов”, “Заключение” и “Выводы”. Список литературы включает 301 источник, из них 40 работ на русском языке, 261 – на иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы.

Пациенты. Пациентов вовлекали в исследование после получения информированного согласия (informed consent) на его проведение. Формирование группы пробандов с семейной гиперхолестеринемией осуществлено профессором Б. М. Липовецким (Институт мозга РАН) и профессором В. О. Константиновым (ГУ НИИЭМ РАМН). Отбор пациентов с первичным раком молочной железы и семейной историей заболевания проведен врачом-генетиком НИИ онкологии имени Н. Н. Петрова МЗ РФ Т. В. Брежневой.

Критерии для постановки клинического диагноза СГ были следующими: 1) у пациента обнаружена гиперлипидемия типа IIa или IIb, характеризующаяся повышенным уровнем общего холестерина и холестерина ЛНП; 2) у нескольких членов семьи пробанда отмечена гиперхолестеринемия или зарегистрированы инфаркты миокарда в раннем возрасте; 3) у больного присутствовали ксантомы сухожилий и/или липоидные дуги роговицы. Лишь пациенты, удовлетворяющие двум или всем трем из перечисленных критериев, отбирались для исследования.

Онкологические пациенты с первичным раком молочной железы, послужившие источником ДНК для данной работы, преимущественно имели семейную историю заболевания. Критерии принадлежности пробандов к родословным с семейной историей предусматривали наличие случаев рака молочной железы и/или рака яичника, по крайней мере, у двух родственников пробанда со степенью родства не менее 25% (мать, дочь, бабушка, родные сестры). Поскольку не во всех случаях имелись надежные указания на место первичной локализации опухоли у родственников пробандов, дополнительным критерием для отбора в группу исследуемых служили свидетельства о возникновении онкопатологии

специфической локализации (молочная железа, яичник) в возрасте до 50 лет.

Пациенты, не удовлетворявшие сформулированным критериям принадлежности к группе СГ или не имевшие выраженной семейной истории рака молочной железы, рассматривались как пациенты с гиперлипидемией (но не с СГ) или со спорадическими случаями рака соответственно. Эти пациенты служили в исследовании контрольной группой для определения характера найденных изменений в ДНК и идентификации ДНК полиморфизмов.

Общая численность пробандов с надежно установленным клиническим диагнозом СГ составила 74 человека, а с семейными формами рака молочной железы – 43 пациентки.

Всех пациентов интервьюировали для сбора семейного анамнеза, а также, по возможности, для выяснения этнической принадлежности. В частности, пациентов опрашивали на предмет принадлежности к группе евреев-ашкенази. Необходимость данного опроса диктовалась высокой частотой специфических мутаций гена рецептора ЛНП и гена *BRCA1* именно в этой этнической группе. После обнаружения мутаций у пробандов, исследование на наличие генетических дефектов предлагали пройти и их родственникам. Определение уровня холестерина, триглицеридов и холестерина ЛВП осуществляли сотрудники отдела биохимии НИИЭМ РАМН (зав. – профессор А. Д. Денисенко) на аппарате “Техникон-АА2”.

Экспериментальные методы. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической венозной крови пациентов. Для удаления белков из препаратов применяли протеиназу К и фенольные экстракции (Kunkel et al., 1977; Bell et al., 1981). Для амплификации всех экзонов гена рецептора ЛНП использовали традиционный набор праймеров (Hobbs et al., 1992), а для поиска мутаций в гене *BRCA1* – набор олигонуклеотидов, синтезированных на основе последовательностей, опубликованных в статье Л. Фридман и соавторов (Friedman et al., 1994). Для детекции мутации R3500Q (с.10658 G>A; CGG>CAG) в гене *APOB* был использован метод сайт-направленного мутагенеза, создающего искусственно в процессе ПЦР сайт для эндонуклазы рестрикции *Msp I* в случае нормального, но не мутантного аллеля (Hansen et al., 1991). Образцы амплифицированной ДНК изучали на наличие мутаций с помощью модификации SSCP-анализа (Markoff et al., 1997) в 8-10% полиакриламидном геле в зависимости от размера ампликона с окрашиванием однонитевых конформеров серебром. В ряде случаев использовали автоматизированный флуоресцентный SSCP-анализ, выполненный на секвенаторе ДНК. Идентификацию часто встречающихся мутаций 5382insC и 185delAG в гене *BRCA1* проводили путем сравнения

подвижности гетеродуплексов в изучаемых пробах с контрольными образцами ДНК, полученными от доктора Эфрата Леви-Лахада (Dr. Ephrat Levy-Lahad) (Иерусалим, Израиль). Процедуры молекулярного клонирования амплифицированных фрагментов ДНК в плазмидных векторах выполняли в основном как описано в широко известном лабораторном руководстве (Sambrook et al., 1989). Для изоляции мутантных аллелей применяли набор "ТАКЛОН" фирмы "Медиген" (Новосибирск), содержащий линейаризованную плазмиду для прямого лигирования ПЦР-продуктов. Идентификацию мутаций осуществляли с помощью секвенирования ДНК по методу Сэнгера (Sanger et al., 1977). На разных стадиях исследования применяли ручное и автоматическое секвенирование. Ручное секвенирование ДНК выполняли на аппарате "Macrophor" (LKB-Pharmacia), а автоматическое – преимущественно на секвенаторе ALFExpress II (Amersham Biosciences). В некоторых случаях последовательность нуклеотидов ДНК устанавливали с помощью прибора DNA Sequencer 377 (ABI 377) фирмы Applied Biosystems. Новые мутации секвенировали по двум нитям ДНК. Все обнаруженные варианты последовательности, приводящие к изменению рестрикционной карты, подтверждали рестрикционным анализом. Этот же метод наряду с гетеродуплексным анализом был применен для определения мутаций у родственников пробандов.

Для расчета положения сайтов рестрикции применяли программу "PC GENE". Статистическая обработка полученных результатов выполнена с использованием программного пакета (SPSS, 11.0.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение мутаций в гене рецептора ЛНП.

При исследовании 74 пробандов с клиническим диагнозом СГ в гене рецептора ЛНП было идентифицировано 33 мутации (Табл. 1) и 8 часто встречающихся вариантов последовательности, рассматриваемых как полиморфизмы ДНК (Табл. 2). Пример идентификации мутации в гене рецептора ЛНП с помощью ручного секвенирования гетерозиготного образца ДНК приведен на Рис. 1, а один из анализов наследования мутации в семье пробанда, проведенный с помощью рестрикционного теста, показан на Рис. 2.

Из числа обнаруженных мутаций 18 были новыми, не известными из других изученных популяций мира (Табл. 1). Двадцать три мутации оказались нуклеотидными заменами, в том числе 13 приводили к замене аминокислотного остатка в рецепторе ЛНП, то есть представляли собой миссенс-мутации. Две нуклеотидные замены изменяли консенсусные

Таблица 1. Характеристика мутаций гена рецептора ЛНП у жителей Санкт-Петербурга.

Название мутации	Изменение в ДНК	Локализация	Быстрый метод тестирования	Число семей (пациентов) с мутацией
Q12X	c.97 C>T	экзон 2	Новый сайт <i>Mae I</i>	1 (2)
C74X	c.285 C>A	экзон 3	Новый сайт <i>Dde I</i>	1(1)
delta5kb*	Делеция	экзоны 3-5	Саузерн-блот	1(2)
IVS3+1G>A	c.313+1G>A	интрон 3	SSCP-анализ	2(3)
347delGCC*	c. 347-349del	экзон 4А	Гетеродуплексы	1(1)
C127W*#	c. 444 T>G	экзон 4А	Новый сайт <i>Mva I</i>	1(1)
G128G, A130P*	c.451 G>C	экзон 4А	Утрата сайта <i>Cac 8 I</i>	1(1)
C139G*	c. 478 T>G	экзон 4А	Новый сайт <i>Msp I</i>	2(5)
C146R*	c. 499 T>C	экзон 4А	Новый сайт <i>Apa I</i>	1(3)
C188Y*	c. 626 G>A	экзон 4В	Новый сайт <i>Rsa I</i>	1(3)
dG197	c.651-653del	экзон 4В	Гетеродуплексы	2 (2)
G197del	c. 652-654del	экзон 4В	Гетеродуплексы	7(14)
FsK202: S206X*	c.670-671insG	экзон 4В	Гетеродуплексы	1 (2)
E207X	c.682 G>T	экзон 4В	Новый сайт <i>Mae I</i>	1(2)
H229H*	c. 750 C>T	экзон 5	Утрата сайта <i>Nco I</i>	1(1)
C249X*	c. 810 C>A	экзон 5	Новый сайт <i>Dde I</i>	1(1)
FsE287: V348X	c.925-931del7	экзон 6	Гетеродуплексы	1(1)
FsE291: N309X*	c.936-940del5	экзон 6	Гетеродуплексы	1 (1)
C308Y	c.985 G>A	экзон 7	Новый сайт <i>Fbl I</i>	2(2)
L380H	c.1202 T>A	экзон 9	Утрата сайта <i>Mnl I</i>	1(1)
E397X*	c. 1252 G>T	экзон 9	Новый сайт <i>Alu I</i>	1(7)
FsV409: S423X*	c.1291del41	экзон 9	Гетеродуплексы	1 (3)
FsE414: M429X	c.1302delG	экзон 9	Гетеродуплексы	1 (1)
W422X*	c.1328 G>A	экзон 9	Новый сайт <i>Mae I</i>	2(2)
IVS9+1G>A	c.1358+1G>A	интрон 9	Утрата сайта <i>Asu HPI</i>	1 (1)
P518P*	c.1617 C>T	экзон 11	Нет	1(1)

Таблица 1. Характеристика мутаций гена рецептора ЛНП у жителей Санкт-Петербурга.

Название мутации	Изменение в ДНК	Локализация	Быстрый метод тестирования	Число семей (пациентов) с мутацией
G571E	c.1775 G>A	экзон 12	SSCP-анализ	1(1)
FsV597: A622X*	c.1855insA	экзон 13	Нет	1 (1)
D601N*	c.1864 G>A	экзон 13	Утрата сайта <i>EcoRV</i>	1(2)
C646S*	c.1999 T>A	экзон 14	SSCP-анализ	1(1)
T705I	c.2177 C>T	экзон 15	Нет	2(2)
V776M	c.2389 G>A	экзон 16	SSCP-анализ	1(2)
V806I	c.2479 G>A	экзон 17	Нет	1(1)

Примечания: * - новые мутации; # - мутация охарактеризована без нашего участия.

Таблица 2. Характеристика экзонных полиморфизмов и нейтральных мутаций в гене рецептора ЛНП, найденных у больных СГ - жителей Санкт-Петербурга.

Название полиморфизма	Изменение в ДНК	Локализация	Быстрый метод тестирования
c.81 T/C C6C*	TGT>TGC	экзон 2	Нет
c. 117 C/T C18C	TGC>TGT	экзон 2	Утрата сайта <i>SfaNI</i>
c. 1171G/A A370T	GCC>ACC	экзон 8	Утрата сайта <i>StuI</i>
c. 1413 G/A R450R	AGG>AGA	экзон 10A	SSCP-анализ
c. 1545 C/T N494N	AAC>AAT	экзон 10B	SSCP-анализ
c. 1773 T/C N570N	AAT>AAC	экзон 12	Новый сайт <i>HincII</i>
c. 1959 C/T V632V	GTC>GTT	экзон 13	Утрата сайта <i>AvaII</i>
c. 2231 G/A R730R	CGG>CGA	экзон 15	Утрата сайта <i>MspI</i>

Примечания: * - новые варианты последовательности ДНК.

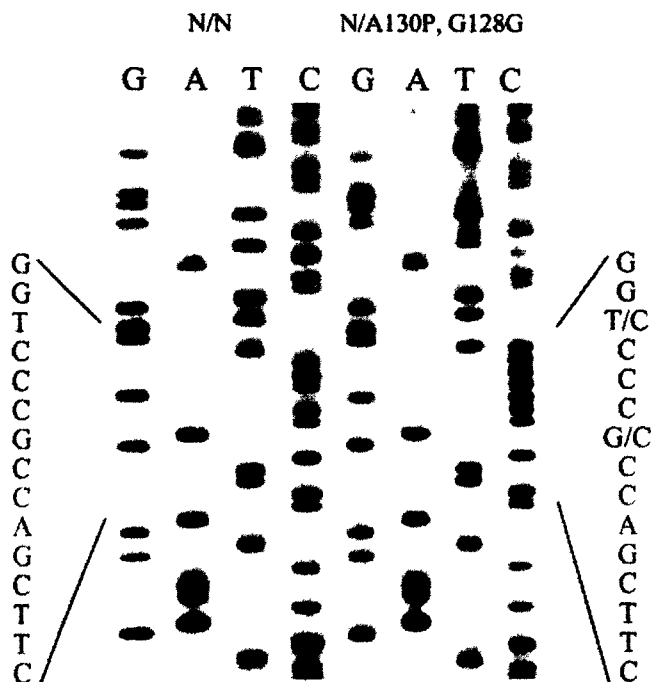


Рис. 1. Радиоавтограф геля с продуктами реакции секвенирования образца ДНК с двойной мутацией G128G, A130P [с. 447 T>C; с. 451 G>C] (GGT>GGC; GCC>CCC) в гене рецептора ЛНП (N/A130P,G128G) и гена нормальной последовательности (N/N).

интронные последовательности в донорных сайтах сплайсинга, шесть являлись нонсенс-мутациями, две оставшиеся из-за вырожденности генетического кода не приводили к заменам аминокислот. Девять случаев СГ вызваны короткими делециями или инсерциями, а один – ранее охарактеризованной крупномасштабной перестройкой локуса.

Из числа 33 идентифицированных мутаций мы рассматриваем лишь три варианта как не вносящие вклад в развитие заболевания, а именно: T705I, P518P и H229N. Два из этих вариантов не приводят к замене аминокислоты, а аллель 705I, как следует из наших данных и исследований в Европе (Lombardi et al., 1997), не ассоциирован с гиперхолестеринемией. В отношении остальных 30 мутаций имеются основания считать их причиной развития гиперхолестеринемии. Из числа этих мутаций для 14 ранее в других странах мира были проведены тесты на функциональную

активность рецептора, или же накоплены данные по семейному анализу и эпидемиологические свидетельства их функциональной значимости. Поэтому особо следует остановиться на обосновании функциональной значимости для развития заболевания тех 16 мутаций гена рецептора ЛНП, которые были идентифицированы нами впервые. Семь новых мутаций должны приводить к обрыву синтеза полипептидной цепи рецептора ЛНП либо вследствие непосредственного возникновения нонсенс-кодона в результате нуклеотидных замен (C249X, W422X, E397X), либо из-за сдвига рамки считывания, также вызывающего преждевременную

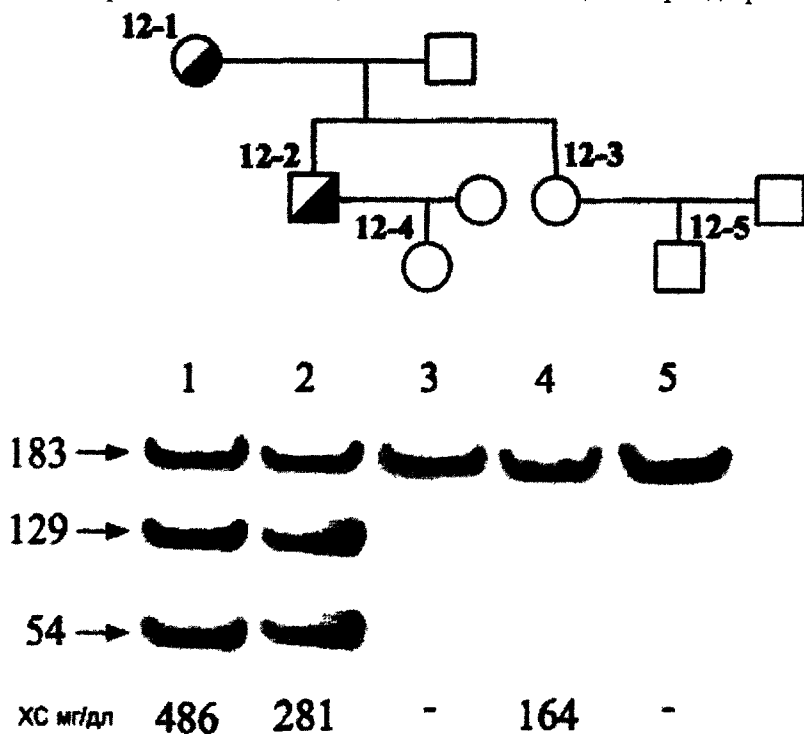


Рис. 2. Анализ наследования мутации Q12X (с.97 C>T; CAG>TAG) в гене рецептора ЛНП с применением рестрикционной эндонуклеазы *Mae I*. При транзиции с. 97 C>T появляется сайт для рестриктазы *Mae I*. Дорожки: 1, 2 – ДНК пациентов с мутацией Q12X; 3 – 5 – ДНК родственников без мутации.

терминацию трансляции (с.670-671insG, с.936-940del5, с.1291-1331del41, с.1291-1331del41). В таблице 1 указаны позиции, в которых возникают терминирующие кодоны при всех охарактеризованных делециях и инсерциях, не кратных трем нуклеотидам. Новая делеция 347delGCC не вызывает сдвига рамки считывания, однако, мы предсказываем ее существенное влияние на фолдинг и функцию рецепторного белка. Действительно, другие трехнуклеотидные делеции в том же четвертом экзоне гена рецептора ЛНП 651-653del3 и 652-654del3 являются причиной развития заболевания. Показано, что делеция 652-654del3 приводит к образованию нуль-аллеля, не продуцирующего функционального рецептора из-за дефекта его внутриклеточного транспорта (Hobbs et al., 1990), что определяется мисфолдингом повтора LR5 (Blacklow and Kim, 1996). Значение делеции 5 kb на развитие СГ подробно обсуждалось ранее (Mandelstam et al., 1993; Мандельштам и др., 1995). Четыре новых миссенс-мутации (C127W, C139G, C146R, C188Y) меняют цистеиновые остатки лигандсвязывающего домена, критические для поддержания его трехмерной структуры (Blacklow and Kim, 1996) на другие аминокислоты. Для трех мутаций (C139G, C146R, C188Y) в родословных пробандов показана косегрегация высокого уровня холестерина с генетическим дефектом. Наконец, мутация C139G была найдена в четырех неродственных российских семьях с семейной гиперхолестеринемией – двух в Санкт-Петербурге (Chakir et al., 1998a; Мандельштам, Масленников, 2001), одной – в Новосибирске (Мандельштам, Масленников, 2001) и еще одной – в Москве (Мешков и др., 2004). Двойная мутация [с. 447 T>C; с. 451 G>C, A130P, G128G] приводит одновременно к изменению кодонов для глицина (GGT>GGC) и аланина (GCC>CCC). Однако из-за вырожденности генетического кода, лишь одна из нуклеотидных замен приводит к изменению смысла кодона (A130P). Появление в белковой цепи молекулы нового остатка пролина, меняющего валентный угол в его полипептидном скелете, может иметь существенные последствия для фолдинга и функционирования рецептора. Мутация D601N в семье пробанда косегрегировала с гиперхолестеринемией. Последняя из числа новых мутаций C646S изменяет функционально важный цистеиновый остаток в белковой цепи рецептора. В отношении мутации C646S мы не располагаем убедительными данными по семейному анализу, свидетельствующими в пользу ее функциональной значимости. Однако все известные мутации, затрагивающие цистеиновые остатки в рецепторе ЛНП, ведут к развитию заболевания (<http://www.ucl.ac.uk/fh/muttab.html>).

Для тестирования активности аллелей рецептора ЛНП с мутациями неясного функционального значения уже давно (Kingsley and Krieger, 1984) разработана система экспрессии с использованием *ldla* клеток

китайского хомячка. В этих мутантных клетках собственный рецептор не обнаруживается, что позволяет количественно оценить степень дисфункции изучаемого человеческого аллеля после трансформации клеток экспрессионной конструкцией с мутантным вариантом кДНК рецептора ЛНП человека. В отличие от культивируемых фибробластов гетерозиготных пациентов с СГ клетки *ldla* CHO дают возможность точно оценить активность индивидуального аллеля, а не совокупную работу аллелей компаунда. Получение стабильной экспрессии каждого мутантного аллеля в этой системе связано с большими затратами труда. Поэтому актуальной представлялась разработка других методов оценок функциональной значимости мутаций. Одна из интересных работ (Blacklow and Kim, 1996) пыталась связать эффект отдельных мутаций на фолдинг лигандсвязывающего повтора LR5 с фенотипическим проявлением СГ. Мы получили рекомбинантный лигандсвязывающий домен рецептора ЛНП в культивируемых клетках *Escherichia coli* (Голубков и др., 1997; Рунова и др., 1997) с тем, чтобы впоследствии оценивать эффект вводимых в кДНК лигандсвязывающего домена природных мутаций на фолдинг и ЛНП-связывающую активность рекомбинантного белка. Спустя два месяца после наших публикаций функциональный рекомбинантный ЛНП-связывающий фрагмент рецептора в клетках *E. coli* был получен и другими авторами (Simmons et al., 1997). Однако в экспериментах эти системы оказались неудобны, поскольку для получения функционально активного белка требовался его рефолдинг *in vitro*. Проведенные в самое последнее время работы по экспрессии фрагмента кДНК рецептора ЛНП в культивируемых клетках насекомых (*Trichoplusia ni*) не требовали рефолдинга продуцируемого рекомбинантного белка для приобретения им функциональной активности. В результате этих работ была не только установлена трехмерная структура комплекса первого и второго доменов рецептора (Rudenko et al., 2002; Rudenko, Deisenhofer, 2002), но и открылась реальная возможность определять эффект мутаций на трехмерное строение и функционирование рецептора ЛНП.

Несмотря на то, что мы не определяли функциональное значение мутаций экспериментально, из выше приведенных аргументов представляется доказанным, что 30 из числа 33 обнаруженных нами у больных СГ Санкт-Петербурга мутаций являются причиной заболевания.

В субпопуляции евреев-ашкенази Санкт-Петербурга при СГ с высокой частотой (30% или 7 из 22 случаев) была идентифицирована одна мутация гена рецептора ЛНП G197del, которая не выявлена у русского (славянского) населения города. Из числа 32 обнаруженных в славянской популяции Санкт-Петербурга мутаций гена рецептора ЛНП только пять мутаций, вызывающих СГ (C139G, c.313+1G>A, c.651-653del3, W422X и C308Y), были найдены в двух семьях, а остальные – в единичных семьях.

Из числа 15 мутаций гена рецептора ЛНП, общих для жителей Санкт-Петербурга и других популяций мира, обнаруживаются варианты, происходящие из самых разных регионов мира, включая Среднюю Европу, страны Средиземноморья и даже Азию. Примечательно обнаружение в Санкт-Петербурге нескольких мутаций, определенно скандинавского (313+1G>A) или финского происхождения (L380H, FsE287:V348X). Ранее специфические финские мутации гена рецептора ЛНП за пределами этой этнической группы не находили. То обстоятельство, что мутация 313+1G>A идентифицирована как повторно встречающаяся в Санкт-Петербурге, а в Норвегии она является мажорной, может указывать на ее попадание в популяцию Северо-Запада еще от викингов. При этом в изученной выборке практически отсутствовали мутации, специфичные для славянских популяций Восточной Европы. Действительно, лишь одна мутация C188Y была общей для популяций Санкт-Петербурга и Чехии, и ни одной общей мутации не было найдено с Польшей. При сравнении спектров мутаций гена рецептора ЛНП у жителей Санкт-Петербурга и Москвы, у жителей которой описано 14 типов мутаций, обращает внимание малое сходство наборов мутаций: лишь две C139G и C188Y найдены в двух городах (Табл. 3). Отчасти наблюдаемая пестрота спектров мутаций гена рецептора ЛНП может быть объяснена их недавним

Таблица 3. Сравнение количества и разнообразия мутаций гена рецептора ЛНП, найденных в разных регионах России.

Регион	Число видов мутаций/ в том числе общих с Санкт-Петербургом	Число специфичных мутаций для региона России / общих с другими странами**
Санкт-Петербург	33/33	17/15
Москва	14/2	11/2
Новосибирск*	2/2	0/1

Примечание: * - в Новосибирске в рамках настоящего исследования осуществлялся поиск только мутаций, охарактеризованных ранее в Санкт-Петербурге;

** - одна мутация C139G является общей для всех трех регионов и найдена только в России, в подсчете числа мутаций в третьей колонке она не учитывалась; соответственно суммарное число мутаций в столбце 3 на одну меньше, чем в столбце 2.

При подсчете общего числа мутаций широко распространенные полиморфизмы нами не учитывались.

происхождением. Прямое определение возраста мутации G197del в одной из наших работ (Durst et al., 2001) показывает, что она могла возникнуть лишь в XIV веке, в то время как для мутации гена *BRCA1* 185delAG установлено, что она возникла не позже 72 г. н.э. (Bar-Sade et al., 1988; Ostrer, 2001).

Все найденные полиморфизмы ДНК (Табл. 2), за исключением варианта с.81 T/C (C6C), были ранее описаны из различных популяций мира, и не рассматриваются как ассоциированные с развитием СГ варианты последовательности гена рецептора ЛНП. Частота встречаемости отдельных полиморфных маркеров варьировала между группами пациентов с СГ, со спорадической гиперлиппротеинемией и в группе нормолипидемических пациентов, но в большинстве случаев различия не были статистически значимыми.

Прямая ДНК-диагностика СГ была проведена у 69 родственников пробандов с СГ (Табл. 4). Важнейшим ее результатом стала возможность установить или исключить диагноз СГ у детей пробандов, не достигших 16 лет. К этому возрасту никто из детей, даже несущих мутацию, не имел характерных меток СГ в виде ксантом или липоидных дуг роговицы. Более того, у многих из них уровень липидов был пограничным для их возраста, и он не позволял однозначно установить или исключить диагноз СГ. Для 4 детей анализ ДНК стал решающим для постановки диагноза СГ, а у 10 он однозначно позволил исключить это тяжелое метаболическое заболевание.

Таблица 4. Результаты ДНК-диагностики семейной гиперхолестеринемии в семьях пробандов.

Общее число обследованных родственников	Родственники с мутациями	Родственники без мутаций#	Дети до 16 лет с мутациями	Дети до 16 лет без мутаций#
69	26	43	6	24

Примечание:

В таблицу включены данные только по кровным родственникам пробандов (в частности, данные по супругам пробандов из нее исключены);

число обследованных родственников без мутаций выше, чем число родственников с мутациями вследствие того, что в анализ включены родственники со стороны не только больного, но и здорового родителя пробанда.

Существенно, что группы пробандов с СГ с идентифицированными мутациями гена рецептора ЛНП по своим клиническим характеристикам не отличались от пробандов, у которых мутаций гена рецептора ЛНП найти не удалось (Табл. 5). Единственным полезным критерием, относительно надежно указывающим на вероятное обнаружение у пробанда с гиперхолестеринемией мутации гена рецептора ЛНП, являлось наличие ксантом сухожилий или липоидных дуг роговицы.

Изучение пробандов с однотипными мутациями гена рецептора ЛНП позволяет понять механизмы формирования различных клинических фенотипов у больных. Проведенное нами совместно с сотрудниками лаборатории профессора Е. И. Шварца определение генотипов аполипопротеина Е у 14 пациентов-ашкенази с однотипной мутацией G197del (Табл. 6) указывает на значение генотипа E2/E2 для повышения уровня триглицеридов плазмы крови, которое может рассматриваться как дополнительный и независимый фактор риска атеросклероза. Несмотря на невозможность проведения статистической обработки, обращает внимание, что носитель генотипа E2/E2 из всей отобранной группы характеризовался наиболее тяжелым течением ИБС, которое осложнилось острым инфарктом миокарда.

Полная информация о мутациях и полиморфизмах гена рецептора ЛНП, найденных в Санкт-Петербурге и России в целом, доступна на созданном в процессе работы информационном Интернет-сайте по СГ. Его загрузочная страница имеет адрес <http://www.iemrams.spb.ru/russian/molgenru/fh/fh-main.htm>.

Изучение встречаемости широко распространенной мутации R3500Q в гене *APOB* у больных семейной гиперхолестеринемией Санкт-Петербурга.

Все 74 пробанда с СГ были исследованы на наличие мутации R3500Q в гене *APOB*, приводящей к образованию дефектного по связыванию аполипопротеина В-100. Ни один из пациентов не имел мутации R3500Q, являющейся единственным широко распространенным и часто встречающимся в мире генетическим дефектом, ведущим к семейному дефекту по связыванию аполипопротеина В-100 (FDB) и первичной гиперхолестеринемии. Этот результат, показавший отсутствие или крайне низкую частоту встречаемости мутации R3500Q среди пациентов с первичной гиперхолестеринемией Санкт-Петербурга, чрезвычайно важен для планирования ДНК-диагностики. Заболевание FDB по клиническим характеристикам и показателям липидов плазмы крови пациентов не отличимо от СГ. Таким образом, мутации гена рецептора ЛНП, а не мутация гена *APOB* являются основной причиной наследуемой гиперхолестеринемии в Санкт-Петербурге. Этот результат не тривиален,

Таблица 5. Сравнение клинических характеристик пробандов с СГ с идентифицированными мутациями гена рецептора ЛНП и пробандов, у которых мутации гена рецептора ЛНП не были обнаружены.

Параметр	Пациенты с идентифицированными мутациями в гене рецептора ЛНП (n=41)	Пациенты с СГ, у которых мутации гена рецептора ЛНП не обнаружены (n=31)	Достоверность различий, критерий
Мужчин/ Женщин	17/24	16/15	$\chi^2_{\text{эсп}} = 0,381$; p=0,53
Возраст, лет	48,2±10,98	51,7±12,66	p=0,21 (t-критерий Стьюдента)
Общий холестерин (мг/дл)	402,7±73,39	408,7±112,79	p=0,67 (U-критерий Манна-Уитни)
Триглицериды (мг/дл)	161,6±66,80	176,1±69,61	p=0,37 (t-критерий Стьюдента)
Холестерин ЛВП (мг/дл)	45,6±11,88	39,1±10,98	*p=0,03 (t-критерий Стьюдента)
Холестерин ЛНП (мг/дл)	323,3±73,03	334,2±111,42	p=0,859 (U-критерий Манна-Уитни)
С ксантомами/ без ксантом#	75% (31/10)	32% (10/21)	* $\chi^2_{\text{эсп}} = 11,82$; p=0,001; OR = 6,5 (95% CI 2,3-18,4)
ИБС/без ИБС	78% (32/9)	74% (23/8)	$\chi^2_{\text{эсп}} = 0,9$; p=0,34
ИМ/без ИМ	43%(18/41)	54%(17/14)	$\chi^2_{\text{эсп}} = 1,34$; p=0,25

Примечание: В таблицу внесены данные лишь о пробандах, по которым имелась полная клиническая информация, поэтому их количество составляет 72, а не 74 человека. Пробанды с мутациями H229N и T705I в гене рецептора ЛНП, которые не вызывают заболевание, отнесены к группе пациентов без мутаций гена рецептора ЛНП.

*Различия с $p < 0,05$ считаются статистически достоверными.

учтены пациенты с любыми метками ИБС, включая и сухожильные ксантомы, и липоидные дуги роговицы.

ИБС – ишемическая болезнь сердца, ИМ – инфаркт миокарда.

Таблица 6. Содержание липидов в плазме крови у пациентов-ашкенази Санкт-Петербурга с однотипной мутацией G197del в гене рецептора ЛНП (данные получены вместе с сотрудниками лаборатории профессора Е. И. Шварца).

Пациент	Возраст, лет	Пол	Общий холестерин, мг/дл	Триглицериды, мг/дл	Генотип APOE	ИМ
FN 61-1	47	М	265	312	2/2	+
FN 64-1	56	Ж	492	105	3/3	-
FN 62-1	46	М	508	270	3/3	-
FN 62-6	59	Ж	368	125	3/3	-
FN 62-7	37	М	362	188	3/3	-
FN 63-1	44	М	408	85	3/3	-
FN 63-3	44	Ж	260	158	3/3	-
FN 63-4	19	М	286	134	3/3	-
FN 59-1	50	Ж	429	122	3/3	-
FN 59-2	22	Ж	335	66	3/3	-
FN 59-3	33	Ж	319	103	2/3	-
FN 58-1	44	М	500	285	2/3	-
FN 58-2	27	Ж	325	143	3/3	-
FN 60-1	38	М	408	85	2/3	-

Примечание: ИМ – инфаркт миокарда.

поскольку в некоторых популяциях Европы, как Германия и Австрия, частота заболеваний СГ и FDB практически одинакова. Наш результат согласуется и с публикациями других исследователей. В частности, С. П. Шевцов (1996) до нас показал исключительную консервативность последовательностей гена APOB, кодирующих рецептор-связывающий участок апопротеина, и отсутствие каких-либо мутаций в нем у доноров Санкт-Петербурга. Несомненным преимуществом нашей работы по сравнению с работой Шевцова (1996), было то, что мы исследовали не просто доноров Санкт-Петербурга, а пациентов с аутосомно-доминантной гиперхолестеринемией. Результат, свидетельствующий о редкости мутации R3500Q в России, был ожидаемым, поскольку ее частота закономерно падает в направлении от центра Европы и, исходя из этих данных, частота встречаемости мутации R3500Q в России оценивалась ранее менее чем 1/1000 (Hansen, 1998; Miserez and Muller, 2000; Horvath and Ganey, 2001). Наши результаты свидетельствуют в пользу того, что она встречается в Санкт-Петербурге еще реже. Действительно, замена R3500Q не была обнаружена среди 74 пациентов с первичной

гиперхолестеринемией, включая 41 пациента с генетически подтвержденным диагнозом СГ. Эти данные позволяют сделать осторожную оценку частоты FDB в Санкт-Петербурге как меньшую, чем $1/20000$ ($41 \times 500 =$ число пациентов с генетически подтвержденным диагнозом СГ $\times$ ожидаемая частота СГ в популяции). Заметим, что мутация R3500Q гена *APOB* была обнаружена в Москве (Pogoda et al., 1998; Крапивнер и др., 2000), но также с очень низкой частотой. В цитируемом исследовании (Крапивнер и др., 2000) она была обнаружена лишь у 2 из 71 пациента с СГ. Отчасти, но не полностью, обнаружение мутации R3500Q в России может быть связано с проживанием в стране этнических немцев. В целом, данные Петербургских исследователей, в том числе и наши (Шевцов, 1996; Zakharova et al., 1995), как и данные московских исследователей (Крапивнер и др., 2001) свидетельствуют о малом участии локуса *APOB* в развитии наследуемых гиперхолестеринемий в России. Вопрос о вкладе других генов, вызывающих моногенные гиперхолестеринемии, как *PCSK9*, в их генез в Санкт-Петербурге остается неясным. Однако, судя по единичным находкам мутаций этого гена в Северной Европе (Leren et al., 2004), в том числе по полному отсутствию их в балтийской Дании (Damgaard et al., 2004), вряд ли вклад мутаций гена *PCSK9* в развитие наследуемых гиперхолестеринемий в Санкт-Петербурге будет велик.

Изучение мутаций в гене *BRCA1*.

У двенадцати пробандов из 43, вовлеченных в исследование, были найдены мутации гена *BRCA1* (Табл. 7). Шесть мутаций были охарактеризованы впервые в России, но лишь одна из восьми охарактеризованных мутаций не была известна ранее из других стран мира.

Пример одновременной идентификации многих мутаций в гене *BRCA1* с помощью электрофоретического анализа, выявляющего гетеродуплексы, показан на рисунке 3, а идентификация одной из делеций с помощью автоматического секвенирования ДНК – на рисунке 4. Из числа найденных вариантов 12-нуклеотидная дупликация в двадцатом интроне не ассоциирована с развитием рака молочной железы, а остальные семь вариантов могут рассматриваться как возможная причина предрасположенности к заболеванию.

Действительно, шесть из этих мутаций приводят к преждевременной терминации трансляции и к утрате функционально важных BRCT-повторов на С-конце опухолевого супрессора. Для миссенс-мутации E1250K показана ее косегрегация с заболеванием в семье пробанда. Из числа мутаций, ведущих к заболеванию, пять представляют короткие

Таблица 7. Характеристика мутаций в гене *BRCA1*, найденных у жителей Санкт-Петербурга с семейными формами рака молочной железы.

Название мутации	Изменение в ДНК	Локализация	Быстрый метод тестирования	Число семей (пациентов) с мутацией
2274insA FsE720:S725X	с.2274-2275insA	экзон 11G	Гетеродуплексный анализ	1(1)
2963del10* FsG948:L999X	с.2963-2972del10	экзон 11J	Гетеродуплексный анализ	1(3)
R1203X	CGA>TGA с.3726C>T	экзон 11O	SSCP-анализ	1(2)
3819del5 FsV1234:T1242X	с.3819-3823del5	экзон 11O	Гетеродуплексный анализ	2(2)
E1250K	GAG>AAG с.3867 G>A	экзон 11O	Гетеродуплексный анализ	1(2)
3875del4 FsL1252:L1263X	с.3875-3878del4	экзон 11O	Гетеродуплексный анализ	1(2)
5382insC FsQ1756:E1829X	5382_5383 insC	экзон 20	Гетеродуплексный анализ	4(4)
g.71741ins12nt; IVS20+60ins12	ins GTATTCCA CTCC	интрон 20	Гетеродуплексный анализ	1(1)

Примечания: * - новые мутации.

делеции или инсерции, одна нуклеотидная замена приводит к образованию стоп-кодона, и лишь одна является миссенс-мутацией.

При исследовании гена *BRCA1* у онкологических больных Санкт-Петербурга была обнаружена мажорная мутация 5382insC (Табл. 8). Эта инсерция найдена приблизительно у 10% пациентов с семейными формами рака молочной железы независимо от этнической принадлежности. Действительно, дефект встречался почти одинаково часто у евреев-ашкенази (1/9) и у славянских пациентов (3/34). Еще большее значение мутация 5382insC может иметь для развития семейных форм рака яичника. Она была обнаружена нами у 3 из 7 пробандов с таким заболеванием в Санкт-Петербурге (Табл. 8). Высокий процент семей, имеющий рак яичника и несущих мутацию 5382insC, найден и в Москве (Gayther et al., 1997; Карпухин и др., 2002). Таким образом, наличие преобладающей и распространенной в разных регионах России (Москве, Московской

1 2 3 4 5

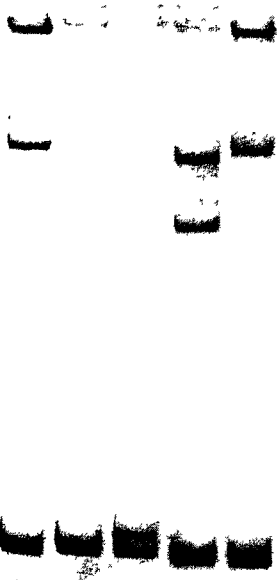


Рис. 3. Идентификация мутаций в гене *BRCA1* по образованию гетеродуплексов. Дорожки: 1, 5 – ДНК носителей мутации 3819del5; 3 – образец с мутацией E1250K; 4 – образец с делецией 3875del4; 2 – ДНК пациента без мутаций.

области, Томске) (Карпухин и др., 2002; Tereshenko et al., 2002) мутации 5382insC облегчает ДНК-диагностику предрасположенности к заболеванию и позволяет предложить в качестве первого теста недорогой анализ на эту мутацию.

У жителей Санкт-Петербурга идентифицированы мутации гена *BRCA1* (5382insC, 3819del5, 3875del4), широко распространенные в мире. Эти мутации не характерны для стран Фенноскандии, но максимально часто встречаются в славянских популяциях Восточной Европы (Польше и Чехии). Особенно показательна высокая встречаемость инсерции 5382insC как в Восточной Европе, так и в популяциях России (Санкт-Петербурге, Москве, Московской области и Томске), что позволяет предположить ее восточноевропейское происхождение. Некоторые мутации, распространенные в Польше и Чехии, как 185delAG и особенно частую в этих странах мутацию C61G, при специальных поисках в Санкт-Петербурге мы найти не смогли.

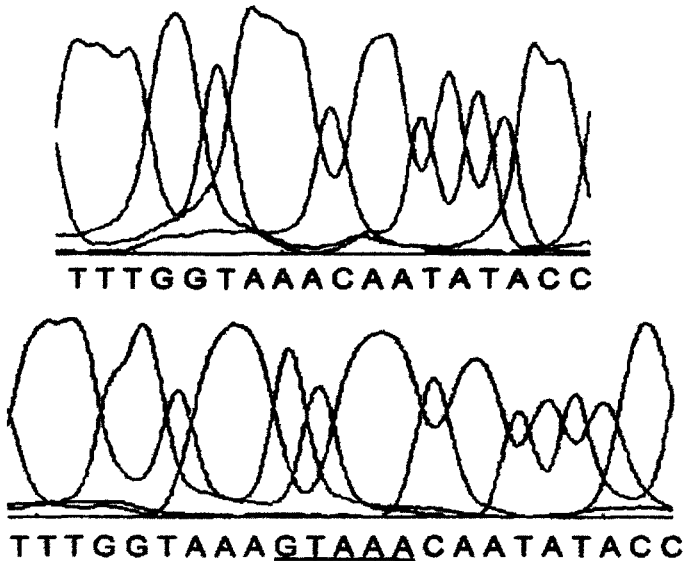


Рис. 4. Идентификация мутации 3819del5 в гене *BRCA1* методом автоматического секвенирования ДНК на приборе "ALFExpress-2".

Вверху – результаты секвенирования клонированного мутантного аллеля, внизу – нормального аллеля. Утраченные при делеции нуклеотиды в нормальной последовательности подчеркнуты.

Родственники пациентов из большинства семей с раком молочной железы были недоступны для исследования ДНК. Тем не менее, важным кажется результат обнаружения мутации 2963del10 гена *BRCA1* у дочери пробанда, в возрасте 19 лет не имеющей признаков заболевания. У дочери пациентки с мутацией 3875del4, унаследовавшей мутацию от матери, в возрасте 14 лет была диагностирована дольковая гиперплазия молочной железы и киста правого яичника, которые могут предшествовать возникновению злокачественных новообразований. Таким образом, мы обратили внимание родственников пробандов с мутациями на необходимость повышенного контроля за состоянием грудной железы.

В гене *BRCA1* мы идентифицировали три полиморфизма ДНК (Табл. 9), все из которых были ранее индексированы в базе данных ВИС как нейтральные изменения последовательности ДНК. Полиморфные нуклеотиды всех трех изученных вариантов S694S, L771L и E1038G гена *BRCA1* находились в одной фазе сцепления, что отмечалось исследователями и ранее (Dunning et al., 1997; Карпунин и др., 2002).

Таблица 8. Доля семей с повторяющимися и уникальными мутациями в гене *BRCA1* в семьях высокого риска рака молочной железы и яичника из разных популяций.

Популяция	Семьи с мутацией 5382insC	Семьи с повторно встречающимися мутациями	Семьи с широко распространенными мутациями	Семьи с уникальными для популяции мутациями	Всего семей с мутациями в гене <i>BRCA1</i>
Санкт-Петербург	9,3% (4/43)	14% (6/43)	23% (10/43)	2,3% (1/43)	26% (11/43)
Санкт-Петербург*	43%* (3/7)	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Томск	12% (3/25)	12% (3/25)	12% (3/25)	0% (0/25)	12% (3/25)
Москва*	47% (9/19)	63% (12/19)	79% (15/19)	0% (0/19)	79% (15/19)
Северо-восточная Польша#	10% (6/60)	15% (9/60)	22% (13/60)	1,6% (1/60)	23% (14/60)

*Данные по семьям с раком яичника.

#Комбинированные данные по семьям с раком яичника и раком молочной железы.

Таблица 9. Характеристика экзонных полиморфизмов и нейтральных мутаций в гене *BRCA1*, найденных у больных СГ Санкт-Петербурга.

Название полиморфизма	Изменение в ДНК	Локализация	Быстрый метод тестирования	Доля хромосом с редким аллелем полиморфизма (n=86)
S694S	AGC>AGT с.2201C>T	экзон11G	SSCP-анализ	0,64/0,36
L771L	TTG>CTG с.2430 T>C	экзон 11H	SSCP-анализ	0,64/0,36
E1038G	GAA>GGA с.3232 A>G	экзон 11K2	SSCP-анализ	0,64/0,36

Примечание: n – число изученных хромосом.

Созданный в процессе исследований сайт по семейным формам рака молочной железы, вызванных мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2* (<http://www.iemrams.spb.ru/russian/molgenru/brca-ru/brca-r1.htm>) содержит информацию обо всех найденных в России мутациях этих локусов для специалистов-онкологов.

Значение проведенного исследования для диагностики моногенных заболеваний в Санкт-Петербурге и в России.

Суммарно, мутации в гене рецептора ЛНП, вызывающие заболевание, выявлены в 55% (41/74) семей с СГ, а мутации гена *BRCA1* – в 26% (11/43) семей, отягощенных по раку молочной железы. В гене рецептора ЛНП у пробандов с СГ в силу дизайна стандартных праймеров (Hobbs et al., 1992) не полностью были проанализированы экзон-интронные стыки, потенциально содержащие значительный процент мутаций (Amsellem et al., 2002), а в гене *BRCA1* – небольшие экзоны гена, в которых в мире известно лишь малое число мутаций. Несмотря на это, эффективность поиска мутаций в обоих генах в Санкт-Петербурге не уступала европейским исследованиям.

Как следует из предыдущих разделов, диагностика СГ в Санкт-Петербурге и в России в целом осложнена чрезвычайно большим разнообразием мутаций в силу отсутствия выраженного эффекта основателя. На практике, это означает, что для каждой вновь обратившейся за консультацией семьи невозможно будет предсказать, какая мутация будет обнаружена, и, весьма вероятно, она окажется даже ранее неизвестной. Из-за возможной локализации мутации у пробанда, обратившегося за диагностикой, в любом из экзонов гена и при отсутствии преобладающих мутаций, для обнаружения генетического дефекта может потребоваться изучение всего гена высокочувствительным просеивающим методом, таким как флуоресцентный автоматический SSCP-анализ, или прямое секвенирование всей кодирующей области гена и экзон-интронных стыков.

В случае гена *BRCA1* ситуация для ДНК-диагностики моногенной предрасположенности к раку молочной железы более оптимистичная. В этом гене в Санкт-Петербурге (Табл. 7), как и в целом в мире (Рис. 5) из всех мутаций преобладают делеции и инсерции, эффективно выявляемые рутинным гетеродуплексным анализом. Поэтому этот метод может быть рекомендован для эффективного поиска известных и новых мутаций гена *BRCA1* перед его секвенированием. Кроме того, в отличие от СГ, при раке молочной железы, связанном с мутациями гена *BRCA1*, большинство мутаций являются общими со странами Европы (Рис. 6), что может сузить поиск генетических дефектов в семьях. Наконец, довольно большой

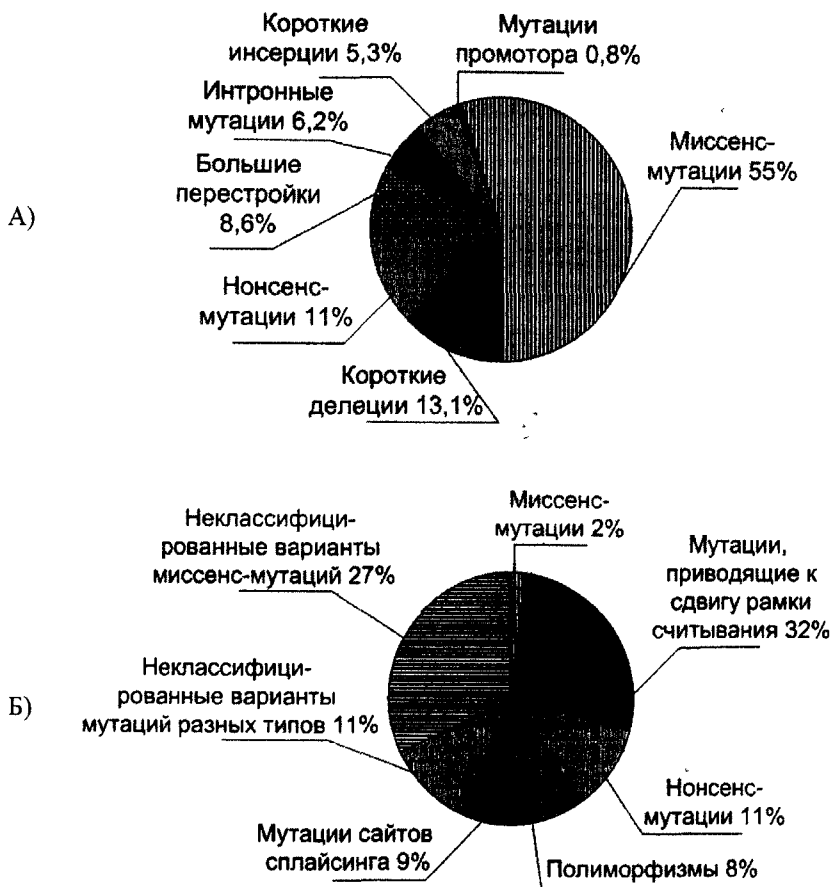


Рис. 5. Сравнение преобладающих классов мутаций в гене рецептора ЛНП и в гене *BRCA1*.

Несмотря на несколько различающуюся классификацию мутаций по типам в каждом из генов по данным UMD-LDLR Database и BIC, можно видеть, что в гене рецептора ЛНП преобладают функционально значимые миссенс-мутации, а в гене *BRCA1* – мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания (обычно короткие делеции и инсерции).

процент повторяющихся мутаций, и особенно наличие мажорной мутации 5382insC (Табл. 8, Рис. 7), позволяет в первую очередь рекомендовать тестирование в семьях с раком молочной железы и раком яичника именно на этот дефект.

Действительно, на основе наших данных и исследований в Москве, разработаны и сегодня уже вошли в практику российской медицины тесты на часто встречающиеся мутации в гене *BRCA1*. Фирма “Литех” в Москве предлагает пациентам и их родственникам не только дорогостоящее секвенирование всего гена *BRCA*, но и дешевые тесты на мутации, широко распространенные в восточноевропейских популяциях или в этнической группе ашкенази: 185delAG, T81G, 4143delA и 5382insC. Подобная стратегия исключения широко распространенных в силу эффекта основателя мутаций перед секвенированием всего гена предлагалась для

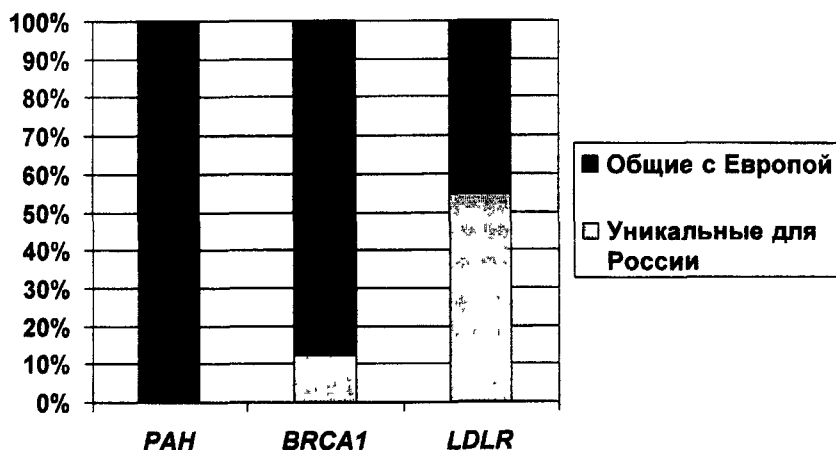


Рис. 6. Доля общих с зарубежными странами и специфичных для России мутаций при моногенных заболеваниях у жителей Санкт-Петербурга. Данные о мутациях локуса фенилаланингидроксилазы (*PAH*) взяты из работы Барановской и соавторов (1995); *LDLR* – ген рецептора ЛНП.

стран, где спектр мутаций достаточно хорошо изучен, например, для Польши (Narod, Foulkes, 1994; Gorski et al., 2004). Подобную очередность в тестировании пациентов в первую очередь на мутацию 5382insC, а затем и на некоторые другие широко представленные в Европе мутации, перед поиском новых вариантов, предложили в это же время и мы для Санкт-Петербурга (Мандельштам и др., 2001; Грудина и др., 2004, 2005). Подобный подход, кажущийся сегодня очевидным, но потребовавший

большого исследования спектра мутаций, проведенного для Санкт-Петербурга в этой работе, реализуется косвенно на основе наших данных, например в НИИ онкологии им. проф. Н. Н. Петрова, где разработан и используется быстрый и дешевый тест на мутацию 5382insC в гене *BRCA1*.

Из-за разного эволюционного возраста мутаций гена рецептора ЛНП и гена *BRCA1* или по каким-либо другим причинам, ситуация с наличием преобладающих мутаций различна при СГ и моногенных формах рака молочной железы, вызванных мутациями *BRCA1*. Для целей диагностики, однако, важно знать не абсолютный возраст отдельных мутаций, а возможность определить, какие мутации могут быть распространены в России, исходя из анализа уже изученных спектров мутаций в странах Европы. Страны Европы имеют малое сходство между собой в отношении спектров мутаций гена рецептора ЛНП, и популяция России, как уже показано преимущественно нами, характеризуется высоким своеобразием генетических дефектов при СГ. В отношении мутаций гена *BRCA1* наблюдается большее сходство между странами Европы, и спектр наследуемых дефектов этого гена в Санкт-Петербурге и в России в целом напоминает спектр мутаций в сопредельных и этнически близких странах Восточной Европы, а именно: в Польше и Чехии. Полученные результаты и подобные сравнения важны для российских клиницистов. Они смогут решить, какие мутации в первую очередь, уже известные из Европы или преимущественно новые, будут обнаружены при том заболевании, которое они собираются изучать в России и ДНК-диагностику которого они планируют налаживать в стране. Например, еще до начала исследований гена *BRCA2* в нашей стране на основании сильных различий в спектрах мутаций между европейскими странами *a priori* можно предсказать, что набор наследуемых дефектов *BRCA2* в России будет менее похожим на имеющийся в Европе, чем в случае гена *BRCA1*. В подтверждение этого положения приведем результат экспериментальной работы томских генетиков, в которой все три идентифицированные мутации гена *BRCA2* в отличие от найденных дефектов гена *BRCA1* оказались новыми, специфичными для России (Tereshenko et al., 2002).

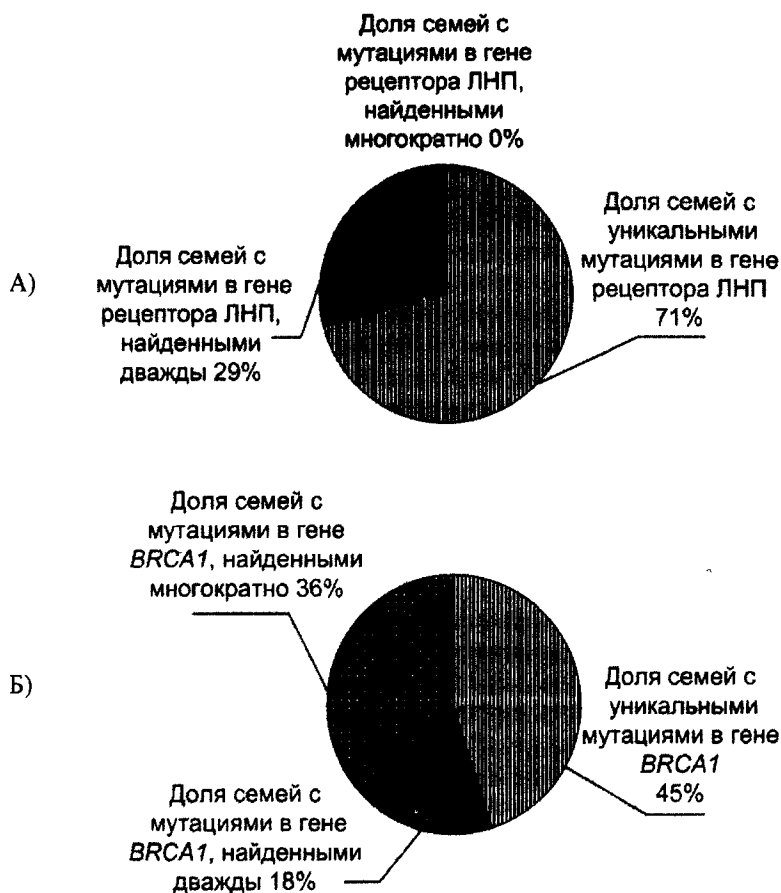


Рис. 7. Доля семей с повторно встречающимися и уникальными мутациями в гене рецептора ЛНП и в гене *BRCA1*.

Рассмотрены только Санкт-Петербургские семьи славянского происхождения, поскольку в популяции евреев-ашкенази имеются хорошо известные доминирующие мутации в каждом из генов, а их общий вклад в СГ и семейные формы рака молочной железы в Санкт-Петербурге из-за малочисленности ашкенази в городе невелик. За 100% взято число семей с идентифицированными мутациями, способными вызвать заболевание.

Можно видеть, что в гене рецептора ЛНП почти все семьи имеют редко встречающиеся мутации, в то время как в гене *BRCA1* имеется, по крайней мере, одна мажорная мутация 5382insC.

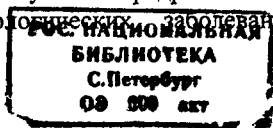
ВЫВОДЫ

1. Спектр мутаций гена рецептора ЛНП при семейной гиперхолестеринемии у жителей Санкт-Петербурга очень широк и характеризуется значительным своеобразием. Из 33 найденных в Санкт-Петербурге мутаций 18 оказались новыми, не известными в других популяциях мира. Из числа изученных обнаружены лишь две мутации, общие для Москвы и Санкт-Петербурга.
2. У жителей Санкт-Петербурга, за исключением субпопуляции евреев-ашкенази, отсутствуют мажорные мутации гена рецептора ЛНП. В этнической группе евреев-ашкенази мажорная мутация G197del гена рецептора ЛНП обуславливает до 30% случаев семейной гиперхолестеринемии.
3. В гене *BRCA1* у онкологических больных Санкт-Петербурга с семейными формами рака молочной железы преобладают мутации, общие с населением Европы. Из числа 8 обнаруженных мутаций гена *BRCA1* лишь одна не была известна в других популяциях мира.
4. Инсерция 5382insC в гене *BRCA1* является мажорной мутацией в популяции Санкт-Петербурга и встречается приблизительно в 10% семей,отягощенных по раку молочной железы, независимо от этнической принадлежности. Обнаруженное преобладание указанной мутации в Санкт-Петербурге согласуется с ее распространенностью в Москве и в Томске.
5. Из 33 найденных мутаций гена рецептора ЛНП 30 являются вероятной причиной семейной гиперхолестеринемии, а из 8 охарактеризованных мутаций гена *BRCA1* 7 вызывают предрасположенность к раку молочной железы.
6. Отсутствие мутации R3500Q в гене *APOB* у 74 больных с семейной гиперхолестеринемией свидетельствует в пользу низкой частоты ее встречаемости в популяции Санкт-Петербурга (оценена как меньшая, чем 1/20000).
7. Преобладание среди мутаций гена *BRCA1* коротких делеций и инсерций позволяет рассматривать гетеродуплексный анализ, хорошо выявляющий эти типы мутаций, как наиболее удобный на практике скрининговый метод. Для поиска мутаций в гене рецептора ЛНП из-за преобладания в нем нуклеотидных замен должны быть применены другие методы, например высокочувствительный анализ конформационного полиморфизма одностебловых фрагментов ДНК.

Список статей, опубликованных по теме диссертации:

1. **Мандельштам М.Ю.**, Липовецкий Б.М., Шварцман А.Л., Гайцхоки В.С. Молекулярная гетерогенность семейной гиперхолестеринемии в популяции жителей Санкт-Петербурга// Генетика. – 1995. – Т.31, N 4. – С. 521–527.
2. Липовецкий Б.М., **Мандельштам М.Ю.**, Гайцхоки В.С., Васильева Л.Е. Клинико-генетические аспекты семейной гиперхолестеринемии и их прикладное значение// Терапевтический архив. – 1996. – Т. 68, N 1. – С. 24–29.
3. Голубков В.И., **Мандельштам М.Ю.**, Рунова О.Л., Гайцхоки В.С. Получение и характеристика рекомбинантного лиганд-связывающего домена рецептора липопротеинов низкой плотности человека// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1997. – Т.123, N 2. – С. 184–187.
4. Рунова О.Л., **Мандельштам М.Ю.**, Голубков В.И., Суконина В.Е., Денисенко А.Д., Гайцхоки В.С. Экспрессия фрагмента кДНК, кодирующего лиганд-связывающий домен рецептора липопротеинов низкой плотности человека, в клетках *Escherichia coli*// Биохимия. – 1997. – Т.62, N 8. – С. 1037–1044
5. **Mandelstam M.Ju.**, Chakir Kh., Shevtsov S.P., Golubkov V.I., Skobeleva N.A., Lipovetsky B.M., Konstantinov V.O., Denisenko A.D., Gaitskhoki V.S., Schwartz E.I. Prevalence of Lithuanian mutation among St.Petersburg Jews with familial hypercholesterolemia// Human Mutation. – 1998. – Vol. 12, N 4. – P. 255–258.
6. Липовецкий Б.М., **Мандельштам М.Ю.**, Васильева Л.Е., Шакир Х., Голубков В.И., Шевцов С.П., Скобелева Н.А., Константинов В.О., Денисенко А.Д., Гайцхоки В.С., Шварц Е.И. О частоте и проявлениях «литовской» мутации среди евреев с гиперлипидемией II типа и их реакции на лечение флувастатином// Кардиология. – 1998. – Т.38, N 5. – С. 39–41.
7. Chakir Kh., **Mandelstam M.Ju.**, Shevtsov S.P., Golubkov V.I., Skobeleva N.A., Schur Yu.A., Zakharova F.M., Lipovetskyi B.M., Konstantinov V.O., Denisenko A.D., Gaitskhoki V.S., Schwartz E.I. Two novel low density lipoprotein receptor gene mutations (E397X and 347delGCC) in St.Petersburg familial hypercholesterolemia// Molecular Genetics and Metabolism. – 1998. – Vol. 65, N 4. – P. 311–314.
8. **Мандельштам М.Ю.**, Голубков В.И., Шур Ю.А., Липовецкий Б.М., Гайцхоки В.С. Новая мутация 347delGCC в гене рецептора липопротеинов низкой плотности человека// Биоорганическая химия. – 1998. – Т.24, N 10. – С. 798–800.
9. Durst R., Colombo R., Shpitzen S., Avi L.B., Friedlander Y., Wexler R., Raal F.J., Marais D.A., Defesche J.C., **Mandelstam M.Y.**, Kotze M.J., Leitersdorf E., Meiner V. Recent origin and spread of a common

- Lithuanian mutation, G197del LDLR, causing familial hypercholesterolemia: positive selection is not always necessary to account for disease incidence among Ashkenazi Jews // American Journal of Human Genetics. – 2001. – Vol. 68, N 5. – P. 1172–1178.
10. Татищева Ю.А., *Мандельштам М.Ю.*, Голубков В.И., Липовецкий Б.М., Гайцхоки В.С. Четыре новые мутации и полиморфные варианты гена рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с семейной гиперхолестеринемией Санкт-Петербурга// Генетика. – 2001. – Т.31, N 9. – С. 1290–1295.
 11. Захарова Ф.М., Голубков В.И., *Мандельштам М.Ю.*, Липовецкий Б.М., Гайцхоки В.С. Идентификация новой миссенс-мутации G571E, новой молчащей мутации H229N, нонсенс мутации C74X и четырех однонуклеотидных полиморфизмов в гене рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с семейной гиперхолестеринемией в Санкт-Петербурге// Биоорганическая химия. - 2001. – Т. 27, N 5. – С.393–396.
 12. *Мандельштам М.Ю.*, Голубков В.И., Ламбер Е.П., Шапиро И.М., Брежнева Т.В., Семиглазов В.Ф., Липовецкий Б.М., Хансон К.П., Гайцхоки В.С. Поиск часто встречающихся мутаций в генах предрасположенности к раку молочной железы// Генетика. – 2001. – Т. 31, N 12. – С. 1681–1686.
 13. *Мандельштам М.Ю.*, Масленников А.Б. Изучение молекулярной генетики семейной гиперхолестеринемии в России // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике (под ред. А. Б. Масленникова). – Новосибирск: Издательский дом "Манускрипт". – 2001. – С. 58–64.
 14. *Мандельштам М.Ю.*, Голубков В.И., Татищева Ю.А., Захарова Ф.М., Шакир Х., Шевцов С.П., Скобелева Н.А., Липовецкий Б.М., Константинов В.О., Денисенко А.Д., Масленников А.Б., Гайцхоки В.С., Шварц Е.И. Молекулярная генетика семейной гиперхолестеринемии: современное состояние вопроса в России // Тихоокеанский медицинский журнал – 2002. – N 1 (8). – С. 10–11.
 15. *Мандельштам М.Ю.*, Голубков В.И., Ламбер Е.П., Брежнева Т.В., Семиглазов В.Ф., Гайцхоки В.С., Хансон К.П. Частая мутация гена *BRCA1* у больных с семейными формами рака молочной железы в России// Тихоокеанский медицинский журнал – 2002. - N 1 (8). – С. 59–60.
 16. *Мандельштам М.Ю.* Что дало изучение семейной гиперхолестеринемии для понимания генетики дислипидемий?// Медицинская генетика. "Литера-2000", Москва. – 2003. – Т.2, N 12. – С. 509–519.
 17. *Мандельштам М.Ю.* Изучение предрасположенности к развитию злокачественных онкологических заболеваний, обусловленной



- наследуемыми мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2*// “Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике”. Под ред. А. Б. Масленникова. – Вып. 3. – Новосибирск, “Альфа Виста”. – 2004. – С. 92–109.
18. *Мандельштам М.Ю.*, Захарова Ф.М., Голубков В.И., Масленников А.Б., Татищева Ю.А., Липовецкий Б.М., Константинов В.О., Денисенко А.Д., Васильев В.Б. Диагностика семейной гиперхолестеринемии в России: достижения и проблемы // “Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике”. Под ред. А.Б. Масленникова. – Вып. 6. – Новосибирск, “Альфа Виста”. – 2004. – С. 9–23.
 19. Грудинина Н.А., Голубков В.И., Тихомирова О.С., Брежнева Т.В., Хансон К.П., Васильев В.Б., *Мандельштам М.Ю.* Идентификация мутаций в гене *BRCA1* у больных раком молочной железы Санкт-Петербурга // Вестник рентгенодиагностики. – 2004. – http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v3/papers/grudin_v3.htm
 20. Грудинина Н.А., Голубков В.И., Тихомирова О.С., Брежнева Т.В., Хансон К.П., Васильев В.Б., *Мандельштам М.Ю.* Преобладание широко распространенных мутаций в гене *BRCA1* у больных семейными формами рака молочной железы Санкт-Петербурга// Генетика. – 2005. – Т. 41, N 3. – С. 405–410.
 21. Захарова Ф.М., Голубков В.И., Липовецкий Б.М., Константинов В.О., *Мандельштам М.Ю.*, Васильев В.Б. Диагностика семейной гиперхолестеринемии у детей в семьях с отягощенной наследственностью// Вопросы современной педиатрии – 2005. – Т. 4., N 1. – С. 15–18.
 22. Zakharova F.M., Damgaard D., *Mandelshtam M.Y.*, Golubkov V.I., Nissen P.H., Nilson G.G., Stenderup A., Lipovetsky B.M., Konstantinov V.O., Denisenko A.D., Vasilyev V.B., Faergeman O. Familial hypercholesterolemia in St.Petersburg: the known and novel mutations found in the low density lipoprotein receptor gene in Russia //BMC Med. Genet. – 2005. – Vol. 6, No. 1. – P. 6 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2350-6-6>) (всего 10 страниц).

Финансирование исследований, составивших предмет настоящей диссертации, осуществлялось частично из средств Российского Фонда фундаментальных исследований (РФФИ) (проекты N 94-04-12266а, 97-04-48887, 98-04-49869, 00-04-4896, 01-04-49627, 05-04-48235), Государственных программ “Геном человека”, “Атеросклероз”, “Ведущие научные школы России” и гранта фирмы “Merck” (MSGP #S-RUS-01-98-SCH).

1

2

3

4

Подписано в печать 23.09.2005. Формат 60х84/16
Отпечатано с готового оригинал-макета в типографии ЗАО «КопиСервис».
Печать ризографическая. Заказ № 1/2309.
П. л. 2.25. Уч.-изд. л. 2.25. Тираж 200 экз.

ЗАО «КопиСервис»
Адрес юр.: 194017, Санкт-Петербург, Скобелевский пр., д. 16.
Адрес факт.: 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 5.
тел.: (812) 327 5098

2

7

4

3

1

№ 20 1 13

РНБ Русский фонд

2006-4

18086