

Министерство здравоохранения Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НОВОСИБИРСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ ИМ. Я.Л. ЦИВЬЯНА»
(ФГБУ «ННИИТО ИМ. Я.Л. ЦИВЬЯНА» МИНЗДРАВА РОССИИ)

УДК 617.3+[616-001-089.23:615.477.2]
№ госрегистрации 115071510023
Инв.№

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУ «ННИИТО
им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России,
д.м.н., проф.




_____ М.А. Садовой

15.01 2018 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Разработка медицинских изделий

по теме:

СОЗДАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ДНК МИКРОЧИПА
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К
ЗАБОЛЕВАНИЯМ СКОЛИОЗАМИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

(заключительный)

Заместитель директора
по научной работе, д.м.н.

Руководитель темы,
д.м.н., проф.


_____ И.А. Кирилова


_____ М.В. Михайловский

Новосибирск 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель:

Руководитель отделения детской и подростковой вертебрологии ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, профессор, д.м.н., главный научный сотрудник



12.01.18

15.01.2018

М.В. Михайловский

Исполнитель темы:

Старший научный сотрудник группы молекулярно-генетических и морфологических методов исследования лабораторно-экспериментального отдела ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, к.б.н.



15.01.2018

С.Б. Кузнецов

РЕФЕРАТ

Отчет 38 с., 2 рисунка, 11 графиков, 70 источников

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА, ДНК-МИКРОЧИП, НАСЛЕДСТВЕННЫЕ МУТАЦИИ, ИДИОПАТИЧЕСКИЙ И ВРОЖДЕННЫЙ СКОЛИОЗЫ

Объекты исследования: пациенты с диагностированными сколиозами различных форм из отделения детской и подростковой вертебрологии ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России и из специализированной школы-интерната №133 для детей, больных сколиозом (г. Новосибирск), а также их ближайшие родственники (родители, братья или сестры) – всего 100 образцов; литературные и геномные базы данных (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>; <http://omim.org>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.1000genomes.org>).

Цель работы: разработка тест-системы на основе ДНК-микрочиповой технологии для выявления генетической предрасположенности к идиопатическим сколиозам.

Исследование проводилось по двум основным направлениям:

1) создание экспериментального образца ДНК-микрочипа для выявления генетической предрасположенности к идиопатическим и врожденным сколиозам – поиск по литературным источникам генетических маркеров сколиоза, анализ таких маркеров и обоснование их включения в разработку, порядок размещения маркеров на микрочипе, подбор позитивных и негативных контрольных маркеров, отработка протоколов печати микрочипов, отработка протоколов анализа геномов с помощью микрочипов, создание алгоритма интерпретации результатов такого анализа;

2) формирование групп пациентов с различными формами сколиоза, сбор генетического материала от пациентов и, при возможности, сбор материала от их прямых родственников, особенно, если у них был диагностирован сколиоз.

В результате проведенного исследования впервые в России создан экспериментальный образец тест-системы в виде ДНК-микрочипа для выявления генетической предрасположенности к идиопатическому сколиозу; разработаны протоколы для производства и процессинга микрочипов; адаптировано программное обеспечение для анализа сканов микрочипов от компании «Agilent» под формат созданного ДНК-микрочипа. Также, были сформированы группы пациентов с различными формами сколиоза, собран биологический материал от них и их ближайших родственников (100 образцов) для анализа их геномов и выявления у них мутаций, отобранных нами на промежуточных этапах исследования, как маркеров заболевания. Из собранных образцов выделена геномная ДНК, из части образцов ДНК приготовлены меченные флуоресцентным красителем зонды, и ДНК этих образцов проанализированы с помощью созданного микрочипа.

Показана возможность анализировать геномы пациентов с помощью созданного ДНК-микрочипа, показана возможность идентифицировать точечные мутации (однонуклеотидные полиморфные локусы) и определять статус (гомо- и гетерозиготный) носителей таких мутаций.

Степень внедрения: изготовление экспериментального образца ДНК-микрочипа для выявления генетической предрасположенности к идиопатическому сколиозу.

Созданный ДНК-микрочип позволит надежно выявлять в геномах молекулярные маркеры предрасположенности к заболеванию идиопатическим сколиозом и маркеры прогрессирования этого заболевания.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	6
Основная часть.....	9
Заключение	30
Список используемых источников	31

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Однонуклеотидные полиморфные локусы (*Single nucleotide polymorphism – SNP*) – точечные мутации в кодирующей и не кодирующей частях генома, выражающиеся в замене одного нуклеотида на другой. В данном исследовании к таким мутациям также относятся и однонуклеотидные делеции, инсерции, дупликации.

ДНК-микрочип (*DNA microarray*) – технология, используемая в молекулярной биологии и медицине. ДНК-микрочип представляет собой множество небольших одноцепочечных молекул ДНК, которые ковалентно пришиты к твёрдому основанию.

Идиопатический сколиоз – является самой распространенной формой сколиоза, встречается в 80% случаях заболевания. Идиопатическим называются все виды сколиозов, происхождение которых не выявлено.

Маркер – мутация в кодирующей или не кодирующей частях генома, которая статистически достоверно связана с тем или иным заболеванием, то есть, маркирует заболевание. Мутация может являться причиной заболевания, если находится в кодирующей части гена.

ВВЕДЕНИЕ

1 ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Актуальнейшей проблемой в ортопедии является диагностика идиопатического сколиоза, оценка вероятности его быстрого прогрессирования и особенностей этого прогресса. Предлагаемая к разработке тест-система обеспечивает высокую специфичность к определяемым патогенным мутациям, высокую скорость и высокую чувствительность при проведении анализа, а также его низкую стоимость. Создаваемая тест-система обеспечивает возможность выявления наследственных патогенных мутаций и предсказание рисков развития сколиоза до клинического проявления заболевания. Поэтому максимально раннее выявление наследственной предрасположенности к сколиозу (особенно для детей, у родителей которых был поставлен диагноз «сколиоз» в раннем возрасте), позволяющее своевременно начать оптимальное для данного конкретного случая лечение, является очень важной.

Идиопатический сколиоз (ИС или (IS) Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) number 181800) характеризуется трехмерной деформацией грудного и/или поясничного отдела позвоночника, причем ведущую роль в механогенезе деформации играет торсия (скручивание вокруг вертикальной оси). Если определять идиопатический сколиоз, как искривление позвоночника (угол Кобба) по крайней мере, в 10° , то он является наиболее частой деформацией позвоночника и встречается от 0,5% до 10% подростков во всех человеческих популяциях [1]. Бурное развитие заболевания обычно случается в период быстрого роста в подростковом возрасте и характеризуется двумя выраженными факторами риска – потенциалом роста и принадлежностью к женскому полу. Начальные стадии развития заболевания часто остаются незамеченными, поскольку не доставляют пациентам явных неудобств. Современная возрастная классификация сколиоза (относится к идиопатической и иным формам сколиотической болезни) выделяет следующие формы в зависимости от возраста диагности деформации позвоночника: инфантильные (до 4 лет), ювенильные (от 4 до 10 лет), сколиозы подростков (11-20 лет), сколиозы взрослых (старше 20 лет) [2]. Обычно идиопатический сколиоз выявляется попутно в ходе медицинских осмотров по другим поводам, в ходе плановых осмотров школьников или при плановой флюорографии. Нередко, деформации позвоночника у детей выявляются на стадиях, когда угол Кобба превышает 10° . Такие дети должны попадать в группы пристального наблюдения и проходить частые медицинские освидетельствования для того, чтобы выявить прогресс в развитии заболевания и принять правильное и своевременное решение о выборе метода лечения – консервативного либо хирургического. Под определение «идиопатический сколиоз» попадают все деформации позвоночника, развившиеся без видимых причин после рождения ребенка (<http://www.srs.org/>). При этом выделяется также и врожденный сколиоз, и в медицине часто под этим понимают деформации позвоночника, заметные при рождении ребенка. Наследование идиопатического сколиоза изучается уже много десятилетий, и выяснилось, что оно является в целом сложным, хотя в литературе описаны семьи с явным Менделеевским принципом передачи этого заболевания в поколениях [3]. В целом, популяционные исследования показывают, что у больного идиопатическим сколиозом 11,1% родственников 1-й степени родства имеют деформации позвоночника, по сравнению с 2,4% у родственников 2-й степени родства, и 1,1% у родственников 3-й степени [4].

Наличие большого количества литературных данных о связи ряда генов и некоторых наследственных мутаций в этих генах с развитием идиопатических сколиозов дает основание для использования таких данных в разработке молекулярно-генетического теста для выявления наследственной предрасположенности к сколиозам. Таким тестом может быть ДНК-микрочип, и его создание для выявления специфических мутаций позволит

одновременно анализировать все помещенные на него маркеры, и получать более полную информацию об имеющихся у пациента наследственных патогенных мутациях, связанных с развитием сколиоза. Это существенно ускорит, упростит и удешевит анализ геномов пациентов, и полученная информация поможет врачу выбрать стратегию и тактику лечения заболевания, то есть, обусловит персонализированный подход к лечению. Создание такой тест-системы впервые проводится на территории России.

В Сибирско-Дальневосточном регионе проживают не только представители европеоидной расы, но и монголоидной: буряты, тувинцы, хакасы, якуты и другие восточно-азиатские и североазиатские народы. Поскольку они имеют родство и давние исторические связи с другими народами восточной и юго-восточной Азии, для которых выявлены генетические маркеры сколиозов, то вполне возможно найти такие же маркеры и в российских популяциях монголоидов. Популяция европеоидов в Сибирском регионе тоже имеет свои особенности из-за активной миграции из центральных областей России и Восточной Европы и смешивания с местными и среднеазиатскими монголоидами; в популяции европеоидов Сибири могли сформироваться свои уникальные наборы маркеров предрасположенности к сколиозам. Кроме того, сибирская популяция в целом может характеризоваться отличными от других популяций частотами встречаемости таких маркеров. На территории России подобных исследований не проводили, и специфичные маркеры сколиозов для этой территории не описаны.

Разработанный ДНК-микрочип позволит провести исследования на репрезентативной выборке пациентов со сколиозами разной этиологии, проходивших лечение в Новосибирском НИИТО для выявления специфичных для данной популяции маркеров наследственной предрасположенности к сколиозам, а также для выявления ассоциаций определенных маркеров с разными формами сколиоза.

2 ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка тест-системы на основе ДНК-микрочиповой технологии для выявления генетической предрасположенности к идиопатическому сколиозу.

3 ЗАДАЧИ

3.1 Пронализировать отобранные в литературных источниках однонуклеотидные полиморфные локусы для обоснования их включения в список потенциальных генетических маркеров идиопатического сколиоза.

3.2 Разработать последовательность олигонуклеотидов, содержащих выбранные патогенные мутации, и провести анализ этих последовательностей с помощью специализированных компьютерных программ.

3.3 Синтезировать олигонуклеотиды для печати на ДНК-микрочипе.

3.4 Сформировать группы пациентов с различными формами идиопатического сколиоза для последующего анализа их геномов на выявление специфических мутаций, ассоциированных с развитием идиопатического сколиоза.

3.5 Собрать образцы крови у пациентов и, по возможности, у их родственников. Выделить из образцов крови ДНК.

3.6 Напечатать партию ДНК-микрочипов, провести на них гибридизацию меченых зондов из ДНК пациентов. Оценить результаты, внести изменения в протоколы печати и процессинга микрочипов.

3.7 Адаптировать ПО для интерпретации результатов сканирования микрочипов.

3.8 Оценить возможности созданного микрочипа в выявлении мутаций, в дискриминации «мутантных» и «нормальных» вариантов однонуклеотидных полиморфных локусов.

4 НАУЧНАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

ДНК-микрочип для выявления генетической предрасположенности к идиопатическому сколиозу найдет применение в ортопедических клиниках при исследованиях пациентов и выяснении причин возникновения заболевания, для правильной постановки диагноза и принятия решения о методах лечения. Использование такого микрочипа в скрининговых исследованиях позволит выявлять детей с риском возникновения сколиоза, и принимать своевременные меры для предотвращения его развития.

Применение метода в масштабах страны обещает большой экономический эффект (экономия сил и средств медицинской службы) и улучшение качества жизни детей и их родителей.

Информирование медицинской и самой широкой общественности о ходе выполнения и результатах исследования представляется необходимым, так как это облегчит внедрение разработанного метода ранней диагностики сколиоза в медицинскую практику. Популяризация продукта возможна как через средства массовой информации, так и путем лекций, мастер-классов, семинаров и т.д.

Возможность ранней диагностики собственно болезни и степени ее злокачественности (скорость прогрессирования деформации позвоночника) позволит снять проблемы, связанные с многолетним наблюдением и прогнозом у огромного количества пациентов (сколиозом болеет до 1,5% населения).

Отсутствие болезни или достоверная доброкачественность ее течения, верифицированные с помощью разрабатываемого метода, освободят от постоянных визитов к врачу и обследований многие тысячи больных. В то же время, пациенты со злокачественным течением своевременно диагностированной патологии будут подвергнуты лечению (корсетотерапия, хирургическая коррекция и стабилизация позвоночника) в оптимальные сроки и с наилучшим результатом, что снимет актуальную на сегодня в России проблему т.н. «запущенных» сколиозов (более 90°). Применение метода в масштабах страны обещает большой экономический эффект (экономия сил и средств медицинской службы) и улучшение качества жизни детей и их родителей.

5 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования: пациенты с диагностированными сколиозами различных форм из отделения детской и подростковой вертебрологии ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России и из специализированной школы-интерната №133 для детей, больных сколиозом (г. Новосибирск), а также их ближайшие родственники (родители, братья или сестры) – всего 100 образцов.

Литературные и геномные базы данных (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>; <http://omim.org>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.1000genomes.org>).

Технология анализа генома на ДНК-микрочипах представлена на рисунке 1.



Рисунок 1 - Схема проведения анализа ДНК на микрочипах.

Сбор образцов венозной крови (5 мл) проводился во время клинического обследования пациентов с согласия их родственников. Одновременно образцы крови брались у родственников при их согласии участвовать в исследовании. Кровь забиралась в вакуумные пробирки, содержащие EDTA для предотвращения свертывания крови. После доставки образцов крови в лабораторию пробирки с кровью центрифугировались для разделения цельной крови на фракции, и лейкоцитарная фракция отбиралась автоматической пипеткой в отдельную пробирку. После чего, обе пробирки – с лейкоцитарной фракцией и остатком крови – замораживались и хранились в морозильнике при температуре -80°C . Геномная ДНК выделялась при помощи High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) по протоколу производителя. После проверки качества ДНК и измерения ее концентрации на спектрофотометре NanoDrop 2000 от Thermo Scientific, образцы ДНК хранились до использования в морозильнике при -80°C .

Для приготовления меченных зондов из образцов ДНК для гибридизации на микрочип использовали набор реагентов «BioPrime Total Genomic Labeling System» от Invitrogen, кат. № 18097-011. ДНК метили флуоресцентными красителями Alexa Fluor 3 или Alexa Fluor 5, которые аналогичны по свойствам широкоиспользуемым Cy 3 и Cy 5. Процедуру мечения проводили в соответствии с протоколом производителя.

Очистку меченых зондов от не включившейся метки проводили набором «BioPrime Purification Module» от Invitrogen, кат. № 46-6335. После очистки, концентрацию меченой ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 от Thermo Scientific, и полученные зонды хранили при -20°C до использования.

Последовательности олигонуклеотидов, содержащих однонуклеотидные полиморфизмы (маркеры), брались из геномной базы данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

Длина олигонуклеотида, рассчитывалась с использованием онлайн-программы <http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html> в зависимости от температуры плавления олигонуклеотида. Все олигонуклеотиды для печати на подложку уравнивались по температуре плавления равной 620C .

Синтез разработанных олигонуклеотидов был заказан в одной из компаний, предлагающих такую услугу. После синтеза, олигонуклеотиды были разведены деионизированной водой до концентрации 100 нг/мкл. При подготовке для печати на подложку олигонуклеотиды разводились 1/1 буфером для печати от «Arrayit» с конечной концентрацией 50 нг/мкл.

Печать олигонуклеотидов на стеклянные носители Super Epoxy 2, кат. № SME2 от «Arrayit» производилась на принтере SpotBot® Personal Microarrayer Complete кат. № SPA3XP от того же производителя. Каждый олигонуклеотид печатался в трех повторах с расстоянием между точками равным 175 микрометрам в строках и столбцах. Стеклянный носитель имел размеры 75x25x1 мм и был покрыт эпоксидным составом для лучшего сцепления олигонуклеотидов с поверхностью. После печати, стекла с напечатанными микрочипами выдерживались в термостате при температуре 80°C в течение 1 часа для лучшей фиксации олигонуклеотидов. Готовые микрочипы хранились в закрытых пластиковых коробках при комнатной температуре.

Перед гибридизацией меченных зондов на микрочипы, последние обрабатывались в блокирующем растворе для «забивки» свободной поверхности стекла и снижения неспецифической светимости фона. Для этого использовали буфер – x3,5 SSC, 0,1% SDS в 10% растворе альбумина человека. Стекла с микрочипами выдерживали в этом буфере при температуре 30°C в течение 1 часа. После чего промывали в дистиллированной воде 5 мин и высушивали на центрифуге.

Для гибридизации смешивали меченный зонд с буфером HybIt®Hybridization Solution от «Arrayit», кат. № NHS, прогревали 5 мин при 95°C и наносили на прогретое до 62°C стекло с микрочипом, закрывали покровным стеклом и помещали в герметичной камере в термостат на 62°C на 4-16 часов.

После гибридизации стекла с микрочипами промывали при комнатной температуре в буферах от «Arrayit» (табл. 1), ополаскивали водой и высушивали на центрифуге

Таблица 1- Условия, необходимые для отмывки ДНК-микрочипов после гибридизации

Буфер	Каталожный номер	Время промывки
Microarray Wash Buffer A	WBA	10 мин
Microarray Wash Buffer B	WBB	10 мин
Microarray Wash Buffer C	WBC	5 мин
H ₂ O	-	1 мин

Микрочипы сканировали на Agilent SureScan Microarray Scanner Bundle, кат. № G4900DA от «Agilent». Для анализа сканов микрочипов, оценки интенсивности сигналов и других характеристик микрочипов использовали программное обеспечение Feature Extraction Software License, кат. № G4461AA от «Agilent», адаптированное под формат созданного ДНК-микрочипа для выявления генетической предрасположенности к идиопатическим сколиозам.

Интенсивность сигналов от «мутантного» и «нормального» вариантов каждого маркера представляли в виде графиков.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 ОТБОР И АНАЛИЗ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ – ВОЗМОЖНЫХ КАНДИДАТОВ В ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ИДИОПАТИЧЕСКИХ СКОЛИОЗОВ ДЛЯ РАЗМЕЩЕНИЯ ИХ НА ДНК-МИКРОЧИПЕ

Идиопатический сколиоз [ИС или (IS) Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) number 181800)] характеризуется трехмерной деформацией грудного и/или поясничного отдела позвоночника, причем ведущую роль в механогенезе деформации играет торсия (скручивание вокруг вертикальной оси). Если определять идиопатический сколиоз, как искривление позвоночника (угол Кобба) по крайней мере, в 10° , то он является наиболее частой деформацией позвоночника и встречается от 0,5% до 10% подростков во всех человеческих популяциях. Бурное развитие заболевания обычно случается в период быстрого роста в подростковом возрасте и характеризуется двумя выраженными факторами риска – потенциалом роста и принадлежностью к женскому полу. Начальные стадии развития заболевания часто остаются незамеченными, поскольку не доставляют пациентам явных неудобств. Обычно идиопатический сколиоз выявляется попутно в ходе медицинских осмотров по другим поводам, в ходе плановых осмотров школьников или при плановой флюорографии. Нередко, деформации позвоночника у детей выявляются на стадиях, когда угол Кобба превышает 10° . Под определение «идиопатический сколиоз» попадают все деформации позвоночника, развившиеся без видимых причин после рождения ребенка (<http://www.srs.org/>). При этом выделяется также и врожденный сколиоз, и в медицине часто под этим понимают деформации позвоночника, заметные при рождении ребенка. Собственно, медицинская классификация сколиозов, в основном, и строится на этих отличиях. Недавнее исследование на больших популяционных выборках с участием одно- и разнояйцовых близнецов достоверно показало, что заболевание идиопатическим сколиозом генетически детерминировано. Закономерно возникла необходимость попытаться найти генетические основы этого заболевания, то есть, гены, мутации в которых могут вызывать развитие сколиоза.

В своем обзоре [5] мы представили данные из литературных источников о связи ряда генов и мутаций в них с развитием и протеканием сколиозов различной этиологии. Мутации могут являться не только причинами каких-либо заболеваний, но и быть молекулярными маркерами этих заболеваний, если они не затрагивают важных частей генов, и это позволяет использовать их в разработке инструмента или метода для выявления генетической предрасположенности к заболеванию. Набор молекулярных признаков (маркеров) сколиоза оказался достаточно большим, что определило выбор ДНК-микрочиповой технологии, как наиболее подходящей, для анализа геномов на наличие таких признаков. Создание ДНК-микрочипа для выявления специфических мутаций позволит одновременно анализировать все помещенные на него маркеры, и получать более полную информацию о генетическом бэкграунде пациента – имеющих у него наследственных мутаций в генах, связанных с развитием сколиоза. Такой анализ позволит выявлять детей с риском развития у них сколиоза, в некоторых случаях определять характер протекания заболевания и прогнозировать результаты лечения. Такие дети должны попадать в группы пристального наблюдения и проходить частые медицинские освидетельствования для того, чтобы выявить прогресс в развитии заболевания и принять правильное и своевременное решение о выборе метода лечения – консервативного либо хирургического.

В Новосибирском НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна разработан ДНК-микрочип, для которого был сформирован набор однонуклеотидных полиморфных локусов (ОНП) или в английском варианте «single nucleotide polymorphism» (SNP), являющихся маркерами предрасположенности к заболеванию идиопатическим сколиозом, для размещения на микрочипе. Создание собственной тест-системы обусловлено тем, что популяции из разных регионов мира характеризуются своими генетическими маркерами

предрасположенности к сколиозам. Основное количество научных публикаций, связанных с выявлением генетических причин сколиозов или с поиском генетических маркеров, ассоциированных с этим заболеванием, основано на результатах, полученных на выборках пациентов из Юго-Восточной Азии: Китай, Корея, Япония. Небольшая часть публикаций приходится на регионы Западной Европы: Италия, Финляндия, Испания. Подобные исследования не проводились на территории России вообще, и в Сибирском регионе, в частности. Популяции россиян могут быть по-своему уникальными, поскольку формировались и развивались в значительной степени изолировано от Юго-Востока Азии и от Западной Европы, а потому, в них могут быть свои специфичные генетические маркеры, либо частоты известных маркеров в них могут быть отличными от других популяций.

Испытания созданного ДНК-микрочипа на выборке пациентов Новосибирского НИИТО им. Я.Л. Цивьяна, в котором проходят лечение жители всего Сибирского Региона, включая Дальний Восток и среднеазиатские страны, позволит выявить пригодность выбранных ОНП и корректно сформировать список наиболее часто встречающихся на территории Сибири генетических маркеров сколиозов. На основе набора верифицированных маркеров предполагается создание тестовой системы для ранней диагностики генетической предрасположенности к развитию идиопатических сколиозов и прогностики течения заболевания.

В настоящем исследовании проведен анализ 80 генетических маркеров, выявленных в специализированной литературе, с обоснованием причин включения их в список потенциальных маркеров идиопатического сколиоза, на основе которого создается тест-система. Обозначения однонуклеотидных полиморфных локусов и генов приводятся в соответствии с общепринятыми аббревиатурами.

1.1 Обоснование включения однонуклеотидных полиморфных локусов в список потенциальных маркеров предрасположенности к идиопатическому сколиозу

- Ген ESR1 (Estrogen receptor1): rs9340799 (XbaI site). Из 219 обследованных китайских пациентов, подвергшихся корсетотерапии [6], у 162 она дала положительный эффект, и у 57 эффекта не было или угол искривления позвоночника увеличился. В группе с положительным эффектом частоты аллелей А (норма) и G (мутант) были 88% и 12%, а в группе с отрицательным эффектом – 72,9% и 27,1%. Притом, что средние значения частот этих аллелей в азиатской популяции – 80,7% и 19,3% по данным проекта «1000 геномов». В этой выборке аллель G достоверно чаще встречается у пациентов, которым корсетотерапия не принесла ожидаемого эффекта. Средние частоты этих аллелей в европейской популяции равны 69,1% и 30,9%, и можно ожидать, что пациентов европейского происхождения, для которых корсетотерапия окажется неэффективной, будет больше. rs2234693 (PvuII site). В китайской выборке пациентов с идиопатическим сколиозом [7] аллель С (норма) встречался с частотой 30,6% и аллель Т (мутант) с частотой 69,4% в группе с двойной кривизной позвоночника против 44% (С) и 56% (Т) в контрольной группе. В целом по азиатской популяции эти аллели имеют частоты – 39,9% и 60,1%, а в популяции европейцев – 42,2% и 57,7%. Можно ожидать, что такая же корреляция Т аллели ОНП rs2234693 с развитием двойной кривизны позвоночника мы внесли этот полиморфный локус в список маркеров для размещения на микрочипе.

- Ген TPH1 (Tryptophan hydroxylase 1). В группе китайских пациентов с положительным эффектом корсетотерапии [8] частоты аллелей ОНП rs10488682 были 90,4% (Т – норма) и 9,6% (А – мутант), а в группе с отрицательным эффектом – 83,8% и 16,7%. Средние значения частот этих аллелей в азиатской популяции – 86,7% и 13,3%, а в европейской – 74% и 26%, что оправдывает внесение ОНП rs10488682 в список маркеров. Аллель А этого полиморфного локуса статистически достоверно связана с устойчивостью пациентов с идиопатическим сколиозом к корсетотерапии.

- Район семнадцатой хромосомы 17q24.3 возле генов SOX9 and KCNJ2. rs12946942. Репрезентативные выборки из японской и китайской популяций показали достоверную связь этого локуса со степенью выраженности сколиоза [9]. Частота мутантной аллели Т в выборке японских пациентов составила 27,4% против 20,3% в контроле, и в выборке китайских пациентов – 39,2% против 28,8% в контроле. Средняя частота аллели Т в азиатской популяции составляет 22,9% у мужчин, и 25,9 у женщин. Однако, в североамериканской выборке пациентов с европейским происхождением [10] не выявили связи rs12946942 со сколиозом, что вполне объяснимо, поскольку средняя частота аллели Т в европейских популяциях низка – 10,4% у мужчин и 8,3% у женщин. Можно предположить, что в сибирском регионе частота аллели Т будет достаточно высока из-за довольно значительной доли представителей народов Восточной Азии.

- Ген CHD7 (Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7). rs4738824. Группа из Техасского Университета [11] проанализировала 52 семьи, в которых имеются случаи заболевания сколиозом, и выявила несколько однонуклеотидных полиморфизмов в гене CHD7, которые в той или иной степени нарушают работу этого гена, что возможно ведет к развитию сколиозов у носителей мутантных аллелей. Для ОНП rs4738824 была выявлена неслучайная передача мутантной аллели А в поколениях обследованных семей, и показана достоверная связь этой мутации со сколиозом. Частота этой аллели в европейской популяции достаточно высока – 20,8% у мужчин, и 24,7% у женщин. В восточноазиатской популяции эта частота низкая – 5,7% у мужчин и 5,3% у женщин. Этот ОНП включен в список маркеров предрасположенности к сколиозу. Эта же группа показала высокую достоверность связи Т аллели ОНП rs1038351с проявлениями сколиоза в исследованных семьях. Средняя частота этой аллели в европейских популяциях 23,9%, в восточноазиатских популяциях – 6,2%, можно ожидать, что в сибирской популяции удастся выявить связь этого ОНП со сколиозом. Согласно результатам, полученным в том же исследовании, полиморфный локус rs7843033 также достоверно связан с проявлениями сколиоза при семейном анализе. И так же, средняя частота мутантной аллели С в европейских популяциях существенно выше, чем в восточноазиатских: 23,9% против 6,9%. ОНП внесен в список маркеров. Для полиморфного локуса rs7000766 была выявлена неслучайная передача мутантной аллели G в поколениях обследованных семей, и показана достоверная связь этой мутации со сколиозом. Авторы высказывают гипотезу, что все эти мутации в гене CHD7 влияют на связывание с каудальным гомеобоксным фактором транскрипции, необходимым для предшествующих/последующих позиционных сигналов и соответствующего эмбрионального осевого развития в модельных организмах. Как и для предыдущих ОНП в этом гене, наибольшая частота мутантной аллели G – 23,4% выявлена в европейской популяции, а наименьшая – 6,5% в азиатской. Локус внесен в список маркеров.

- Район третьей хромосомы 3p26.3 возле генов CHL1 и LOC642891. Еще одна группа ученых из Техасского Университета [12] в трех репликативных исследованиях изучили 419 семей, в которых встречались случаи заболевания сколиозом, и выявили несколько ОНП в непосредственной близости от генов CHL1 и LOC642891. Для этих ОНП была показана достоверная связь с проявлениями сколиозов у носителей мутантных аллелей в полиморфных локусах rs10510181, rs1400180, rs9754850 и rs9754552. Согласно базе данных проекта «1000 геномов» средняя частота мутантной аллели А полиморфного локуса rs10510181 в европейской популяции составляет 34,3%, а в азиатской – 50,9%, а средняя частота мутантной аллели G полиморфного локуса rs1400180 в европейской популяции составляет 42%, и в азиатской – 52,2%. Средняя частота мутантной аллели С локуса rs9754850 в европейских популяциях составляет 52,9%, в азиатских популяциях – 5,3%, средняя частота мутантной аллели G локуса rs9754552 в европейских популяциях составляет 52,8%, а в азиатских популяциях – 5,4%. В общей выборке североамериканских семей разница в частотах встречаемости мутантных аллелей этих локусов между контрольной группой и группой с диагностированным сколиозом, хотя и не большая, но статистически достоверная. Когда же, в анализе оставили только семьи европейского происхож-

дения, то эта разница выросла. Все четыре полиморфных локуса включены в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

- Ген GPR126 (G protein-coupled receptor 126): Японская исследовательская группа [13] выявила полиморфный локус rs6570507 в интроне гена, про который известно, что его «выключение» вызывает задержку оссификации при развитии позвоночника, по крайней мере, у рыбок данио. Мутации в этом локусе статистически чаще встречается в Японии у больных сколиозом, чем в контрольных выборках. Ассоциация аллели G с проявлениями сколиоза была также найдена в китайской [14] и европейской выборках. По данным проекта «1000 геномов» частота этой аллели в европейских популяциях в среднем составляет 68,2%, а в азиатских – 59,9%. Учитывая высокую частоту встречаемости этой аллели среди азиатов и европейцев, локус rs6570507 был включен в список маркеров предрасположенности к сколиозу. Группа ученых из Китая [14] провела молекулярно-генетический анализ большой выборки пациентов с диагностированным сколиозом, и выявила, что два полиморфных локуса rs7774095 и rs7755109, расположенных в интронах гена GPR126 статистически достоверно связаны с проявлениями сколиоза у носителей мутантных аллелей C и G, соответственно, этих локусов. Средняя частота встречаемости аллели C в европейских популяциях – 68,1%, в азиатских – 61,1%, а аллели G – 32,2% у европейцев, и 39,6% у азиатов. Авторы не обнаружили фактов влияния интронных полиморфных локусов в гене GPR126 на альтернативный сплайсинг его матричной РНК, однако, выявили строгую связь мутантной аллели G локуса rs7755109 с пониженными уровнями матричной РНК и белка. Ген GPR126 активно экспрессируется в хряще, и блокирование (knockdown) этого гена у зародышей рыбки данио приводит к задержке оссификации развивающегося позвоночника. ОНП rs7774095 и rs7755109 были внесены в список маркеров, ассоциированных с развитием сколиоза.

- Ген MTNR1B (Melatonin Receptor 1B). Исследователи из Гонконга [15] провели двухстадийное исследование репрезентативных выборок с целью поиска полиморфных локусов в гене MTNR1B, и обнаружили в его промоторной зоне ОНП rs4753426, чья аллель C достоверно связана с проявлениями сколиоза у носителей этой аллели. Другой полиморфный локус rs741837, находящийся рядом с промотором, также достоверно связан с проявлениями сколиоза. Аллель T этого локуса чаще встречается в группе пациентов. Средняя частота аллели C локуса rs4753426 у европейцев равна 50,2%, у азиатов – 71%, частота аллели T локуса rs741837 у европейцев равна 42,3%, у азиатов – 43%. Оба локуса были включены в список молекулярных маркеров сколиоза.

- Ген NTF3 (Neurotrophin-3). Достоверная выборка китайских пациентов с диагностированным сколиозом и соответствующая контрольная группа были исследованы коллективом авторов [16], которые обнаружили в промоторном регионе гена NTF3 полиморфный локус rs11063714, который не был связан с появлением сколиоза, как такового, однако, у пациентов с генотипом AA средние значения максимального угла Кобба были ниже, чем у пациентов с генотипами AG и GG. Кроме того, пациенты с генотипом AA значительно лучше отзывались на корсетотерапию, чем пациенты с генотипом GG. Согласно базе данных «1000 геномов» частота аллели A в европейской популяции равна 1,4%, а в азиатской – 47,2%. Полиморфизм rs11063714 включен в список молекулярных маркеров.

- Ген TIMP2 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 2). Группа китайских исследователей [17] разделила пациенток с идиопатическим сколиозом на 2 группы по типу искривления позвоночника и проделала молекулярный анализ зоны промотора гена TIMP2 у этих пациенток и соответствующей группы контроля, и выявила, что полиморфный локус rs8179090 из промоторной зоны гена TIMP2 не связан с возникновением идиопатического сколиоза, как такового, однако связан с тяжестью искривления грудного отдела позвоночника. Частота аллели C была значительно выше в группе пациенток, у которых угол искривления грудного отдела позвоночника (угол Кобба) был 40° и больше, чем в группе пациенток с углом Кобба меньше 40°. Хотя, в европейской популяции частота аллели C

равна всего 0,5%, то в азиатской популяции она равна 15,1%. В Сибирском регионе проживает значительная часть представителей народов Центральной и Восточной Азии, поэтому молекулярный маркер тяжести протекания сколиоза rs179090 был включен в список маркеров для размещения на ДНК-микрочипе.

- Ген IL-17RC (interleukin-17 receptor C). Группа китайских ученых [18] на выборке из 529 девочек с диагностированным сколиозом показала статистически достоверную связь G аллели полиморфного локуса rs708567, находящегося в интроне гена IL-17RC с проявлениями сколиоза. Кроме того, они показали, что частота аллели G и генотипа GG выше в той группе пациентов, у которых средний максимум угла Кобба выше. Сходные результаты были получены на группе европейских пациентов [19]. Нужно отметить, что средняя частота аллели G в популяциях юго-восточной Азии равна 90,7%, и в этом случае резоннее было бы говорить об ослабляющем эффекте аллели A, поскольку его частота в контрольной группе выше, чем у пациентов. В европейских популяциях средняя частота аллели G составляет 45,6%, и повышенная по сравнению с контролем частота этой аллели в группе пациентов, возможно, указывает на связь локуса rs708567 с возникновением и протеканием сколиоза. Мы решили внести этот полиморфный локус в список маркеров, по крайней мере, на исследовательский период.

- Ген TGFB1 (Transforming growth factor beta 1). Коллектив российских ученых [20] на выборке в 300 пациентов с идиопатическим сколиозом из центральной России выявил связь полиморфного локуса rs1800469 из промотора гена TGFB1 (трансформирующий ростовой фактор бета 1) с возникновением и проявлением болезни. Наличие в геноме аллели T или генотипа TT значительно увеличивает риск возникновения сколиоза, как у мальчиков, так и у девочек. Однако, в проявлении болезни, степени искривления позвоночника, выявлен половой диморфизм – у девочек наличие аллели T приводит к более раннему появлению болезни и более тяжелому ее протеканию, чем у мальчиков. Группа китайских авторов [21] на большой выборке пациентов не нашла значимой разницы в частоте аллели T у них и в контрольной группе. Однако, у пациентов с генотипом TT искривление позвоночника (угол Кобба) было значительно сильнее, чем у пациентов с генотипом CT и CC. Среднепопуляционная частота аллели T в Европе составляет 31,2%, а в юго-восточной Азии 54,7%. Возможно, эта разница и обуславливает различие в результатах, полученных на выборках из России и Китая. Полиморфный локус rs1800469 был включен в список маркеров возникновения и протекания идиопатического сколиоза.

- Ген MATN1-AS1 (Matrilin 1 antisense RNA 1). Китайские ученые из Нанкинского университета [22] проанализировали геномы 419 пациентов, и обнаружили, что аллель G однонуклеотидного полиморфного локуса rs1149048, расположенного в промоторе гена матрилин-1, достоверно чаще встречается при диагностированном сколиозе, чем в контрольной группе. Индивидуумы с генотипом GG имеют более высокий риск возникновения сколиоза, чем с генотипами AG и AA. Кроме того, у пациентов с генотипом GG средний максимум угла Кобба был выше, чем у пациентов с генотипами AG и AA. Другая группа китайских ученых [23] провела мета-анализ результатов исследований геномов у пациентов с идиопатическим сколиозом, и сделала заключение, что аллель G полиморфного локуса rs1149048, и генотип GG статистически достоверно ассоциирован с риском развития сколиоза, особенно в азиатских популяциях. В европейских популяциях они такой связи не выявили. По данным «1000 геномов», средняя частота G аллели в восточно-азиатских популяциях составляет 60,3%, а в европейских – 46,8%. Мы включили ОНП rs1149048 в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

- Ген MMP3 (matrix metalloproteinase-3). Итальянские исследователи [24] обнаружили, что генотип 5A/5A полиморфного локуса rs3025058, расположенного в промоторной зоне гена MMP3, почти в три раза чаще (30.2% против 11.2%) встречается у пациентов с идиопатическим сколиозом, чем в контрольной группе. Болгарские [25] и китайские [26] ученые такой связи не выявили. Частоты аллели 5A локуса rs3025058 в некоторых европейских популяциях мы нашли в базе данных «Alfred» (<https://alfred.med.yale.edu/>), и там

для французской выборки указана частота этой аллели в 51,7%, а для испанской выборки – 47,6%, что значительно выше этого показателя для китайской популяции, указанного в той же базе, и равного 9,9%. Несмотря на такие расхождения в результатах исследований, мы внесли полиморфный локус rs3025058 в список маркеров предрасположенности к сколиозу, по крайней мере, на исследовательском этапе.

- Ген IL-6 (Interleukin 6). Упомянутая выше болгарская группа [25] выявила статистически достоверную связь между полиморфным локусом rs1800795 в промоторе гена IL-6 и предрасположенностью к сколиозу. Кроме этого, они обнаружили значимую ассоциацию этого локуса со степенью искривления позвоночника у носителей мутантной аллели G. Так же, упомянутая выше команда итальянских ученых [24] обнаружила, что число носителей генотипа GG по локусу rs1800795 в группе пациентов с диагностированным сколиозом почти в 2 раза выше, чем в контрольной группе. Что касается исследования на китайской популяции [26], то в этом локусе полиморфизм отсутствовал, 100% участников из группы пациентов и группы контроля были носителями генотипа GG. Частота аллели G в европейской популяции составляет 58,5%, а в азиатской популяции 99,9%. Локус rs1800795 включен в список маркеров предрасположенности к сколиозу. Группа из Южной Кореи [27] на выборке девочек с идиопатическим сколиозом показала, что полиморфный локус rs1800796 в промоторе гена IL-6 связан с минеральной плотностью костной ткани в поясничном отделе позвоночника. Этот полиморфизм обозначается, как -572G>C, то есть, в минус 572 позиции от старт-кодона гуанин заменяется на цитозин. Таким образом, аллель C является мутантной, но результаты этого исследования показали, что минеральная плотность кости в поясничном отделе у носителей генотипа CC выше, чем у носителей генотипов CG и GG. Китайские ученые [28] провели мета анализ 13 источников, в которых исследовалась связь полиморфного локуса с минеральной плотностью костей и подтвердили, что rs1800796 ассоциирован с минеральной плотностью дистального отдела лучевой кости у восточных азиатов. Частота аллели C в азиатских популяциях равна 79,1%, а в европейских – 4,8%. Хотя, прямой связи этого локуса с предрасположенностью к сколиозу не показано, мы внесли его в список маркеров, по крайней мере, на исследовательский период.

- Ген LAMP4B (Lysosomal-associated transmembrane protein 4B): Группа южнокорейских авторов [29] изучали связь некоторых однонуклеотидных полиморфных локусов с предрасположенностью к сколиозу и тяжестью протекания заболевания. Они обнаружили, что аллель A полиморфного локуса rs2449539, расположенного в одном из интронов гена LAMP4B вносит значительный вклад в предрасположенность к подростковому идиопатическому сколиозу, и что частоты генотипов этого локуса, существенно различаются между контрольной группой, группой пациентов с углом Кобба до 40°, и группой с углом Кобба более 40°. При сравнении трех групп в отдельности, AA генотип был наиболее распространенным в группе пациентов с углом Кобба более 40°, и его частота снижалась в группе пациентов с малым углом Кобба, и была самой низкой в контрольной группе. Соответственно, был сделан вывод, что полиморфный локус rs2449539 в гене LAMP4B может иметь большое значение для выявления предрасположенности к сколиозу, и предсказания тяжести его протекания. Средняя частота аллели A в азиатских популяциях равна 64,7%, в европейских – 97,3%.

- Ген IGF1 (Insulin-like growth factor 1). Эти же авторы обнаружили связь еще одного полиморфного локуса rs5742612, расположенного выше гена IGF1 с предрасположенностью к сколиозу и тяжестью протекания заболевания. Они показали, что частота генотипа AA наиболее низка в контрольной группе и повышается в группах с малым и большим углом Кобба, соответственно. Тем не менее, не было никаких существенных различий в частотах аллелей A и G во всех трех группах из Южной Кореи. Аналогичные результаты были получены китайскими учеными [30]. Однако, на выборке из Японии выявить какой-либо связи этого полиморфного локуса с проявлением и тяжестью протекания сколиоза не удалось [31]. Средняя частота аллели A в азиатских популяциях равна 70,6%, в евро-

пейских – 95,6%. Мы внесли локусы rs2449539 и rs5742612 в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

- Ген TBX6 (T-box 6). Два полиморфных однонуклеотидных локуса, лежащих в экзоне 8 (rs2289292), и в 5'нетранслируемой области (rs3809624) гена TBX6 были проанализированы китайскими авторами [32]. Они обнаружили, что независимый анализ этих двух полиморфных локусов не выявил связи какого-либо из них с врожденным сколиозом. Более того, было выявлено, что оба локуса находятся в строгом неравновесном сцеплении в контрольной группе. Однако, глобальный анализ гаплотипов и индивидуальный анализ гаплотипов показал, что гаплотип SNP1/SNP2 имеет существенную связь с заболеванием, С/Т гаплотип чаще наблюдался в контрольной группе, чем у пациентов с врожденным сколиозом. Другими словами, комбинация rs2289292Т/rs3809624С – индикатор высокого риска врожденного сколиоза, комбинация rs2289292С/rs3809624Т – индикатор низкого риска врожденного сколиоза. Хотя выявленный эффект был обнаружен только в выборке из Китая, мы внесли оба полиморфных локуса в список маркеров.

- Ген DOT1L (Disruptor of telomeric silencing 1-like). Группа китайских исследователей [33] на выборке из 500 пациентов с диагностированным сколиозом выявила статистически достоверную связь однонуклеотидного полиморфного локуса rs12459350, находящегося в интроне гена DOT1L, с предрасположенностью к подростковому идиопатическому сколиозу. Эффект наличия аллели G этого полиморфного локуса заключается в ускоренном росте в подростковом периоде и, как следствие, частом искривлении позвоночника. Связи этой аллели со степенью кривизны позвоночника выявлено не было. Средняя частота аллели G, в азиатских популяциях составляет 44,3%, в европейских – 50,6%. Полиморфный локус rs12459350 внесен в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

- C17orf67 - Открытая рамка считывания 67 на 17 хромосоме. Та же группа исследователей [33] обнаружила достоверную связь аллели A однонуклеотидного полиморфного локуса rs4794665 с ускоренным ростом в подростковый период и увеличенным ростом у взрослых, и показала, что носительство этой аллели является фактором риска развития идиопатического сколиоза. Однако, наличие этой аллели никак не связано со степенью искривления позвоночника. Американские исследователи [34] на выборке из 8184 подростков европейского происхождения такой связи не выявили, как и большая международная группа в своем мета-анализе однонуклеотидных полиморфизмов, связанных со скоростью роста у подростков [35]. Однако, другой международный коллектив авторов [36] показал, что частоты минорных аллелей некоторых ОНП, в частности rs4794665, являются этнически специфичными, то есть, сильно различающимися в кавказской и монголоидной расах, по крайней мере, у китайцев. По данным проекта «1000 геномов» частота аллели A в восточноазиатской популяции равна 19,5%, а в европейской – 47,4%. Мы внесли локус rs4794665 в список потенциальных маркеров сколиоза, поскольку популяция Сибирского Федерального округа имеет свои особые характеристики (см. ниже).

- Ген LBX1-AS1 (Ladybird Homeobox 1 - Antisense RNA 1). Китайские исследователи [37] на выборке из 513 пациентов показали, что аллель G однонуклеотидного полиморфного локуса rs625039, находящийся в интроне гена, статистически достоверно связана с предрасположенностью к идиопатическому сколиозу, однако они не выявили связи этой аллели со степенью искривления позвоночника (угол Кобба). Группа исследователей из Японии [9] в двухстадийном исследовании ассоциаций маркеров и признаков на общей выборке в 12 тысяч участников также показали достоверную связь аллели G локуса rs625039 с предрасположенностью к сколиозу. И еще одна группа из Китая [38] показала на мета-анализе, основанном на исследовании 34626 субъектов, что эта аллель увеличивает предрасположенность к сколиозу у азиатов. Частота аллели G в азиатской популяции согласно проекту «1000 геномов» равна 65,3%, а в европейской популяции – 87,9%, однако, мы не обнаружили исследований связи аллели G локуса rs625039 с предрасположенностью к сколиозу, проведенных на выборках из популяций европейцев. Тем не менее,

мы внесли этот полиморфизм в список маркеров сколиоза для размещения на микрочипе. Другая группа китайских ученых [39] провела исследования геномов 4317 пациентов женского пола из китайской популяции с диагностированным подростковым идиопатическим сколиозом, у которых угол кривизны позвоночника (угол Кобба) был более 20°. Они обнаружили достоверную связь с заболеванием однонуклеотидного полиморфного локуса rs678741, находящегося в интроне гена LBX1-AS1. В трех репликативных анализах частота аллели А в группе пациентов достоверно превышала частоту этой аллели в контрольных группах. Средняя частота в европейской популяции минорной аллели А, которая, по-видимому, является аллелью риска, равна 56,4%, в азиатской - 43,6%. Лocus rs678741 внесен в список, как потенциальный маркер предрасположенности к сколиозу.

- Район 10q24.31, рядом с геном LBX1 (Ladybird Homeobox 1). Скандинавские исследователи [40] на выборке из 1739 пациентов показали, что полиморфный locus rs11190870, расположенный ниже гена LBX1 с высокой степенью достоверности связан с идиопатическим сколиозом. Японские исследователи [41] в полногеномном поиске ассоциаций, в который были вовлечены 1376 японских девочек с подростковым идиопатическим сколиозом, выявили статистически достоверную ассоциацию локуса с заболеванием. Упомянутая выше группа китайских ученых [38] в мета-анализе, основанном на исследовании 34626 субъектов, показали строгую связь аллели Т полиморфного локуса rs11190870 с предрасположенностью к сколиозу у азиатов. Канадские ученые [42] в мета-анализе показали строгую связь этого локуса с идиопатическим сколиозом у восточноазиатов. И наконец, группа американских исследователей [43] обнаружила, что locus rs11190870 находится в умеренном неравновесном сцеплении с другим полиморфным локусом rs11190878, который расположен выше гена LBX1, и у которого авторы нашли очень строгую ассоциацию с предрасположенностью к сколиозу. Фактором риска является аллель Т локуса rs11190870, и частота этой аллели в восточноазиатской популяции равна 53,9%, а в европейской – 59,1%. С самой высокой частотой (70,1%) эта аллель встречается в популяциях южной Азии. На основании всех приведенных данных мы включили locus rs11190870 в наш список маркеров идиопатического сколиоза. Лocus rs11190878 мы также внесли в наш список маркеров, хотя о его связи с предрасположенностью к сколиозу упомянуто только в одном исследовании [44]. Ассоциацию еще одного полиморфного локуса rs11598564, расположенного вблизи гена LBX1, с предрасположенностью к идиопатическому сколиозу показали уже упоминавшиеся здесь группы исследователей из Японии [8] и Китая [36]. Их выводы об этой ассоциации были подтверждены мета-анализом [40].

- Ген CALM1 (calmodulin 1). Китайские исследователи [45] показали, что однонуклеотидные полиморфные локусы rs2300496, rs2300500 и rs3213718, расположенные в интронах гена калмодулина 1 надежно коррелируют с предрасположенностью к идиопатическому сколиозу. Аллели С локуса rs2300496, G локуса rs2300500 и С локуса rs3213718 достоверно чаще встречаются в группах пациентов с диагностированным сколиозом, и гомозиготность по любым из этих аллелей сильно увеличивает риск развития сколиоза у носителей таких генотипов. Объединение аллелей риска в гаплотип CGC еще более увеличивает шанс появления сколиоза. Однако, авторы не обнаружили какой-либо связи между аллелями риска, разными генотипами и их сочетаниями в гаплотипах и тяжестью протекания заболевания. Индийские ученые [46] на выборке из 695 пациентов выявили статистически значимую связь полиморфного локуса rs3213718 с тяжелой дегенерацией межпозвоночных дисков в поясничном отделе позвоночника. Частоты аллелей риска в разных популяциях следующие: аллель С локуса rs2300496 в восточной Азии 80,6%, в Европе – 41,8%, в южной Азии – 60,2%; аллель G локуса rs2300500 в восточной Азии 80,6%, в Европе – 41,8%, в южной Азии 60,2%; аллели С локуса rs3213718 в восточной Азии 78,5%, в Европе – 39%, в южной Азии – 56,7%. Все три локуса мы внесли в наш список маркеров идиопатического сколиоза.

- Исследовательская группа из Китая [47] показала, что еще два однонуклеотидных полиморфных локуса: rs12885713, локализованный в промоторе гена CALM1 и rs5871 из 3' нетранслируемой области того же гена находятся в статистически достоверной ассоциации с предрасположенностью к идиопатическому сколиозу. Мутантные аллели Т обоих локусов достоверно чаще встречаются у пациентов с двойной кривизной позвоночника, большим (более 40°) углом Кобба, и апикальной локализацией (между Т2 и Т11-12) основной кривизны. В ранней работе [48] эти авторы показали достоверные различия в частотах аллели Т локуса rs12885713 у пациентов с двойной кривизной и контролем, и частотах аллели Т локуса rs5871 у пациентов с кривизной в грудном отделе и контролем. Они также показали, что аллель Т локуса rs2234693 (PvuII site в гене ESR1) достоверно чаще встречается во всех трех группах пациентов, и предположили, что комбинация этого полиморфизма с мутантными аллелями rs12885713 и rs5871 отягчают развитие болезни. Частота аллели Т локуса rs12885713 в восточноазиатской популяции равна 19,7%, а в европейской популяции она выше – 58,2. Частота мутантной аллели Т локуса rs5871 в восточноазиатской популяции равна 39,1%, в то время, как в европейской – 91,8%, а в южноазиатской – 87,5%. Исследований ассоциаций этих полиморфных локусов и идиопатического сколиоза на выборках пациентов европейского происхождения мы не нашли. Тем не менее, эти локусы внесены в список маркеров предрасположенности к сколиозу, по крайней мере, на исследовательском этапе.

- Ген IL17RC (Interleukin-17 receptor C). Китайские исследователи в двух своих работах [49 и 50] на выборке из 529 девочек подросткового возраста показали, что полиморфный локус rs708567, расположенный в интроне гена, статистически значимо связан с предрасположенностью к сколиозу. А именно, носители аллели G имеют в 1,507 раза больше шансов развития сколиоза, чем носители аллели A, а носители генотипа GG имеют в 1,550 раза больше шансов развития болезни, чем носители генотипа AG. Кроме того, у носителей генотипа GG при развитии болезни угол Кобба больше, чем у носителей генотипа AG. В мета-анализе результатов исследований, посвященных поиску генетических маркеров идиопатического сколиоза, [51] достоверность выявленной ассоциации была подтверждена. Частота мутантной аллели G в этом локусе достаточно высока во всех мегапопуляциях, хотя в восточноазиатской она самая высокая – 90,7%. Локус rs708567 внесен в список маркеров.

- Ген MATN1 (Matrilin 1). Группа южнокорейских ученых [52] обнаружила статистически значимую ассоциацию полиморфного локуса rs1065755 с типом искривления позвоночника, когда сравнивала пациентов с идиопатическим сколиозом (166) и контрольную выборку (126). По их данным аллель A связан с большим риском возникновения сколиоза, чем аллель G. Также, аллель A достоверно чаще встречается в группе больных с двойной кривизной позвоночника, чем в контрольной группе. Этот полиморфизм представляет собой синонимичную мутацию, то есть замену нуклеотида в третьем положении в кодоне, которая не изменяет кодируемую этим кодоном аминокислоту и, следовательно, свойства самого белка. Частота мутантной аллели G в этом локусе также высока во всех мегапопуляциях, а в восточноазиатской популяции она самая высокая – 81,7%. Локус rs1065755 внесен в список маркеров, хотя он упоминается в единственной статье.

- Ген GPER1 (G protein-coupled estrogen receptor 1). Группа китайских исследователей [53] на выборке из 344 пациентов с идиопатическим подростковым сколиозом пытались выявить связь нескольких однонуклеотидных полиморфных локусов: rs3808351, rs10269151 и rs4266553, расположенных в интронах гена GPER1, с предрасположенностью к заболеванию. Четкой связи им найти не удалось, однако, они установили, что гетерозиготы по всем трем локусам статистически значимо связаны со степенью кривизны позвоночника. Японская команда ученых повторила эти исследования [54] на 2117 пациентах, и не нашла достоверных различий в частотах встречаемости аллелей риска у пациентов и контрольной группе. По данным проекта «1000 геномов» частота аллели G (аллель риска) локуса rs3808351 в восточноазиатской популяции – 82%, европейской – 70%,

южноазиатской – 67%; частота аллели G (аллель риска) локуса rs10269151 в восточноазиатской популяции – 93%, европейской – 95%, южноазиатской – 99%; частота аллели G (аллель риска) локуса rs4266553 в восточноазиатской популяции – 7%, европейской – 11%, южноазиатской – 13%. Мы условно внесли эти локусы в наш список маркеров. Частоты аллелей G (аллелей риска) первых двух локусов очень высоки во всех мегапопуляциях, и учитывая результаты китайских ученых, что в группе пациентов достоверно чаще, чем в контроле встречаются гетерозиготы по этим локусам, может оказаться, что аллелями риска будут другие аллели.

- Ген ESR2 (Estrogen Receptor 2). Китайские исследователи [55] на выборке из 218 пациентов показали, что частота генотипов CC однонуклеотидного полиморфного локуса rs1256120 в 5'-нетранслируемой области гена ESR2 достоверно выше в группе пациентов, чем в контрольной группе. На основании этого они пришли к выводу, что этот локус может быть связан с предрасположенностью к идиопатическому сколиозу. Японская группа [56] повторила эти исследования на выборке из 798 пациентов, и не нашла связи локуса rs1256120 со сколиозом. Ученые из Польши [57] также не выявили связи этого локуса с предрасположенностью к сколиозу. И наконец, группа из Канады [58] провела мета-анализ всех исследований и не подтвердила связи указанного локуса с предрасположенностью к идиопатическому сколиозу. На основании всего вышеизложенного мы не стали включать локус rs1256120 в гене ESR2 в список потенциальных маркеров сколиоза.

- Упомянутая выше группа из Польши [57] обнаружила связь другого полиморфного локуса rs4986938 в гене ESR2 со степенью искривления позвоночника при сколиозе. Так, у пациентов с генотипом AA величина угла Кобба была $31,9^\circ \pm 14,2^\circ$; с генотипом AG – $43,2^\circ \pm 17,8^\circ$; и с генотипом GG – $38,9^\circ \pm 19,0^\circ$. Других исследований прямой связи этого локуса со сколиозом мы не обнаружили. Частота аллели G и в восточноазиатской, и в европейской популяциях достаточно высока – 87% и 62%, соответственно. Мы внесли этот локус в список потенциальных маркеров сколиоза.

- Ген MESP2 (Mesoderm posterior protein 2). Группа британских ученых [59] обнаружила редкую мутацию – дупликацию четырех нуклеотидов ACCG в первом экзоне гена MESP2, приводящую к сдвигу рамки считывания, у двух детей со спондилостозом в одной семье. Они оказались гомозиготами по данной мутации, в то время, как их родители с нормальным фенотипом были гетерозиготами, а третий ребенок, также с нормальным фенотипом был гомозиготой по «дикий» аллели. Данных по частоте встречаемости этого полиморфизма нет в базе проекта «1000 геномов», поэтому оценить общую частоту встречаемости патогенной аллели мы не смогли, но внесли этот локус в список потенциальных маркеров. Коллектив американских исследователей [60] изучил 12 семей из Пуэрто Рико, в которых имелись случаи спондилоторакального дизостозиса, и выявила 10 семей с гомозиготными носителями мутации rs71647808 в гене MESP2, приводящей к образованию стоп-кодона и преждевременной терминации трансляции. Все гомозиготные носители мутации были поражены заболеванием в разной степени тяжести, и у всех был сколиоз. Гетерозиготные носители этой мутации не имели внешних проявлений болезни. В том же исследовании авторы обнаружили еще две мутации в гене MESP2 - rs118204035, приводящую к стоп-кодону, и rs71647806, приводящую к замене лейцина в 125 положении на валин. Носители этих мутаций были гетерозиготами и имели нормальный фенотип. Авторы предположили по характеру распространения мутаций, что имеется эффект основателя. Данных по частотам аллелей этих полиморфных локусов в базе данных проектов «1000 геномов» и «Альфред» мы не нашли, но внесли эти локусы в наш список маркеров исключительно из научного интереса.

- Ген SLC6A4 (Solute carrier family 6 member 4). Группа исследователей из США [61] проанализировала участок (18,3Mb - 31,47Mb) хромосомы 17 человека, чтобы найти определенные генетические факторы, связанные с семейным идиопатическим сколиозом. В исследовании участвовало 202 семьи (1198 человек), в каждой из которых имелось, как минимум, 2 человека с диагностированным сколиозом; в 17 семьях были мужчины, кото-

рые перенесли операцию по исправлению позвоночника. Наиболее достоверная связь со сколиозом была выявлена для однонуклеотидного полиморфного локуса rs4325622, находящегося в интроне гена SLC6A4. Аллель риска Т статистически значимо встречался чаще среди больных сколиозом, чем в контрольной группе. Средняя частота аллели Т в европейских популяциях 56,5%, в азиатских 17,7%. В этом же исследовании была обнаружена достоверная ассоциация полиморфного локуса rs2066713, также расположенного в интроне гена SLC6A4, со сколиозом. По данным проекта «1000 геномов» средняя частота аллели риска Т в европейских популяциях равна 38%, в азиатских 6,5%.

- Ген SSH2 (Slingshot protein phosphatase 2). Та же группа обнаружила статистически достоверную ($p > 0.05$) ассоциацию полиморфного локуса rs2467334, локализованного в интроне гена, со сколиозом. Средняя частота аллели риска С в европейской популяции равна 49,9%, а в восточноазиатской – 28,1%.

- Ген BLMH (Bleomycin hydrolase). В этом исследовании была выявлена еще одна ассоциация заболевания сколиозом с однонуклеотидным полиморфным локусом rs7342921, который находится в кодирующей части гена, однако, мутация не приводит к замене аминокислоты, а значит, не нарушает свойства кодируемого белка. Средняя частота аллели риска G в европейских популяциях 67,1%, в азиатских 82,5%.

- Ген RAB11FIP4 (Rab11 family interacting protein 4). Статистически достоверная ассоциация полиморфного локуса rs2074153, находящегося в интроне гена была обнаружена этими же авторами. Средняя частота аллели риска G в европейских популяциях 32,5%, в азиатских 20,3%. Несмотря на то, что все эти ассоциации были описаны только в одном исследовании и только для одной локальной популяции, мы внесли полиморфные локусы rs4325622, rs2066713, rs2467334, rs734292, rs2074153 в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

- Ген CNTNAP2 (Contactin-associated protein 2). Группа авторов из США [62] методом прямого секвенирования провела исследование 1113 геномов из 419 семей европейского (кавказского) происхождения в которых были случаи подросткового идиопатического сколиоза. Ученые проанализировали 326498 однонуклеотидных полиморфных локусов на наличие ассоциации их со сколиозом, и обнаружили статистически достоверную связь локуса rs11770843, находящегося в интроне гена CNTNAP2 с подростковым идиопатическим сколиозом. Группа исследователей из Китая [63] проанализировала выборку пациентов из китайской популяции и не нашла связи между полиморфизмом rs11770843 гена CNTNAP2 и подростковым идиопатическим сколиозом. Как в экспериментальной ($N=100$), так и в контрольной группе ($N=100$) у всех обследованных был генотип Т/Т. В базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) для этого локуса указана замена С на Т (C>T), что подразумевает аллель С, как предковый или «дикий» вариант. Однако, на веб странице этого полиморфизма предковым вариантом уже указана аллель Т. Учитывая среднюю частоту аллели Т в европейских популяциях равной 74%, а в азиатских – 99,3%, предковым вариантом является, скорее, аллель Т, а аллелью риска - С. Тогда результат, полученный китайской группой, объясним, их выборка была мономорфна по этому маркеру. Принимая во внимание результаты американских ученых и частоты аллелей локуса rs11770843 в европейской популяции, мы включили этот локус в список потенциальных маркеров сколиоза.

- Ген ZNF618 (Zinc Finger Protein 618). Упомянутая выше американская группа обнаружила достоверную ассоциацию подросткового идиопатического сколиоза с районом хромосомы 9, лежащем в интервале 9q31.2-34.2. В этом районе были выделены несколько однонуклеотидных полиморфных локусов, один из которых локус rs4979321, находящийся в интроне гена ZNF618, показал хотя и скромную, но статистически значимую связь с заболеванием.

- Ген AMBP (Alpha-1-Microglobulin/Bikunin Precursor). Следующим полиморфным локусом из этого района был rs891725, лежащий в интроне гена AMBP. Для него также была показана статистически значимая связь со сколиозом.

- Ген PALM2 (Paralemmin-2). Полиморфный локус rs1969944 из интрона гена PALM2 также показал статистически значимую ассоциацию с идиопатическим сколиозом, как и локус rs4836643, находящийся в том же районе в межгенном промежутке в позиции 9:129197852. По упомянутым выше причинам, мы внесли локусы rs4979321, rs891725, rs1969944, rs4836643 в наш список потенциальных маркеров предрасположенности к сколиозу.

- В этом же исследовании были найдены еще четыре полиморфных локуса, строго ассоциированных с подростковым идиопатическим сколиозом. Эти же авторы провели дополнительное статистическое исследование полученных результатов [64]. Два из них: rs1400180 и rs10510181, находящиеся в интронах гена LOC101927174 (не охарактеризованный ген с хромосомы 3), и два других: rs1040315 и rs2222973 из интронов гена DSCAM (Down syndrome cell adhesion molecule) с хромосомы 21. Доказательства достоверности ассоциаций локусов со сколиозом, приведенные авторами, и частоты аллелей риска в азиатской и европейской популяциях дали нам основание внести эти полиморфные локусы в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

- Ген LEPR (Leptin receptor). Коллектив исследователей из Китая [65] проанализировал связь шести полиморфных локусов из гена LEPR у 570 пациентов в возрасте от 10 до 18 лет с подростковым идиопатическим сколиозом и 570 здоровых контролей соответствующего пола и возраста. Для rs2767485 из этих шести локусов была выявлена существенная разница в частотах аллелей и генотипов в экспериментальной и контрольной группе. Средняя частота встречаемости аллели риска С в европейской популяции 16,2%, в азиатской 5,7%. Хотя, эта ассоциация выявлена только в одном исследовании, мы добавили локус rs2767485 в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

- Гены BCL-2 (B-cell lymphoma 2), межгенный промежуток между PAX3 (Paired box 3) и EPNA4 (Ephrin receptor A4), возле AJAP1 (Adherens Junctions Associated Protein 1). Китайские ученые [66] сделали анализ геномов 4317 пациентов женского пола из китайской популяции с диагностированным подростковым идиопатическим сколиозом, у которых угол кривизны позвоночника (угол Кобба) был более 20°. В трех репликативных исследованиях они обнаружили достоверную связь с заболеванием следующих полиморфизмов: rs4940576 (интрон гена BCL-2), средняя частота аллели риска Т в европейской популяции 23,3%, в азиатской 46,9%; rs13398147 (между PAX3 и EPNA4), средняя частота аллели риска Т в европейской популяции 21,9%, в азиатской 23,4%; rs241215 (возле AJAP1) средняя частота аллели риска А в европейской популяции 57,2%, в азиатской 27,7%. Мы внесли полиморфные локусы rs4940576, rs13398147 и rs241215 в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

- Ген BNC2 (Basonuclin-2). Группа авторов из Японии [67] исследовала геномы 2109 пациентов с диагностированным сколиозом из японской популяции и геномы 11140 человек в качестве контроля. Они определили регион 9p22.2 на хромосоме 9, который связан с риском возникновения подросткового идиопатического сколиоза. В этом локусе находится ген BNC2, а в его интроне были определены несколько полиморфных локусов, которые статистически достоверно связаны с проявлениями сколиоза: rs3904778 (аллель G повышает риск), средняя частота аллели G в европейской популяции 22,9%, в азиатской популяции 66,2%; rs3850444 (аллель G повышает риск), средняя частота аллели G в европейской популяции 22,9%, в азиатской популяции 66,3%; rs2383002 (аллель С повышает риск), средняя частота аллели С в европейской популяции 22,96%, в азиатской популяции 66,87%; rs10738445 (аллель А повышает риск), средняя частота аллели А в европейской популяции 21,5%, в азиатской популяции 63,8%. Авторы повторили свое исследование на репрезентативной выборке пациентов и контролей из китайской популяции, и получили аналогичные результаты. Исследований описанных ассоциаций на выборках из европейской популяции мы не обнаружили, тем не менее, мы добавили полиморфные локусы rs3904778, rs3850444, rs2383002 и rs10738445 в список потенциальных маркеров предрасположенности к сколиозу.

- Группа исследователей из Китая [68] проанализировала образцы ДНК 990 пациентов женского пола с подростковым идиопатическим сколиозом и 1188 человек в контрольной группе из китайской популяции. В сравнении с контролем у пациентов со сколиозом частота аллели G полиморфного локуса rs12618119, находящегося в межгенном промежутке в позиции 2:126742262, была достоверно выше. Частота этой аллели в восточноазиатской популяции составляет 46,8%, в европейской – 33,5%. Публикаций с подобными исследованиями на выборках пациентов со сколиозом из европейской популяции мы не обнаружили, однако, включили этот локус в число потенциальных маркеров предрасположенности к сколиозу.

- Гены LINC01478 (Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 1478), SPATA21 (Spermatogenesis-Associated Protein 21), и CDH13 (Cadherin 13). В том же исследовании авторы показали, что частота аллели A полиморфного локуса rs9945359 гене LINC01478 была значительно выше в группе пациентов, чем в контрольной группе. Кроме этого, было обнаружено, что в группе пациентов со сколиозом частота аллели T полиморфного локуса rs4661748 в гене SPATA21 и аллели C полиморфного локуса rs4782809 в гене CDH13 достоверно ниже, чем в контрольной группе. Средняя частота аллели A полиморфного локуса rs9945359 (LINC01478) в европейской популяции 15,5%, в азиатской – 19,6%. Средняя частота аллели T полиморфного локуса rs4661748 (SPATA21) в европейской популяции 31%, в азиатской популяции – 16%. Средняя частота аллели G полиморфизма rs4782809 (CDH13) в европейской популяции 44,6%, в азиатской – 46,9%. В этом исследовании авторы проверяли пригодность для китайской популяции маркеров тяжести протекания сколиоза, отобранных по итогам обследования североамериканцев европейского происхождения. Из 53 маркеров только перечисленные показали достоверные различия в частотах аллелей в группе пациентов и контрольной группе. Мы внесли полиморфизмы rs12618119, rs9945359, rs4661748, rs4782809 в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

- Ген MMP9 (Matrix metalloproteinase 9) Китайские ученые [69] изучили группу женщин с диагностированным сколиозом из китайской популяции (N = 190) в сравнении с контрольной группой (N = 190). Исследование показало, что у пациентов с генотипом GG полиморфного локуса rs2250889 гена MMP9 больший максимальный угол Кобба, чем у носителей генотипа CG или CC. Средняя встречаемость аллели G полиморфизма rs2250889 в европейской популяции 4,6%, в азиатской 22,8%. Это единственная публикация, в которой описана такая зависимость, однако, мы добавили локус rs2250889 в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

- Ген HSPG2 (Heparan Sulfate Proteoglycan 2). Группа авторов из США [70] исследовала генотипы группы пациентов из европейской популяции и обнаружила несколько потенциально патогенных полиморфных локусов, связанных с идиопатическим сколиозом. Наиболее значимая ассоциация с заболеванием была обнаружена у полиморфного локуса rs143736974 в гене HSPG2. Средняя частота аллели дикого типа T полиморфного локуса rs143736974 в европейской популяции равна 99,6%, в азиатской 100%. Несмотря на такую низкую частоту мутантной аллели C и единственную публикацию, описывающую ассоциацию локуса со сколиозом, мы добавили локус rs143736974 в список маркеров предрасположенности к сколиозу, по крайней мере на исследовательский период.

Полную информацию об однонуклеотидных полиморфизмах можно найти на сайте <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. Полные названия генов приведены на английском языке, потому что для многих из них нет адекватных названий на русском, и эти названия приводятся в соответствии с международными названиями <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.

В итоге было проанализировано 80 генетических маркеров, для которых в специализированной литературе была показана статистически достоверная связь с проявлениями сколиоза. Для некоторых из этих маркеров показана связь не только с риском развития самого заболевания, но и с его прогрессом. Проведенный анализ показал, что практически

все эти полиморфные локусы являются по своей сути маркерами, а не причинами развития идиопатического сколиоза. За исключением полиморфных локусов rs4753426, rs11063714, rs8179090, rs1800469, rs3025058, rs1800795, rs1800796, и rs5742612, находящихся в регуляторных районах генов, а именно, в промоторах, остальные находятся либо в интронах, либо в межгенных промежутках. Только локус rs2289292 находится в экзоне гена TBX6, но замена нуклеотида в третьем положении не меняет аминокислоту, которую кодирует триплет, а значит, такая мутация не изменяет свойств белка. Из полиморфных локусов, находящихся в промоторах, только для rs3025058 показано, что его мутантный вариант 6T снижает экспрессию гена MMP3. Для локуса rs7755109, который находится в интроне гена GPR126, была показана строгая связь мутантной аллели G этого локуса с пониженными уровнями матричной РНК гена GPR126 и кодируемого им белка, хотя механизмов влияния этой мутации на альтернативный сплайсинг матричной РНК гена не выявлено.

Таким образом, все проанализированные полиморфные локусы только маркируют само заболевание или особенности его протекания, и не для одного из них не показано, что мутация в этом локусе является причиной заболевания идиопатическим сколиозом. В анализ было вовлечено 53 гена и района хромосом, если локусы располагались в межгенных промежутках. Практически все эти гены никак не связаны с развитием или функционированием соединительной ткани, а некоторые из них даже косвенно не вовлечены в генные каскады, обеспечивающие метаболизм соединительных тканей. Каким образом формируются выявленные ассоциации полиморфных локусов с заболеванием сколиозом, на сегодняшний день никто ответить не может. Не было выявлено ни одного основного гена, мутации в котором наверняка приводят к развитию болезни, и авторы большинства приведенных публикаций пишут, что сколиоз является полигенным заболеванием, для которого список генов не определен. Тем не менее, из большого списка маркеров, для которых была показана связь с идиопатическим сколиозом, мы выбрали для анализа 80 маркеров, один из которых не был включен нами в список потенциальных маркеров сколиоза, которые предполагается использовать для создания прогностической тест-системы, определяющей риски возникновения заболевания или особенности его протекания.

Анализ полученных результатов показал, что выборка в 100 образцов от пациентов с ИС для поиска таких ассоциаций, по нашему мнению, не достаточна, и требуются дальнейшие исследования с расширенной выборкой пациентов и адекватной контрольной группой.

При привлечении проекта «1000 геномов» в настоящем анализе, нас интересовала возможность использовать этот пул данных в качестве «контрольной группы» в наших исследованиях, поскольку на сайте проекта было заявлено, что в выборки проекта попали участники без видимых внешних признаков каких-либо заболеваний, и которые заявили о себе, что они здоровы. Но при анализе данных по частотам аллелей полиморфных локусов, связанных с проявлением сколиоза стало очевидным, что использовать их в качестве контроля не корректно.

В дальнейшем планируется проанализировать эти выборки с целью поиска ассоциаций между определенными маркерами или их комбинациями и теми или иными клиническими формами идиопатического сколиоза. Для этого и будет использоваться созданный ДНК-микрочип.

2 ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке 2 в качестве примеров приведены сканы ДНК-микрочипов после гибридизации с мечеными зондами из ДНК пациентов сформированной выборки, которым присвоены специальные шифры.

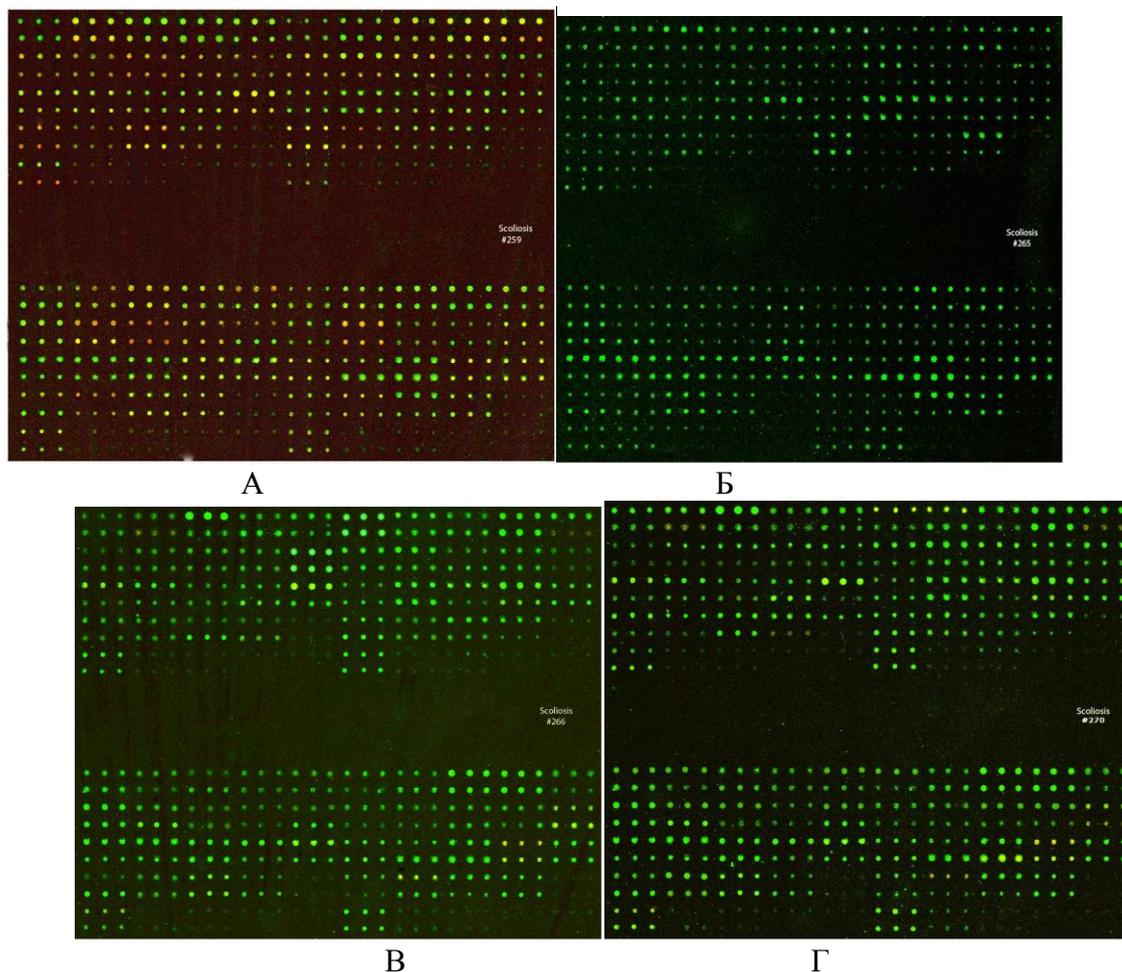


Рисунок 2 - Сканы ДНК-микрочипов с результатами анализа ДНК разных пациентов (А, Б, В, Г)

Каждый олигонуклеотид напечатан в трех повторах. В нечетных рядах размещены «нормальные» варианты маркеров, в четных рядах – «мутантные» варианты тех же маркеров. Точки с очень слабым сигналом – отрицательные контроли, то есть, фрагменты нечеловеческих (бактериальные и растительные) генов. Разная величина точек обусловлена артефактами, возникшими при печати микрочипов. Различия в цвете определяется тем, что программа, формирующая сканы микрочипов, придает искусственный цвет пятнам в зависимости от разброса интенсивности сигнала на микрочипе – черный – абсолютный минимум, белый – абсолютный максимум. «Читать» скан в таком виде, определяя статус каждого маркера, не представляется возможным, поэтому числовые данные каждого скана переводились в графическую форму.

На графиках 1-4 показаны интенсивности сигналов от «нормальных» и «мутантных» вариантов маркеров пациента (шифр 259). Разница в интенсивности сигналов у разных маркеров, возможно, зависит от длины меченых фрагментов ДНК, которые связываются с напечатанными олигонуклеотидами. При мечении ДНК использовались случайные праймеры, которые неравномерно распределены по геному, и в некоторых случаях могут формировать длинные последовательности, включившие больше флуоресцентной «мет-

ки», содержащие нужные гомологичные фрагменты. Концентрации всех напечатанных олигонуклеотидов выравнены, и различия в концентрациях составляют не более 1-2 процентов. Там, где разница в интенсивности сигналов между «нормальным» и «мутантным» вариантами одного маркера составляет не более 10%, анализируемый пациент считается гетерозиготным по данному маркеру, вне зависимости от абсолютной величины сигнала. Если разница в интенсивности сигналов между разными вариантами одного маркера составляет от полутора до двух и более раз, то пациент признается гомозиготным по преобладающей аллели.

График 1 (пояснения в тексте)



График 2



График 3



Генетический профиль пациента (шифр 259).

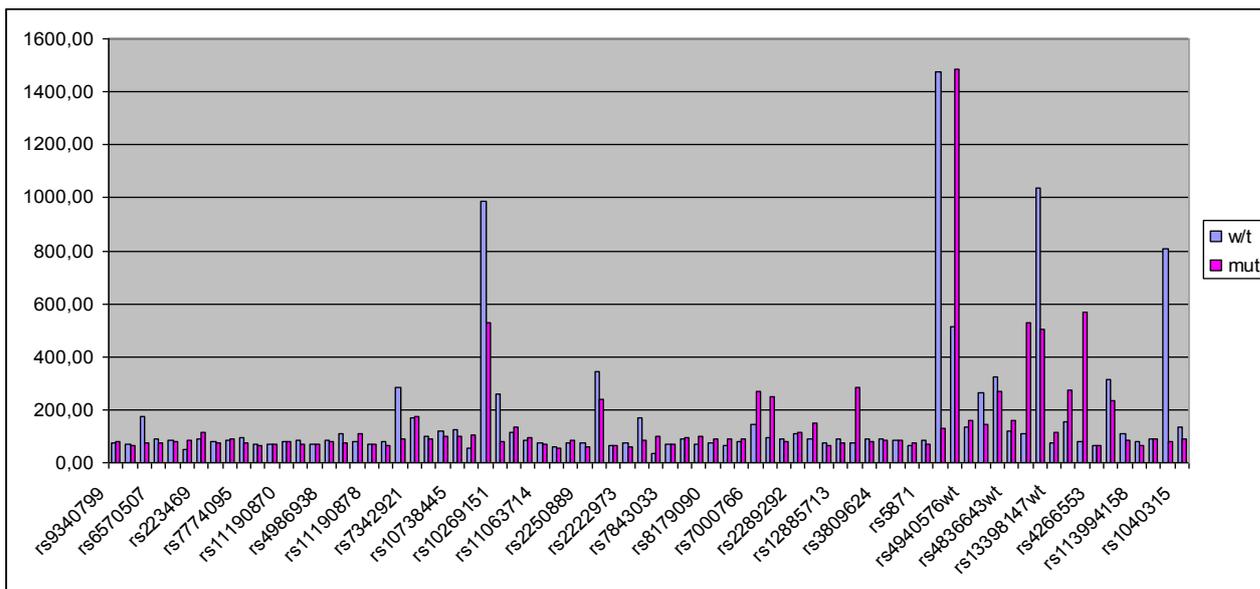
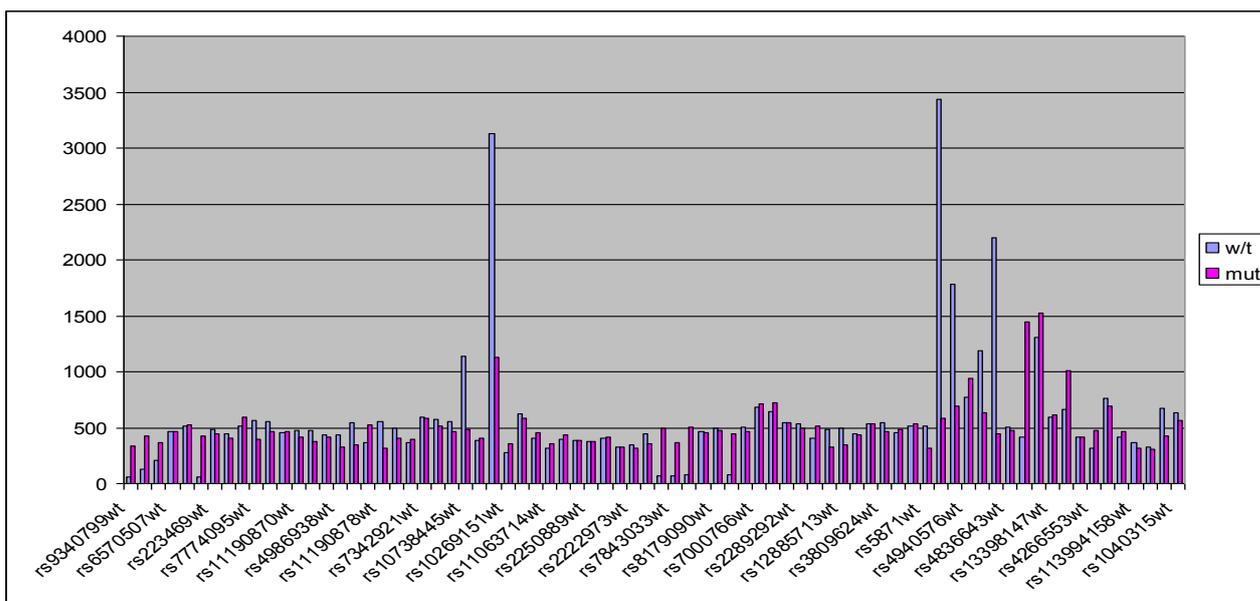


График 11

Генетический профиль контрольного образца (New Zond 2).



На графиках 10-11 также хорошо видна разница в статусе (гомо- и гетерозиготном) одних и тех же маркеров в разных образцах.

Полученные результаты показывают, что разработанная тест-система для выявления генетической предрасположенности к идиопатическим сколиозам хорошо дискриминирует разные аллели маркеров, даже если они отличаются заменой только одного нуклеотида.

Таким образом, чувствительность тест-системы вполне отвечает тем целям, которые были поставлены при ее разработке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени проанализировано ограниченное количество образцов из всей выборки пациентов для того, чтобы убедиться, что созданная тест-система соответствует тем целям, что ставились в НИР.

Созданная тест-система способна различать аллели маркеров, даже если они отличаются заменой одного нуклеотида. То есть, она позволяет эффективно анализировать геномы на наличие мутантных аллелей выбранных маркеров и оценивать связь этих аллелей (или их комбинаций) с идиопатическим сколиозом.

Таким образом, поставленные в настоящей НИР задачи были практически полностью выполнены, и обозначенные цели достигнуты. Созданный ДНК-микрочип позволяет надежно выявлять в геномах молекулярные маркеры предрасположенности к заболеванию идиопатическим сколиозом и маркеры прогрессирования этого заболевания. Также он вполне надежно различает аллели маркеров, что позволяет определять генотипы. Такая информация позволит провести поиск ассоциаций между маркерами и клиническими формами идиопатического сколиоза. В дальнейшем, знание генетического статуса индивида (пациента) позволит принимать профилактические меры для предотвращения заболевания или снижения его рисков, а также выбирать стратегию лечения сколиоза с учетом генетики пациента. То есть, созданный ДНК-микрочип даст возможность персонализированного подхода к лечению идиопатического сколиоза.

Список научной продукции по теме исследования представлен в приложении А.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Weinstein S.L., Dolan L.A., Cheng J.C., Danielsson A., Morcuende J.A. Adolescent idiopathic scoliosis. *Lancet*, 20087; 371:1527-37.
2. Михайловский М.В., Фомичев Н.Г. Хирургия деформаций позвоночника. – изд. 2-е. – Новосибирск. – 2011. – 588 с.
3. Emery AEN, Rimoin DL (1990) Principles and practice of molecular genetics. Churchill Livingstone, New York, NY.
4. E. J. Riseborough and R. Wynne Davies, “A genetic survey of idiopathic scoliosis in Boston, Massachusetts,” *Journal of Bone and Joint Surgery—Series A*, vol. 55, no. 5, pp. 974–982, 1973.
5. Кузнецов С.Б., М.В. Михайловский, М.А. Садовой, А.В. Корель, Е.В. Мамонова. Генетические маркеры идиопатического и врожденного сколиозов и диагноз предрасположенности к заболеванию. *Хирургия позвоночника*. - 2015 (т. 12). - №1. - с. 27-35.
6. Leilei Xu, Xusheng Qiu, Xu Sun, Saihu Mao, Zhen Liu, Jun Qiao, and Yong Qiu Potential genetic markers predicting the outcome of brace treatment in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J*. 2011 Oct; 20(10): 1757–1764. Published online 2011 Jun 21. doi: 10.1007/s00586-011-1874-7
7. Zhao D, Qiu GX, Wang YP, Zhang JG, Shen JX, Wu ZH. Association between adolescent idiopathic scoliosis with double curve and polymorphisms of calmodulin1 gene/estrogen receptor- α gene. *Orthop Surg*. 2009 Aug;1(3):222-30. doi: 10.1111/j.1757-7861.2009.00038.x.
8. Leilei Xu, Xusheng Qiu, Xu Sun, Saihu Mao, Zhen Liu, Jun Qiao, and Yong Qiu Potential genetic markers predicting the outcome of brace treatment in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J*. 2011 Oct; 20(10): 1757–1764. Published online 2011 Jun 21. doi: 10.1007/s00586-011-1874-7
9. Atsushi Miyake, Ikuyo Kou, Yohei Takahashi, Todd A. Johnson, Yoji Ogura, Jin Dai, Xusheng Qiu, Atsushi Takahashi, Hua Jiang, Huang Yan, Katsuki Kono, Noriaki Kawakami, Koki Uno, Manabu Ito, Shohei Minami, Haruhisa Yanagida, Hiroshi Taneichi, Naoya Hosono, Taichi Tsuji, Teppei Suzuki, Hideki Sudo, Toshiaki Kotani, Ikuho Yonezawa, Michiaki Kubo, Tatsuhiko Tsunoda, Kota Watanabe, Kazuhiro Chiba, Yoshiaki Toyama, Yong Qiu, Morio Matsumoto, and Shiro Ikegawa. Identification of a Susceptibility Locus for Severe Adolescent Idiopathic Scoliosis on Chromosome 17q24.3. *PLoS One*. 2013; 8(9): e72802. Published online 2013 Sep 4. doi: 10.1371/journal.pone.0072802
10. Rakesh Chettier, Lesa Nelson, James W. Ogilvie, Hans M. Albertsen, and Kenneth Ward Haplotypes at LBX1 Have Distinct Inheritance Patterns with Opposite Effects in Adolescent Idiopathic Scoliosis. *PLoS One*. 2015; 10(2): e0117708. Published online 2015 Feb 12. doi: 10.1371/journal.pone.0117708
11. Xiaochong Gao, Derek Gordon, Dongping Zhang, Richard Browne, Cynthia Helms, Joseph Gillum, Samuel Weber, Shonn Devroy, Saralove Swaney, Matthew Dobbs, Jose Morcuende, Val Sheffield, Michael Lovett, Anne Bowcock, John Herring, and Carol Wise CHD7 Gene Polymorphisms Are Associated with Susceptibility to Idiopathic Scoliosis *Am J Hum Genet*. 2007 May; 80(5): 957–965. Published online 2007 Mar 12. doi: 10.1086/513571
12. Swarkar Sharma, Xiaochong Gao, Douglas Londono, Shonn E. Devroy, Kristen N. Mauldin, Jessica T. Frankel, January M. Brandon, Dongping Zhang, Quan-Zhen Li, Matthew B. Dobbs, Christina A. Gurnett, Struan F.A. Grant, Hakon Hakonarson, John P. Dormans, John A. Herring, Derek Gordon and Carol A. Wise. Genome-wide association studies of adolescent idiopathic scoliosis suggest candidate susceptibility

- genes. *Human Molecular Genetics*, Volume 20, Issue 7, Pp. 1456-1466, doi: 10.1093/hmg/ddq571
13. Kou I, Takahashi Y, Johnson TA, Takahashi A, Guo L, Dai J, Qiu X, Sharma S, Takimoto A, Ogura Y, Jiang H, Yan H, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Hosono N, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Yonezawa I, Londono D, Gordon D, Herring JA, Watanabe K, Chiba K, Kamatani N, Jiang Q, Hiraki Y, Kubo M, Toyama Y, Tsunoda T, Wise CA, Qiu Y, Shukunami C, Matsumoto M, Ikegawa S. Genetic variants in GPR126 are associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat Genet.* 2013 Jun;45(6):676-9. doi: 10.1038/ng.2639. Epub 2013 May 12.
 14. Xu JF, Yang GH, Pan XH, Zhang SJ, Zhao C, Qiu BS, Gu HF, Hong JF, Cao L, Chen Y, Xia B, Bi Q, Wang YP. Association of GPR126 gene polymorphism with adolescent idiopathic scoliosis in Chinese populations. *Genomics.* 2015 Feb;105(2):101-7. doi: 10.1016/j.ygeno.2014.11.009. Epub 2014 Dec 2.
 15. Qiu XS, Tang NL, Yeung HY, Lee KM, Hung VW, Ng BK, Ma SL, Kwok RH, Qin L, Qiu Y, Cheng JC. Melatonin receptor 1B (MTNR1B) gene polymorphism is associated with the occurrence of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2007 Jul 15;32(16):1748-53.
 16. Qiu Y1, Mao SH, Qian BP, Jiang J, Qiu XS, Zhao Q, Liu Z. A promoter polymorphism of neurotrophin 3 gene is associated with curve severity and bracing effectiveness in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2012 Jan 15;37(2):127-33. doi: 10.1097/BRS.0b013e31823e5890.
 17. Jiang J, Qian B, Mao S, Zhao Q, Qiu X, Liu Z, Qiu Y. A promoter polymorphism of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 gene is associated with severity of thoracic adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2012 Jan 1;37(1):41-7. doi: 10.1097/BRS.0b013e31820e71e3.
 18. Zhou S1, Qiu XS, Zhu ZZ, Wu WF, Liu Z, Qiu Y. A single-nucleotide polymorphism rs708567 in the IL-17RC gene is associated with a susceptibility to and the curve severity of adolescent idiopathic scoliosis in a Chinese Han population: a case-control study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012 Sep 21;13:181. doi: 10.1186/1471-2474-13-181.
 19. Dormans JP, Grant SFA, Rendon N, Mentch FD, Kim CE, Frackelton EC, Bradfield JP, Zhang H, Chiavacci RM, Hakonarson H. A genome wide association study identifies an IL17RC missense mutation (S111 L) as an adolescent idiopathic scoliosis locus. 60th Am Soc Hum Genet Meet. Washington DC: Platform Session 51: Polygenic Traits: GWAS Methods and Results; 2010. p. 99. November 2.
 20. Ryzhkov II, Borzilov EE, Churnosov MI, Ataman AV, Dedkov AA, Polonikov AV. Transforming growth factor beta 1 is a novel susceptibility gene for adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2013 May 20;38(12):E699-704. doi: 10.1097/BRS.0b013e31828de9e1.
 21. Xu L, Sun W, Qin X, Qiu Y, Zhu Z. The TGFB1 gene is associated with curve severity but not with the development of adolescent idiopathic scoliosis: a replication study in the Chinese population. *BMC Musculoskelet Disord.* 2016 Jan 13;17:15. doi: 10.1186/s12891-016-0863-8.
 22. Chen Z, Tang NL, Cao X, Qiao D, Yi L, Cheng JC, Qiu Y. Promoter polymorphism of matrilin-1 gene predisposes to adolescent idiopathic scoliosis in a Chinese population. *Eur J Hum Genet.* 2009 Apr;17(4):525-32. doi: 10.1038/ejhg.2008.203. Epub 2008 Nov 5.
 23. Zhang H, Zhao S, Zhao Z, Tang L, Guo Q, Liu S, Chen L. The association of rs1149048 polymorphism in matrilin-1 (MATN1) gene with adolescent idiopathic scoliosis susceptibility: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2014;41(4):2543-9. doi: 10.1007/s11033-014-3112-y. Epub 2014 Jan 28.

24. Aulisa L1, Papaleo P, Pola E, Angelini F, Aulisa AG, Tamburrelli FC, Pola P, Logroscino CA. Association between IL-6 and MMP-3 gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007 Nov 15;32(24):2700-2.
25. Nikolova ST, Yablanski VT, Vlaev EN, Stokov LD, Savov AS, Kremensky IM, Loukanov AR. Association Between IL-6 and MMP3 Common Genetic Polymorphisms and Idiopathic Scoliosis in Bulgarian Patients: A Case-control Study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2016 May;41(9):785-91. doi: 10.1097/BRS.0000000000001360.
26. Liu Z, Tang NL, Cao XB, Liu WJ, Qiu XS, Cheng JC, Qiu Y. Lack of association between the promoter polymorphisms of MMP-3 and IL-6 genes and adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study in a Chinese Han population. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010 Aug 15;35(18):1701-5. doi: 10.1097/BRS.0b013e3181c6ba13.
27. Lee JS, Suh KT, Eun IS. Polymorphism in interleukin-6 gene is associated with bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Br*. 2010 Aug;92(8):1118-22. doi: 10.1302/0301-620X.92B8.23676.
28. Ni Y1, Li H, Zhang Y, Zhang H, Pan Y, Ma J, Wang L. Association of IL-6 G-174C polymorphism with bone mineral density. *J Bone Miner Metab*. 2014 Mar; 32(2):167-73. doi: 10.1007/s00774-013-0477-2. Epub 2013 Jun 13.
29. Moon ES1, Kim HS, Sharma V, Park JO, Lee HM, Moon SH, Chong HS. Analysis of single nucleotide polymorphism in adolescent idiopathic scoliosis in Korea: for personalized treatment. *Yonsei Med J*. 2013 Mar 1;54(2):500-9. doi: 10.3349/ymj.2013.54.2.500.
30. Yeung HY1, Tang NL, Lee KM, Ng BK, Hung VW, Kwok R, Guo X, Qin L, Cheng JC. Genetic association study of insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene with curve severity and osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. *Stud Health Technol Inform*. 2006;123:18-24.
31. Takahashi Y, Matsumoto M, Karasugi T, Watanabe K, Chiba K, Kawakami N, Tsuji T, Uno K, Suzuki T, Ito M, Sudo H, Minami S, Kotani T, Kono K, Yanagida H, Taneichi H, Takahashi A, Toyama Y, Ikegawa S. Lack of association between adolescent idiopathic scoliosis and previously reported single nucleotide polymorphisms in MATN1, MTNR1B, TPH1, and IGF1 in a Japanese population. *J Orthop Res*. 2011 Jul;29(7):1055-8. doi: 10.1002/jor.21347. Epub 2011 Feb 9.
32. Fei Q1, Wu Z, Wang H, Zhou X, Wang N, Ding Y, Wang Y, Qiu G. The association analysis of TBX6 polymorphism with susceptibility to congenital scoliosis in a Chinese Han population. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010 Apr 20;35(9):983-8. doi:10.1097/BRS.0b013e3181bc963c.
33. Mao S, Xu L, Zhu Z, Qian B, Qiao J, Yi L, Qiu Y. Association between genetic determinants of peak height velocity during puberty and predisposition to adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013 May 20;38(12):1034-9. doi: 10.1097/BRS.0b013e318287fcfd.
34. Jianhua Zhao, Mingyao Li, Jonathan P Bradfield, Haitao Zhang, Frank D Mentch, Kai Wang, Patrick M Sleiman, Cecilia E Kim, Joseph T Glessner, Cuiping Hou, Brendan J Keating, Kelly A Thomas, Maria L Garris, Sandra Deliard, Edward C Frackelton, F George Otieno, Rosetta M Chiavacci, Robert I Berkowitz, Hakon Hakonarson, and Struan FA Grant. The role of height-associated loci identified in genome wide association studies in the determination of pediatric stature. *BMC Med Genet*. 2010; 11: 96. Published online 2010 Jun 14. doi: 10.1186/1471-2350-11-96
35. Matthew B. Lanktree, Yiran Guo, Muhammed Murtaza, Joseph T. Glessner, Swneke D. Bailey, N. Charlotte Onland-Moret, Guillaume Lettre, Halit Ongen, Ramakrishnan Rajagopalan, Toby Johnson, Haiqing Shen, Christopher P. Nelson, Norman Klopp, Jens Baumert, Sandosh Padmanabhan, Nathan Pankratz, James S. Pankow, Sonia Shah, Kira

- Taylor, John Barnard, Bas J. Peters, Cliona M. Maloney, Maximilian T. Lobmeyer, Alice Stanton, M. Hadi Zafarmand, Simon P.R. Romaine, Amar Mehta, Erik P.A. van Iperen, Yan Gong, Tom S. Price, Erin N. Smith, Cecilia E. Kim, Yun R. Li, Folkert W. Asselbergs, Larry D. Atwood, Kristian M. Bailey, Deepak Bhatt, Florianne Bauer, Elijah R. Behr, Tushar Bhangale, Jolanda M.A. Boer, Bernhard O. Boehm, Jonathan P. Bradfield, Morris Brown, Peter S. Braund, Paul R. Burton, Cara Carty, Hareesh R. Chandrupatla, Wei Chen, John Connell, Chrysoula Dalgeorgou, Anthonius de Boer, Fotios Drenos, Clara C. Elbers, James C. Fang, Caroline S. Fox, Edward C. Frackelton, Barry Fuchs, Clement E. Furlong, Quince Gibson, Christian Gieger, Anuj Goel, Diederik E. Grobbee, Claire Hastie, Philip J. Howard, Guan-Hua Huang, W. Craig Johnson, Qing Li, Marcus E. Kleber, Barbara E.K. Klein, Ronald Klein, Charles Kooperberg, Bonnie Ky, Andrea LaCroix, Paul Lanken, Mark Lathrop, Mingyao Li, Vanessa Marshall, Olle Melander, Frank D. Mentch, Nuala J. Meyer, Keri L. Monda, Alexandre Montpetit, Gurunathan Murugesan, Karen Nakayama, Dave Nondahl, Abiodun Onipinla, Suzanne Rafelt, Stephen J. Newhouse, F. George Otieno, Sanjey R. Patel, Mary E. Putt, Santiago Rodriguez, Radwan N. Safa, Douglas B. Sawyer, Pamela J. Schreiner, Claire Simpson, Suthesh Sivapalaratnam, Sathanur R. Srinivasan, Christine Suver, Gary Swergold, Nancy K. Sweitzer, Kelly A. Thomas, Barbara Thorand, Nicholas J. Timpson, Sam Tischfield, Martin Tobin, Maciej Tomaszewski, W.M. Monique Verschuren, Chris Wallace, Bernhard Winkelmann, Haitao Zhang, Dongling Zheng, Li Zhang, Joseph M. Zmuda, Robert Clarke, Anthony J. Balmforth, John Danesh, Ian N. Day, Nicholas J. Schork, Paul I.W. de Bakker, Christian Delles, David Duggan, Aroon D. Hingorani, Joel N. Hirschhorn, Marten H. Hofker, Steve E. Humphries, Mika Kivimaki, Debbie A. Lawlor, Kandice Kottke-Marchant, Jessica L. Mega, Braxton D. Mitchell, David A. Morrow, Jutta Palmen, Susan Redline, Denis C. Shields, Alan R. Shuldiner, Patrick M. Sleiman, George Davey Smith, Martin Farrall, Yalda Jamshidi, David C. Christiani, Juan P. Casas, Alistair S. Hall, Pieter A. Doevendans, Jason D. Christie, Gerald S. Berenson, Sarah S. Murray, Thomas Illig, Gerald W. Dorn, II, Thomas P. Cappola, Eric Boerwinkle, Peter Sever, Daniel J. Rader, Muredach P. Reilly, Mark Caulfield, Philippa J. Talmud, Eric Topol, James C. Engert, Kai Wang, Anna Dominiczak, Anders Hamsten, Sean P. Curtis, 3 Roy L. Silverstein, Leslie A. Lange, Marc S. Sabatine, Mieke Trip, Danish Saleheen, John F. Peden, Karen J. Cruickshanks, Winfried März, Jeffrey R. O'Connell, Olaf H. Klungel, Cisca Wijmenga, Anke Hilde Maitland-van der Zee, Eric E. Schadt, Julie A. Johnson, Gail P. Jarvik, George J. Papanicolaou, Hugh Watkins on behalf of PROCARDIS, Struan F.A. Grant, Patricia B. Munroe, Kari E. North, Nilesh J. Samani, Wolfgang Koenig, Tom R. Gaunt, Sonia S. Anand, Yvonne T. van der Schouw, Meena Kumari on behalf of the Whitehall II Study and the WHII 50K Group, Nicole Soranzo, Garret A. FitzGerald, Alex Reiner, Robert A. Hegele, Hakon Hakonarson, and Brendan J. Keating. Meta-analysis of Dense Genecentric Association Studies Reveals Common and Uncommon Variants Associated with Height. *Am J Hum Genet.* 2011 Jan 7; 88(1): 6–18. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.11.007
36. Shu-Feng Lei, Tie-Lin Yang, Li-Jun Tan, Xiang-Ding Chen, Yan Guo, Yan-Fang Guo, Liang Zhang, Xiao-Gang Liu, Han Yan, Feng Pan, Zhi-Xin Zhang, Yu-Mei Peng, Qi Zhou, Li-Na He, Xue-Zhen Zhu, Jing Cheng, Yao-Zhong Liu, Christopher J. Papasian, and Hong-Wen Deng. Genome-wide association scan for stature in Chinese: evidence for ethnic specific loci. *Hum Genet.* 2009 Feb; 125(1): 1–9. Published online 2008 Nov 23. doi: 10.1007/s00439-008-0590-9
37. Gao W, Peng Y, Liang G, Liang A, Ye W, Zhang L, Sharma S, Su P, Huang D. Association between common variants near LBX1 and adolescent idiopathic scoliosis replicated in the Chinese Han population. *PLoS One.* 2013;8(1):e53234. doi: 10.1371/journal.pone.0053234. Epub 2013 Jan 4.

38. Cao Y, Min J, Zhang Q, Li H, Li H. Associations of LBX1 gene and adolescent idiopathic scoliosis susceptibility: a meta-analysis based on 34,626 subjects. *BMC Musculoskelet Disord.* 2016 Jul 22;17:309. doi: 10.1186/s12891-016-1139-z.
39. Zhu Z, Tang NL, Xu L, Qin X, Mao S, Song Y, Liu L, Li F, Liu P, Yi L, Chang J, Jiang L, Ng BK, Shi B, Zhang W, Qiao J, Sun X, Qiu X, Wang Z, Wang F, Xie D, Chen L, Chen Z, Jin M, Han X, Hu Z, Zhang Z, Liu Z, Zhu F, Qian BP, Yu Y, Wang B, Lee KM, Lee WY, Lam TP, Qiu Y, Cheng JC. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for adolescent idiopathic scoliosis in Chinese girls. *Nat Commun.* 2015 Sep 22;6:8355. doi: 10.1038/ncomms9355
40. Grauers A, Wang J, Einarsdottir E, Simony A, Danielsson A, Åkesson K, Ohlin A, Halldin K, Grabowski P, Tenne M, Laivuori H, Dahlman I, Andersen M, Christensen SB, Karlsson MK, Jiao H, Kere J, Gerdhem P. Candidate gene analysis and exome sequencing confirm LBX1 as a susceptibility gene for idiopathic scoliosis. *Spine J.* 2015 Oct 1;15(10):2239-46. doi: 10.1016/j.spinee.2015.05.013. Epub 2015 May 15.
41. Takahashi Y, Kou I, Takahashi A, Johnson TA, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Watanabe K, Chiba K, Hosono N, Kamatani N, Tsunoda T, Toyama Y, Kubo M, Matsumoto M, Ikegawa S. A genome-wide association study identifies common variants near LBX1 associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat Genet.* 2011 Oct 23;43(12):1237-40. doi: 10.1038/ng.974.
42. Chen S, Zhao L, Roffey DM, Phan P, Wai EK. Association of rs11190870 near LBX1 with adolescent idiopathic scoliosis in East Asians: a systematic review and meta-analysis. *Spine J.* 2014 Dec 1;14(12):2968-75. doi: 10.1016/j.spinee.2014.05.019. Epub 2014 May 27.
43. Chettier R, Nelson L, Ogilvie J.W, Albertsen H.M, Ward K. Haplotypes at LBX1 have distinct inheritance patterns with opposite effects in adolescent idiopathic scoliosis. *PLoS One.* 2015 Feb 12;10(2):e0117708. doi: 10.1371/journal.pone.0117708. eCollection 2015.
44. Kristen Fay Gorman, Cédric Julien, and Alain Moreau. The genetic epidemiology of idiopathic scoliosis. *Eur Spine J.* 2012 Oct; 21(10): 1905–1919. Published online 2012 Jun 14. doi: 10.1007/s00586-012-2389-6
45. Yu Zhang, Zuchao Gu, and Guixing Qiu. The Association Study of Calmodulin 1 Gene Polymorphisms with Susceptibility to Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 168106. Published online 2014 Jan 16. doi: 10.1155/2014/168106.
46. Rajasekaran S1, Kanna RM, Senthil N, Raveendran M, Ranjani V, Cheung KM, Chan D, Kao PY, Yee A, Shetty AP. Genetic susceptibility of lumbar degenerative disc disease in young Indian adults. *Eur Spine J.* 2015 Sep;24(9):1969-75. doi: 10.1007/s00586-014-3687-y. Epub 2014 Nov 22.
47. Zhao D, Qiu GX, Wang YP, Zhang JG, Shen JX, Wu ZH. Association between adolescent idiopathic scoliosis with double curve and polymorphisms of calmodulin1 gene/estrogen receptor- α gene. *Orthop Surg.* 2009 Aug;1(3):222-30. doi: 10.1111/j.1757-7861.2009.00038.x. ; Zhao D1, Qiu GX, Wang YP, Zhang JG, Shen JX, Wu ZH, Wang H. Association of calmodulin1 gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Orthop Surg.* 2009 Feb;1(1):58-65. doi: 10.1111/j.1757-7861.2008.00011.x.
48. Zhao D, Qiu GX, Wang YP. Is calmodulin 1 gene/estrogen receptor-alpha gene polymorphisms correlated with double curve pattern of adolescent idiopathic scoliosis? *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2008 Sep 16;88(35):2452-6.
49. Zhou S, Qiu XS, Zhu ZZ, Wu WF, Liu Z, Qiu Y. A single-nucleotide polymorphism rs708567 in the IL-17RC gene is associated with a susceptibility to and the curve severity of adolescent idiopathic scoliosis in a Chinese Han population: a case-control study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012 Sep 21;13:181. doi: 10.1186/1471-2474-13-181.

50. Zhou S, Zhu Z, Qiu X, Wu W, Wang W, Liu Z, Lv F, Qiu Y. Association study of IL17RC, CHL1, DSCAM and CNTNAP2 genes polymorphisms with adolescent idiopathic scoliosis susceptibility in a Chinese Han population. *Stud Health Technol Inform.* 2012;176:47-51.
51. Andriy Noshchenko, Lilian Hoffecker, Emily M Lindley, Evalina L Burger, Christopher MJ Cain, Vikas V Patel, and Andrew P Bradford. Predictors of spine deformity progression in adolescent idiopathic scoliosis: A systematic review with meta-analysis. *World J Orthop.* 2015 Aug 18; 6(7): 537–558. Published online 2015 Aug 18. doi: 10.5312/wjo.v6.i7.537
52. Bae JW1, Cho CH, Min WK, Kim UK. Associations between matrilin-1 gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis curve patterns in a Korean population. *Mol Biol Rep.* 2012 May;39(5):5561-7. doi: 10.1007/s11033-011-1360-7. Epub 2011 Dec 23.
53. Peng Y, Liang G, Pei Y, Ye W, Liang A, Su P. Genomic polymorphisms of G-protein estrogen receptor 1 are associated with severity of adolescent idiopathic scoliosis. *Int Orthop.* 2012 Mar;36(3):671-7. doi: 10.1007/s00264-011-1374-8. Epub 2011 Oct 16.
54. Ogura Y, Takahashi Y, Kou I, Nakajima M, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Yonezawa I, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Watanabe K, Chiba K, Toyama Y, Matsumoto M, Ikegawa S. A replication study for association of 5 single nucleotide polymorphisms with curve progression of adolescent idiopathic scoliosis in Japanese patients. *Spine (Phila Pa 1976).* 2013 Apr 1;38(7):571-5. doi: 10.1097/BRS.0b013e3182761535.
55. Zhang HQ, Lu SJ, Tang MX, Chen LQ, Liu SH, Guo CF, Wang XY, Chen J, Xie L. Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2009 Apr 15;34(8):760-4. doi: 10.1097/BRS.0b013e31818ad5ac.
56. Takahashi Y, Matsumoto M, Karasugi T, Watanabe K, Chiba K, Kawakami N, Tsuji T, Uno K, Suzuki T, Ito M, Sudo H, Minami S, Kotani T, Kono K, Yanagida H, Taneichi H, Takahashi A, Toyama Y, Ikegawa S. Replication study of the association between adolescent idiopathic scoliosis and two estrogen receptor genes. *J Orthop Res.* 2011 Jun;29(6):834-7. doi: 10.1002/jor.21322. Epub 2010 Dec 23.
57. Kotwicki T, Janusz P, Andrusiewicz M, Chmielewska M, Kotwicka M. Estrogen receptor 2 gene polymorphism in idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2014 Dec 15;39(26):E1599-607. doi: 10.1097/BRS.0000000000000643.
58. Zhao L, Roffey DM, Chen S. Association between the Estrogen Receptor Beta (ESR2) Rs1256120 Single Nucleotide Polymorphism and Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2016 Oct 17. [Epub ahead of print]
59. Whittock NV, Sparrow DB, Wouters MA, Sillence D, Ellard S, Dunwoodie SL, Turnpenny PD. Mutated MESP2 causes spondylocostal dysostosis in humans. *Am J Hum Genet.* 2004 Jun;74(6):1249-54. Epub 2004 Apr 30.
60. Cornier AS, Staehling-Hampton K, Delventhal KM, Saga Y, Caubet JF, Sasaki N, Ellard S, Young E, Ramirez N, Carlo SE, Torres J, Emans JB, Turnpenny PD, Pourquié O. Mutations in the MESP2 gene cause spondylothoracic dysostosis/Jarcho-Levin syndrome. *Am J Hum Genet.* 2008 Jun;82(6):1334-41. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.04.014. Epub 2008 May 15.
61. Clough M, Justice CM, Marosy B, Miller NH. Males with familial idiopathic scoliosis: a distinct phenotypic subgroup. *Spine (Phila Pa 1976).* 2010 Jan 15;35(2):162-8. doi: 10.1097/BRS.0b013e3181b7f1a7
62. Swarkar Sharma, Xiaochong Gao, Douglas Londono, Shonn E. Devroy, Kristen N. Mauldin, Jessica T. Frankel1, January M. Brandon1, Dongping Zhang, Quan-Zhen Li, Matthew B. Dobbs, Christina A. Gurnett, Struan F.A. Grant, Hakon Hakonarson, John P.

- Dormans, John A. Herring, Derek Gordon and Carol A. Wise. Genome-wide association studies of adolescent idiopathic scoliosis suggest candidate susceptibility genes. *Hum. Mol. Genet.* (2011) 20 (7): 1456-1466. doi: 10.1093/hmg/ddq571
63. Wu W, Zhu Z, Mao S, Qiu X, Qian B, Liu Z, Qiu Y. Lack of association between DSCAM gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis susceptibility in a Chinese Han population. *J Back Musculoskelet Rehabil.* 2015;28(4):681-7. doi: 10.3233/BMR-140567
 64. Douglas Londono, Steven Buyske, Stephen J Finch, Swarkar Sharma, Carol A Wise, and Derek Gordon. TDT-HET: A new transmission disequilibrium test that incorporates locus heterogeneity into the analysis of family-based association data. *BMC Bioinformatics.* 2012; 13: 13. Published online 2012 Jan 20. doi: 10.1186/1471-2105-13-13
 65. Liu Z, Wang F, Xu LL, Sha SF, Zhang W, Qiao J, Bao HD, Qiu Y, Jiang Q, Zhu ZZ. Polymorphism of rs2767485 in Leptin Receptor Gene is Associated With the Occurrence of Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2015 Oct 15;40(20):1593-8. doi: 10.1097/BRS.0000000000001095
 66. Zhu Z, Tang NL, Xu L, Qin X, Mao S, Song Y, Liu L, Li F, Liu P, Yi L, Chang J, Jiang L, Ng BK, Shi B, Zhang W, Qiao J, Sun X, Qiu X, Wang Z, Wang F, Xie D, Chen L, Chen Z, Jin M, Han X, Hu Z, Zhang Z, Liu Z, Zhu F, Qian BP, Yu Y, Wang B, Lee KM, Lee WY, Lam TP, Qiu Y, Cheng JC. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for adolescent idiopathic scoliosis in Chinese girls. *Nat Commun.* 2015 Sep 22;6:8355. doi: 10.1038/ncomms9355
 67. Ogura Y, Kou I, Miura S, Takahashi A, Xu L, Takeda K, Takahashi Y, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yonezawa I, Yanagida H, Taneichi H, Zhu Z, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Watanabe K, Hosogane N, Okada E, Iida A, Nakajima M, Sudo A, Chiba K, Hiraki Y, Toyama Y, Qiu Y, Shukunami C, Kamatani Y, Kubo M, Matsumoto M, Ikegawa S. A Functional SNP in BNC2 Is Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Am J Hum Genet.* 2015 Aug 6;97(2):337-42. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.06.012. Epub 2015 Jul 23
 68. Xu L, Huang S, Qin X, Mao S, Qiao J, Qian BP, Qiu Y, Zhu Z. Investigation of the 53 Markers in a DNA-Based Prognostic Test Revealing New Predisposition Genes for Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2015 Jul 15;40(14):1086-91. doi: 10.1097/BRS.0000000000000900
 69. Huang DS, Liang GY, Su PQ. Association of matrix metalloproteinase 9 polymorphisms with adolescent idiopathic scoliosis in Chinese Han female. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2011 Oct;28(5):532-5. doi: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2011.05.013.
 70. Erin E. Baschal, Cambria I. Wethey, Kandice Swindle, Robin M. Baschal, Katherine Gowan, Nelson L.S. Tang, David M. Alvarado, Gabe E. Haller, Matthew B. Dobbs, Matthew R.G. Taylor, Christina A. Gurnett, Kenneth L. Jones, and Nancy H. Miller. Exome Sequencing Identifies a Rare HSPG2 Variant Associated with Familial Idiopathic Scoliosis. *G3 (Bethesda).* 2015 Feb; 5(2): 167–174. Published online 2014 Dec 12. doi: 10.1534/g3.114.015669

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Список научной продукции по теме исследования

Кузнецов С.Б., М.В. Михайловский, М.А. Садовой, А.В. Корель, Е.В. Мамонова. Генетические маркеры идиопатического и врожденного сколиозов и диагноз предрасположенности к заболеванию // Хирургия позвоночника. 2015 (т. 12). № 1. С. 27-35.

Михайловский М.В. Отдаленные результаты хирургии идиопатического сколиоза подростков: мета-анализ // Хирургия позвоночника. 2016. № 4. С. 28-39.

Кузнецов С.Б., Михайловский М.В. Анализ генетических маркеров и обоснование их использования в определении предрасположенности к идиопатическому сколиозу (обзор литературы) // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № 10-4. С. 554-561.

Сарнадский В.Н., Михайловский М.В., Садовая Т.Н., Орлова Т.Н., Кузнецов С.Б. Частота структурального сколиоза среди школьников новосибирска по данным компьютерной топографии // Бюллетень сибирской медицины. 2017. №1(16). С.80-91.

Патент на полезную модель №2014148361/10(077812): БИОЧИП / Кузнецов С.Б., Корель А.В., Мамонова Е.В., Михайловский М.В., Садовой М.А. Заявитель - ООО «Таргетные медицинские технологии» ул. Фрунзе, 19 А, г. Новосибирск, Россия, 630091.

В печати:

Кузнецов С.Б., Садовой М.А., Михайловский М.В. Анализ полиморфных локусов и обоснование их использования в качестве потенциальных маркеров предрасположенности к идиопатическому сколиозу // Сибирский научный медицинский журнал.